

Testican-2 – Studien zu Expression und Funktion eines neuen Proteoglykans

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



vorgelegt von
Anke Schnepf
aus Wuppertal

im März 2004

Live long and prosper

Spock

Meiner Familie und meinem Freund Toni für die liebevolle Unterstützung.

Berichterstatter: Prof. Dr. Mats Paulsson
Prof. Dr. Reinhard Krämer
Prof. Dr. Sabine Waffenschmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Mai 2004

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die extrazelluläre Matrix und ihre Komponenten	1
1.2	Proteoglykane	1
1.2.1	Aufbau des Proteinanteils	2
1.2.2	Bildung und Einfluss der GAG-Ketten	2
1.2.3	Proteoglykane in der embryonalen Mausentwicklung	4
1.3	Integrine	6
1.4	Die BM-40-Familie	7
1.4.1	BM-40	8
1.4.2	SC1 9	
1.4.3	TSC-36	10
1.4.4	SMOCs	10
1.4.5	Testicane	11
1.5	Zielsetzung der Arbeit	15
2	ERGEBNISSE	16
2.1	Charakterisierung und Reinigung des Antikörpers gegen murines Testican-2	16
2.1.1	Charakterisierung des ungereinigten Testican-2-Antiserums	16
2.1.2	Affinitätsreinigung des anti-Testican-2-Antikörpers	19
2.1.3	Endogene Expression von Testican-2 in verschiedenen Zelllinien	22
2.1.4	Affinitätsreinigung des anti-Testican-2-Antikörpers in Kombination mit der vorherigen Abreicherung kreuzreagierender Antikörper	24
2.2	Charakterisierung der Glykoform und Verteilung von Testican-2 in Gewebe	33
2.2.1	Endogene Expression von Testican-2 in verschiedenen Zelllinien	33
2.2.2	Testican-2 in der adulten Maus	34
2.2.2.1	Nervengewebe	34
2.2.2.2	Endokrine Drüsen	37
2.2.2.3	Weitere Testican-2-positive Gewebe	41
2.2.3	Analyse der Glykosylierung von Testican-2	41
2.2.3.1	GAG-Analyse	43
2.2.3.2	Analyse der N-Glykane	45

2.2.4 Testican-2 in der Entwicklung	48
2.2.4.1 Embryonaltage 5,5 bis 7,5	49
2.2.4.2 Embryonaltage 8,5 bis 9,5	51
2.2.4.3 Embryonaltag 10,5	53
2.2.4.4 Embryonaltag 12,5	55
2.2.4.5 Embryonaltag 14,5	57
2.2.4.6 Embryonaltag 16,5	59
2.2.4.7 Neugeborene Maus (P 1,5)	61
2.2.4.8 Zusammenfassung	63
2.3 Zellassays und Bindungsstudien mit Testican-2	67
2.3.1 Zelladhäsionsassays	67
2.3.2 Inhibitionsassay	71
2.3.3 Bindungsstudien mit rekombinanten Integrinen	73
3 DISKUSSION	80
3.1 Charakterisierung und Reinigung des Testican-2-Antikörpers	80
3.2 Expression von Testican-2 während der embryonalen Entwicklung und in der adulten Maus	83
3.3 Posttranslationale Modifikationen von Testican-2	90
3.4 Zellassays und Bindungsstudien mit Testican-2	93
3.5 Fazit und Ausblick	98
4 MATERIAL UND METHODEN	100
4.1 Material	100
4.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	100
4.1.1.1 Chemikalien	100
4.1.1.2 Puffer	101
4.1.1.3 Verbrauchsmaterial	101
4.1.1.4 Zellkulturmedien und Zubehör	101
4.1.1.5 pcDNA3-Expressionsvektor	102
4.1.2 Geräte	102
4.1.3 Antikörper	103
4.1.4 Zelllinien	104
4.1.5 Enzyme	104
4.1.6 Proteine	104

4.2 Methoden	105
4.2.1 Proteinchemische Arbeiten	105
4.2.1.1 Proteinextrakte aus Gewebe	105
4.2.1.2 Proteinquantifizierung	106
4.2.1.3 Proteinfällung	107
4.2.1.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	107
4.2.1.5 Western-Blot-Analyse	108
4.2.1.6 Anreicherung von Testican-2 aus Proteinextrakt des Gehirns	110
4.2.1.7 Analyse der Glykoformen	111
4.2.2 Affinitätsreinigung des anti-Testican-2-Antikörpers aus Kaninchen	112
4.2.2.1 Erstellung des Protein-Extraktes aus EBNA-Zellen	112
4.2.2.2 Gießen der Affinitätssäulen	113
4.2.2.3 Anreicherung spezifischer Antikörper	113
4.2.2.4 Titerbestimmung mit Hilfe eines Festphasen-Immunoassays: ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)	114
4.2.3 Histologische Methoden	115
4.2.3.1 Herstellung der Gewebeschnitte	115
4.2.3.2 Färbungen	115
4.2.4 Zellkulturarbeiten	118
4.2.5 Bindungs- und Inhibitionsassay	120
4.2.5.1 Bindungsassay	120
4.2.5.2 Untersuchung des Einflusses der GAG-Ketten auf die Zelladhäsion	121
4.2.5.3 Inhibitionsassay	121
5 ZUSAMMENFASSUNG	122
6 LITERATURVERZEICHNIS	123
Abkürzungsverzeichnis	135
Anhang	
Abstract	
Erklärung zur Dissertation	
Danksagung	
Lebenslauf	

1 Einleitung

1.1 Die extrazelluläre Matrix und ihre Komponenten

Der Begriff extrazelluläre Matrix (ECM) ist als die Gesamtheit aller Makromoleküle definiert, die in den Geweben den Raum zwischen den Zellen ausfüllen. Sie besteht aus einem hochorganisierten Netzwerk von Collagenen, Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen und nicht-collagenen Proteinen und dient in Wirbeltieren als Strukturgerüst des Körpers [zur Übersicht siehe Gustafsson und Fässler, 2000] sowie zur Speicherung z.B. von Wachstumsfaktoren [Streuli, 1999]. Die Proteine der ECM spielen auch eine bedeutende Rolle bei der Zelladhäsion. Deren Bindung an Matrixrezeptoren, unter denen die Integrine eine wichtige Gruppe bilden, kann zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege sowie zur Umformung des Cytoskeletts führen. Sie tragen somit zur Adhäsion, Migration, Proliferation, Differenzierung und zum Überleben von Zellen bei [Gustafsson und Fässler, 2000]. Eine spezialisierte Form der ECM sind Basalmembranen [Paulsson, 1992; Timpl und Brown, 1996], die sich an Epithelien, Muskelzellen, Fettzellen, Schwann-Zellen und an der Oberfläche von Gehirn und Rückenmark sowie an chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks und anderen bedeckenden Zellschichten ausbilden [Franke, 1995; Bosman und Stamenkovic, 2003]. Die ECM ist nicht statisch, sie wird immer wieder erneuert, was einen konstanten Abbau durch Proteasen erfordert. Dabei spielt die Familie der Matrix-Metalloproteasen (MMP) eine bedeutende Rolle [Bosman und Stamenkovic, 2003].

Einige der erwähnten Protein-Familien, die im Zusammenhang mit den Untersuchungen von Testican-2 von Bedeutung sind, werden im Folgenden näher erläutert.

1.2 Proteoglykane

Proteoglykane bestehen aus einem Proteinanteil (Coreprotein) und langen, unverzweigten, aus alternierenden Disaccharid-Einheiten aufgebauten Polysaccharid-Ketten. Da die Disaccharid-Einheiten aus einer Uronsäure und einem Aminozucker (Glykosamin) bestehen, werden die Zuckerketten als Glykosaminoglykane (GAG) bezeichnet. Wegen des Säureanteils und der Modifikation mit Sulfatgruppen sind die GAGs stark negativ geladen. Diese Ladung ermöglicht die leichte Abtrennung der Proteoglykane von anderen Molekülen mittels Ionenaustauscher-Chromatographie und bildet den Ursprung für die Zusammenfassung der Proteoglykane zu einer Gruppe [Prydz und Dalen, 2000]. Trotzdem sind Proteoglykane untereinander in Aufbau und anderen Eigenschaften sehr verschieden. Die Größe des Coreproteins kann zwischen 10 und 500 kDa [Poole, 1986; Ruoslahti, 1988; Silbert und Sugumaran, 1995] variieren und die Anzahl an GAG-Ketten von eins bis zu 100 betragen [Ruoslahti, 1988; Kjellén und Lindahl, 1991]. Je nach Aufbau der GAG-Ketten bzw. Art der Disaccharide unterscheidet

man Heparansulfat-, Chondroitinsulfat/Dermatansulfat- und Keratansulfat-Proteoglykane. Es sind auch Proteoglykane zu finden, die eine Mischung aus verschiedenen GAG-Ketten aufweisen [Rapraeger et al., 1985; Kokenyesi und Bernfield, 1994; Bernfield et al., 1999] sowie Proteine, die nur zeitweise GAG-Ketten tragen („*part-time*“ Proteoglykane) [Bourin et al., 1986; Cheifetz et al., 1988a; Iozzo, 1998]. Die GAG-Ketten können auch in Abhängigkeit der Gewebe, in denen sie auftreten, variieren [Douglas und Kadler, 1998] und unterschiedliche Rollen der Proteoglykane in den jeweiligen Zellen bewirken. Ein Beispiel bildet Betaglycan, das die Wirkung des Wachstumsfaktors TGF- β in einem Zelltyp verstärkt und einem anderen aufgrund höher molekularer GAG-Ketten inhibiert [Eickelberg et al., 2002].

1.2.1 Aufbau des Proteinanteils

Bisher konnten mehr als 30 Coreproteine unterschiedlichen Aufbaus identifiziert werden [Bandtlow und Zimmermann, 2000], die bis auf eine Serin-Glycin-Bindungssequenz für die GAGs oft nicht viel gemeinsam haben. Die Coreproteine bilden nicht nur das Gerüst für die GAG-Ketten, sondern weisen einen bei extrazellulären Proteinen sehr verbreiteten Domänen-Aufbau mit strukturellen Domänen unterschiedlicher Funktion auf [Iozzo, 1998]. Eine Domäne ist als unabhängige, selbstständige Faltungseinheit mit einer Länge von etwa 30 bis 300 Aminosäuren definiert [Bork et al., 1996]. Homologe Domänen zeichnen sich durch Ähnlichkeiten auf Sequenzebene und in Sekundär- und Tertiärstruktur aus. Aufgrund homologer Domänen und Ähnlichkeiten in Lokalisation, Art und Anzahl von GAG-Ketten sowie häufig auftretender N-Glykane können die Proteoglykane in verschiedene Familien eingeteilt werden, deren Lokalisation oft auf bestimmte ECM-Strukturen wie z.B. Basalmembranen begrenzt ist [Silbert und Sugumaran, 1995]. In Kapitel 1.3 werden einige Domänen näher beschrieben.

1.2.2 Bildung und Einfluss der GAG-Ketten

Abgesehen von der Keratansulfat-Bildung beginnt die GAG-Biosynthese im Golgi-Apparat mit der sequenziellen Anheftung der vier Monosaccharide (=Linker-Region) Xylose (Xyl), zweimal Galactose (Gal) und Glucuronsäure (GlcA) an das Coreprotein über einen Serin-Sauerstoff [Prydz und Dalen, 2000]. Die Aminosäuresequenz der GAG-Bindungsstelle besteht neben dem Serin im Allgemeinen aus mindestens einem Glycin. Abhängig von den weiteren Aminosäuren im Bereich sowie der näherer Umgebung der Bindungsstelle werden bevorzugt Heparansulfat- oder Chondroitinsulfat-Ketten gebildet. Die Linker-Region wird durch alternierende Bindung von GlcA und N-Acetylglucosamin (GlcNAc) (bei Heparin und Heparansulfat) bzw. N-Acetylgalactosamin (GalNAc) (bei Chondroitinsulfat und Dermatansulfat) verlängert [Prydz und Dalen, 2000]. Wenn die Zuckerkette ihre endgültige Länge erreicht hat, beginnen sequenzielle, für die verschiedenen Sulfatketten-Arten spezifische Modifikationen [Bandtlow und Zimmermann, 2000] einiger Monosaccharide durch spezielle

Enzyme [Perrimon und Bernfield, 2000]. Dabei gibt es in jeder GAG-Kette regionale Variabilitäten der Modifikationen. Untersuchungen dieser Muster zeigten, dass es für spezifische Interaktionen mit Wachstumsfaktoren, Cytokinen, Matrixkomponenten und anderen Enzymen bestimmte Motive gibt [Salmivirta et al., 1996]. Das Ausmaß an Modifikationen und damit die Feinstruktur der GAG-Kette können bei demselben Enzym auch in Abhängigkeit von dem Gewebe, in dem es vorliegt, unterschiedlich sein, wie z.B. bei der N-Deacetylase/N-Sulfotransferase (*Abb. 1.1*) in Rattenleber, Maus-Mastozytoma und boviner Trachea beobachtet werden konnte [Brandan und Hirschberg, 1988; Eriksson et al., 1994; Toma et al., 1998], was zu unterschiedlichen Rollen des Proteoglykans führen kann.

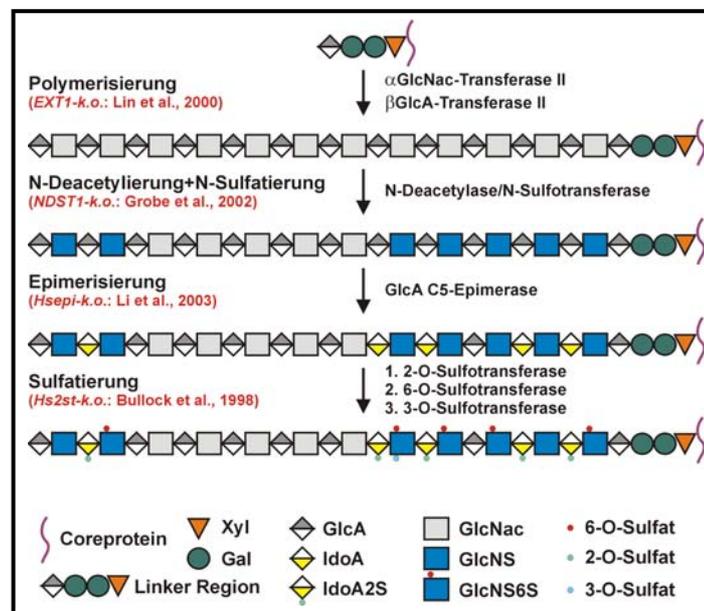


Abb. 1.1: Schema der Heparansulfat-Ketten-Biosynthese [nach Internet + Perrimon und Bernfield, 2000]

Die Heparansulfat-Biosynthese beginnt mit der Bildung einer Linker-Region, die über ein Serin-Sauerstoff an das Coreprotein gebunden und durch alternierende Bindung von GlcNAc und GlcA verlängert wird. Nach dem Ende dieser Polymerisierung beginnen sequenzielle Modifikationen einiger Monosaccharide wie N-Deacetylierung und anschließende N-Sulfatierung, Epimerisierung von GlcA zu IdoA, und Sulfatierung einiger Monosaccharide an Position 2,3 oder 6.

In rot sind Nullmutanten der entsprechenden Enzyme gekennzeichnet.

Gal=Galactose; GlcA=Glucuronsäure; GlcNAc=N-Acetylglucosamin; GlcNS=N-Sulfatglucosamin; IdoA=Iduronsäure; Xyl=Xylose; Zusatz 2/6S=Sulfatierung an Position 2/6

In *Abb. 1.1* ist die GAG-Biosynthese am Beispiel der Bildung von Heparansulfat-Ketten dargestellt. Die Länge einer Heparansulfat-Kette kann zwischen 20 und 150 Disacchariden variieren und auf dem Coreprotein befinden sich häufig nur zwei bis vier mögliche Heparansulfat-Anheftungsstellen [Perrimon und Bernfield, 2000]. Heparansulfat ist eine weit verbreitete Komponente von Proteoglykanen in der ECM und Heparansulfat-Proteoglykane können Bestandteil der Basalmembran, an die Zellmembran gebunden oder transmembran sein [Perrimon und Bernfield, 2000]. Früher dachte man, dass die Zuckerketten unspezifisch mit Wachstumsfaktoren und ECM-Molekülen interagieren und Liganden vor der Proteolyse schützen. Genetische Studien an *Drosophila* und Maus bzw. Nullmutationen der in die Heparansulfat-Biosynthese involvierten Enzyme (*s. Abb. 1.1*) machten allerdings Funktionen

von Heparansulfat-Proteoglykane in spezifischen, zu Zelldifferenzierung und Morphogenese gehörenden Signalwegen deutlich [Perrimon und Bernfield, 2000]. In Abhängigkeit davon, bei welchem Schritt die Heparansulfat-Bildung unterbrochen wird, ergibt sich ein unterschiedlich starker Phänotyp, der umso schwerwiegender wird, je früher die Störung erfolgt (die Nullmutanten sind in *Abb. 1.1* verzeichnet). Die Deletion eines der Sulfatierungs-Enzyme [Merry et al., 2001] führt zum Tod der Mäuse kurz nach der Geburt aufgrund fehlender Nieren und verschiedener Skelett-Abnormität [*Hs2st-k.o.*: Bullock et al., 1998]. Auch Nullmutanten ohne Glc-C5-Epimerase sterben kurz nach der Geburt und es sind zusätzlich Augendefekte sowie eine Unterentwicklung der Lunge zu beobachten [*Hsepi-k.o.*: Li et al., 2003]. Die Lungen-Fehlentwicklung und eine leichtere Missbildung des Skeletts tritt auch bei der gezielten Deletion der N-Deacetylase/N-Sulfotransferase auf, doch die Tiere sterben zum Teil schon 14,5-18,5 Tage post coitum (p.c.) [*NDST1-k.o.*: Grobe et al., 2002]. Wird die Bildung der Heparansulfat-Kette selbst durch Deletion des für die Polymerisierung erforderlichen Enzyms verhindert, tritt der Tod homozygoter Tiere schon vor Embryonaltag (E) 8,5, während der Gastrulation aufgrund einer durch Fehlen von organisiertem Mesoderm und extraembryonalem Gewebe bedingten Störung auf [*EXT1-k.o.*: Lin et al., 2000].

1.2.3 Proteoglykane in der embryonalen Mausentwicklung

Neben den in 1.2.2 beschriebenen Folgen der allgemeinen Störung der Heparansulfat-Biosynthese durch Nullmutation der entsprechenden Enzyme, bietet auch die Betrachtung der Auswirkungen von Deletionen einzelner Proteoglykane und weiterer ECM-Komponenten einen eindrucksvollen Einblick in die Rolle von ECM-Proteinen bei der embryonalen Mausentwicklung [Forsberg und Kjellén, 2001]. Die embryonale Mausentwicklung ist durch verschiedene hochkoordinierte Prozesse wie Gastrulation und Neurulation charakterisiert, in die eine Vielzahl von unabhängigen Vorgängen wie Morphogenese, Proliferation, Migration und Differenzierung involviert sind [Smith und Schoenwolf, 1997; Gustafsson und Fässler, 2000]. Obwohl viele Basalmembran-Proteine wie z.B. Perlecan und verschiedene Ketten des Glykoproteins Laminin (u.a. $\gamma 1$) bei der Mausentwicklung schon ab dem Zwei- bis Vier-Zell-Stadium beobachtet werden können [Dziadek und Timpl, 1985] und daher vermutlich schon zu Beginn der Mausentwicklung eine Rolle spielen, zeigen die Embryonen frühestens nach der Implantation, wenn mit der Bildung der primären Keimblätter die Entwicklung des eigentlichen Embryos beginnt (Gastrulation), Störungen bei der Deletion von Basalmembran-Komponenten. So sterben Mäuse mit fehlender Laminin- $\gamma 1$ -Kette z.B. an E 5,5 wegen abnormer Basalmembranen [Smyth et al., 1999]. Die Deletion von Dystroglycan, einem Rezeptor von Laminin, Agrin und Perlecan, führt zum Tod der Embryonen am E 6,5, verursacht durch eine Fehlentwicklung der Reichert-Membran [Williamson et al., 1997], einer nur bei Nagetieren auftretenden Basalmembran, die embryonales von maternalem Gewebe trennt.

Nach der Gastrulation beginnt ab E 7,5 die frühe Organogenese mit Bildung von Herzenlage und Neuralrohr (Neurulation). Obwohl die Lectinane (Aggrecan, Versican, Neurocan und

Brevican) und die Tenascin-Familie vorherrschende Komponenten in adultem Gehirn sind, zeigt die Deletion von Neurocan, Brevican und Tenascin-C erstaunlicherweise keinen Einfluss auf die embryonale Entwicklung der Mäuse sowie keine größeren anatomischen Gehirndefekte. Bei genaueren Analysen konnten allerdings bei Neurocan- und Brevican-Nullmutanten Fehler bei der synaptischen Transmission in dem für Lernvorgänge und Erinnerung wichtigen Hippocampus [Zhou et al., 2001; Brakebusch et al., 2002] und bei Tenascin-C-Mutanten verschiedene Verhaltens-Abnormitäten [Fukamauchi et al., 1996; Fukamauchi et al., 1998] festgestellt werden. Neben den Lecticanen gibt es noch eine weitaus größere Anzahl von Proteoglykanen im Nervensystem und insbesondere im Gehirn [zur Übersicht siehe Bandtlow und Zimmermann, 2000; Hartmann und Maurer, 2001]. Jedoch zeigen die bisher bekannten Nullmutanten wie z.B. von Glypican-2 oder NG2 nur schwache oder gar keine Phänotypen im Nervensystem, was durch einen Kompensations-Mechanismus wie z.B. vermehrte Expression verwandter Proteine erklärt werden könnte [Hartmann und Maurer, 2001]. Neben der Neurulation gehört auch die Entwicklung der Herzens zu den ersten wichtigen Stufen der Organogenese, da die Gewebe für die Organentwicklung mit Nährstoffen versorgt und Abfallprodukte abtransportiert werden müssen. Schon 9-10 Tage p.c. sind verschiedene Blutgefäße und ein regelmäßiges Pulsieren des Herzens zu beobachten [Rugh, 1990]. Etwa zu diesem Zeitpunkt zeigen Nullmutanten von Perlecan, das für die Stabilität von Basalmembranen von Bedeutung ist, eine Störung in der embryonalen Entwicklung: Viele homozygote Embryonen sterben 10 bis 12 Tage p.c. aufgrund von Blutansammlungen im Herzbeutel, die durch Risse in den Herz-Basalmembranen verursacht wurden, und dem daraus resultierenden Herzstillstand. Die Embryonen, die diese kritische Phase überleben, entwickeln wegen weiterer Basalmembran-Fehlbildungen perinatale Gehirndefekte sowie Knorpelbildungsstörungen [Arikawa-Hirasawa et al., 1999; Costell et al., 1999]. Die strukturelle Bedeutung von Perlecan kann dabei sowohl dem Coreprotein zugeschrieben werden, das z.B. an Collagen Typ IV und Nidogen bindet, als auch der gebundenen Heparansulfat-Kette, die Interaktionen mit ECM-Molekülen wie Laminin zeigt [Timpl und Brown, 1996]. Nullmutanten von Betaglycan, einem Transmembran-Proteoglykan, das eine hohe Bindungsaffinität gegenüber Wachstumsfaktoren der TGF (Transforming growth factor) β -Familie aufweist [Cheifetz et al., 1988b] und bei deren Bindung an Rezeptoren als verstärkender Corezeptor fungieren kann [Lopez-Casillas et al., 1991], weisen ebenfalls ab E 13,5 einen letalen Herzdefekt auf, der vermutlich durch reduzierte Myozyten-Proliferation im Herzmuskel verursacht wird [Stenvers et al., 2003]. Da Betaglycan für die Signalkaskade der im Herz vorherrschenden TGF-Isoform TGF β 2 von großer Bedeutung ist [Lopez-Casillas et al., 1993] und die Nullmutation von TGF β 2 auch zu schweren Herz-Missbildungen insbesondere des Herzmuskels führt [Bartram et al., 2001], ist Betaglycan vermutlich für die Funktion von TGF β 2 während der Entwicklung erforderlich [Stenvers et al., 2003].

1.3 Integrine

Integrine sind bei Mehrzellern die vorherrschenden Rezeptoren bei der Zelladhäsion an ECM-Moleküle und spielen bei Vertebraten außerdem eine wichtige Rolle bei Zell-Zell-Adhäsionen [Hynes, 2002]. Darüber hinaus bilden sie eine physikalische Transmembran-Brücke zwischen dem extrazellulären Substrat und dem Aktin-Cytoskelett [Wehrle-Haller und Imhof, 2002] und aktivieren viele intrazelluläre Signalwege [Hynes, 2002]. Signale vom Inneren der Zelle können auf der anderen Seite auch die Affinität der Integrine gegenüber ihren extrazellulären Liganden verändern [Dedhar und Hannigan, 1996]. Integrine ermöglichen so einen beiderseitigen Informationsaustausch durch die Zellmembran.

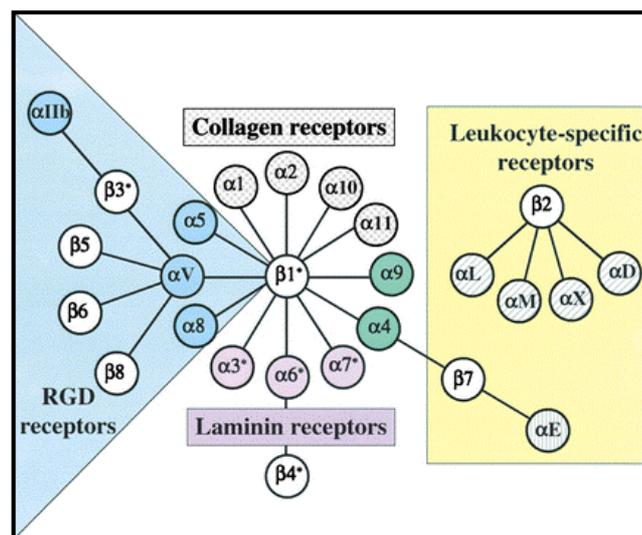


Abb. 1.2: Übersicht über die Integrin-Familie [aus Hynes, 2002]

In kultivierten Zellen sind Integrine, die an der Zelladhäsion beteiligt sind, in fokalen Kontakten lokalisiert. Als fokale Kontakte bezeichnet man Punkte, an denen Zellen ihren nächsten Kontakt mit dem Substrat eingehen [Carter et al., 1990]. Der Abstand zwischen Zellmembran und Substrat beträgt dann nur noch 15-20 nm [Burrige et al., 1988]. Die fokalen Kontakte bilden die primäre stabilisierende Kraft der kultivierten Zelle und den Ort für die Initialisierung von Actin-haltigen Stressfibrillen [Carter et al., 1990]. Integrine liegen oft in inaktiver Form vor, können aber schnell zur Ligandenbindung induziert werden [Ginsberg et al., 1990] und wandern dabei in Abhängigkeit vom Substrat in den Bereich der fokalen Kontakte [Grenz et al., 1993]. Die Ligandenbindung wiederum kann Signalkaskaden induzieren, die Änderungen des Zellverhaltens wie Zellausbreitung, -migration und -differenzierung hervorrufen [Hynes, 2002]. Im Bereich der fokalen Kontakte kann neben den Integrinen eine Vielzahl anderer Proteine nachgewiesen werden [Übersicht: Zamir und Geiger, 2001]. Eines der häufigsten Proteine ist dabei das Cytoskelett-gebundene Vinculin [Zamir und Geiger, 2001], das daher als Marker für fokale Kontakte Verwendung findet.

Integrine sind Heterodimere, die aus einer α -Untereinheit und einer β -Untereinheit aufgebaut sind. Beide Untereinheiten durchspannen einmal die Membran und besitzen neben der Transmembran-Domäne noch einen langen extrazellulären und einen kurzen intrazellulären Anteil (Abb. 1.3). Bisher konnten 18 α - und 8 β -Untereinheiten identifiziert werden. Einige der Untereinheiten können mit verschiedenen Partnern in Verbindung treten und es sind bisher 24 mögliche Kombinationen bekannt (Abb. 1.2). Dabei bildet die β 1-Untereinheit die meisten Dimere aus. Die Integrine können aufgrund evolutionärer Beziehung, Ligandenspezifität und, im Fall von β 2- und β 7-Integrin, wegen Begrenzung der Expression auf weiße Blutkörperchen, in verschiedene Subfamilien unterteilt werden [Hynes, 2002].

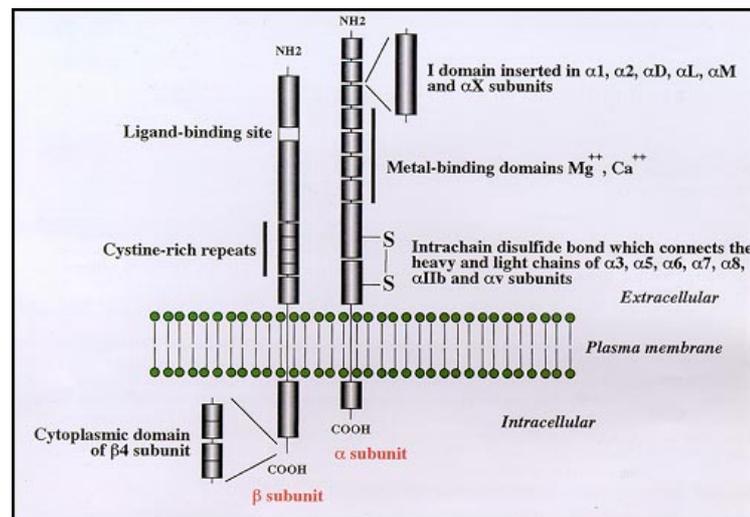


Abb. 1.3: Aufbau der Integrine [aus Darribère et al., 2000]

Jede Untereinheit besteht aus einer extrazellulären Domäne (1000 Aminosäuren bei der α -Untereinheit, 700 Aminosäuren bei der β -Untereinheit), einer Transmembran-Domäne und einer kurzen cytoplasmatischen Domäne. Sieben der α -Untereinheiten enthalten eine unabhängig gefaltete Domäne I/A, die zwischen den sich homolog wiederholenden Domänen II und III eingefügt wird und zusammen mit diesen und einer konservierten Region auf der β -Untereinheit eine von zweiwertigen Kationen abhängige Bindung von Liganden ermöglicht. Weitere Besonderheiten der beiden Untereinheiten sind in der Abbildung verzeichnet.

Die Integrine spielen unterschiedliche und wichtige Rollen bei den meisten biologischen Prozessen, wie z.B. der Entwicklung. Das wird auch bei der Betrachtung der auftretenden Phänotypen der untersuchten Null-Mutanten deutlich. So äußert sich z.B. das Fehlen der β 1-Untereinheit in einer Störung der frühen embryonalen Entwicklung (Gastrulation), wie sie auch bei Mäusen ohne die γ 1-Kette von Laminin beobachtet werden konnte [Smyth et al., 1999], und dem Tod der homozygoten Embryonen an E 6,5 [Fässler und Meyer, 1995].

1.4 Die BM-40-Familie

Die BM-40-Familie umfasst mehrere sekretierte Proteine, die eine extrazelluläre Calcium-bindende (EC)-Domäne und eine Follistatin-ähnliche (FS)-Domäne aufweisen, aufgrund deren sie zu einer Familie zusammengefasst werden (Abb. 1.4). Die EC-Domäne ist durch zwei

Calcium-bindende EF-Hand-Motive charakterisiert und für alle Familienmitglieder bis auf TSC-36 [Hambrock, 2001] konnte die Calciumbindung bestätigt werden. Die FS-Domäne erhielt ihren Namen wegen Ähnlichkeit zu einer Domäne, die in Follistatin, einem extrazellulären, an Mitglieder der TGF β -Proteinfamilie bindenden und deren Wirkung aufhebenden [Michel et al., 1993] Protein, vorkommt. Sie ist durch zehn Cysteine in einem typischen Muster charakterisiert. Ihre Kristallstruktur zeigt zwei Subdomänen: eine N-terminale Domäne mit Ähnlichkeit zu epidermalen Wachstumsfaktoren und eine C-terminale mit Homologie zu einer Kazal-Typ Proteaseinhibitor-Domäne [Hohenester et al., 1997].

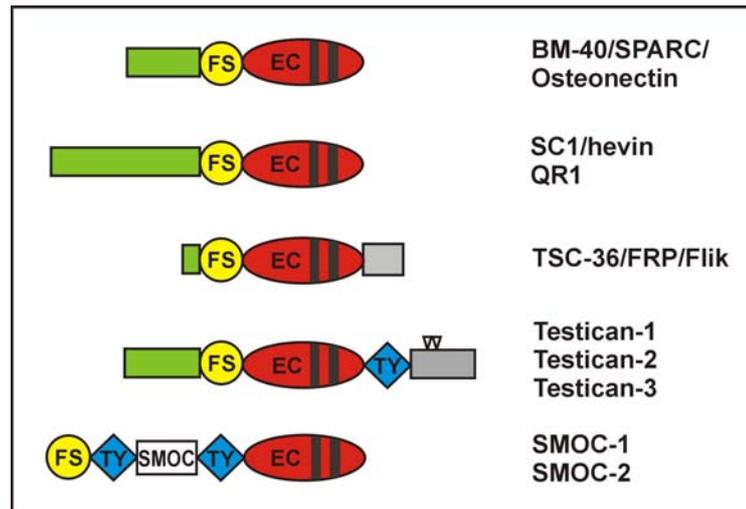


Abb. 1.4: Schematische Übersicht der Struktur von Mitgliedern der BM-40-Familie

FS=Follistatin-ähnliche Domäne; EC=extrazelluläre Calcium-bindende Domäne (die schwarzen Balken stehen für EF-Hand-Motive), TY=Thyroglobulin-Domäne; ∇ =potentielle GAG-Bindungsstellen.

1.4.1 BM-40

BM-40 war das erste extrazelluläre Protein mit einem EF-Hand-Paar, das entdeckt wurde. Neben der FS- und EC-Domäne besitzt BM-40 N-terminal noch eine BM-40-spezifische Domäne, die als Transglutaminase-Substrat dient [Hohenadl et al., 1995]. BM-40 kann mit Zytokinen und verschiedenen ECM-Molekülen, wie Collagenen (Typ I-IV), Vitronectin und Thrombospondin-1, interagieren und zeigt eine weit verbreitete Expression von der embryonalen Entwicklung bis zum adulten Stadium, insbesondere in Knochen [Maurer, 2002]. *In vitro*-Studien lassen eine Rolle bei Modulation der Zytokinen-Aktivität sowie Regulation von Zelladhäsion und Proliferation vermuten. Dabei konnte man feststellen, dass BM-40 die Zell-Morphologie durch Reduktion der Anzahl an fokalen Kontakten beeinflusst und die Adhäsion zum Substrat und benachbarten Zellen herabsetzt [Sage und Bornstein, 1984; Lane und Sage, 1990].

BM-40 wurde fast zeitgleich von drei Arbeitsgruppen entdeckt und beschrieben. Es stellte sich heraus, dass das ursprünglich als nicht-kollagener Bestandteil aus Knochenmark isolierte und daher als Osteonectin bezeichnete [Termine et al., 1981] Protein mit SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein), einem von Endothelzellen und Fibroblasten sekretierten

[Sage und Bornstein, 1984], und BM-40, einem aus dem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)-Tumor isolierten 40 kDa schweren Protein [Dziadek et al., 1986], identisch war [Mann et al., 1987].

Während die Störung der BM-40 Expression in Nematoden und Amphibien zu schweren, zum Teil letalen Entwicklungsabnormitäten führt [Fitzgerald und Schwarzbauer, 1998], ist der Phänotyp von murinen Nullmutanten verhältnismässig schwächer. Ihre Entwicklung erscheint bis zu einem Alter von sechs Monaten normal. Danach entwickeln sie schwere Augenschäden [Gilmour et al., 1998; Norose et al., 1998] und weisen verringerte Knochenmasse sowie verschlechterte Fähigkeit zur Knochenneubildung [Delany et al., 2000] und Wundheilung [Basu et al., 2001] auf. Neuste Studien zeigten außerdem, dass die Deletion von BM-40 die mechanischen Eigenschaften wie die Dehnbarkeit der Haut beeinträchtigt, was zumindest teilweise durch Veränderung in Struktur und Aufbau der kollagenen Matrix verursacht wurde [Bradshaw et al., 2003].

1.4.2 SC1

SC1 ist mit einer Ähnlichkeit von 70% auf Aminosäureebene das dem BM-40 am nächsten verwandte Protein [Soderling et al., 1997], unterscheidet sich aber durch eine viel längere saure N-terminale Domäne (*Abb. 1.5*). Wie BM-40 zeigt es eine Bindung an Collagen Typ I [Hambrock et al., 2003a]. SC1 wurde aus Rattenhirn [Johnston et al., 1990] und das humane Ortholog Hevin aus Hoch-Endothel-Venen-Zellen der Mandeln kloniert [Girard und Springer, 1995], die einen Übergang zwischen Lymphsystem und Blutbahn bilden. *In vitro*-Versuche zeigten, dass Hevin die Bildung von fokalen Kontakten unterbindet und so die Adhäsion und Ausbreitung von Endothelzellen an ein Substrat verhindert [Girard und Springer, 1996]. Es scheint also analog zu BM-40 antiadhäsiv zu sein (s. 1.4.1). Die Auswirkungen von SC1/Hevin auf die Zelladhäsion sind von besonderem Interesse, weil das Glykoprotein in vielen Krebs-Zellarten herunterreguliert wird und als negativer Regulator für Zellwachstum und Proliferation dienen könnte [Bendik et al., 1998; Nelson et al., 1998].

Während der embryonalen Entwicklung ist die SC1-mRNA bereits an E 8,5 nachzuweisen und scheint mit der Migration und Differenzierung des Myotoms während der Somitogenese assoziiert zu sein [Ringuette et al., 1998]. Ab E 12 ist es überwiegend im sich entwickelnden Nervensystem zu finden [McKinnon et al., 2000]. Bei der adulten Maus wird SC1 neben anderen Geweben [Soderling et al., 1997; Hambrock et al., 2003a] hauptsächlich im Gehirn exprimiert und zeigt eine weite Verteilung in vielen Neuronentypen und Gliazellen [Johnston et al., 1990; Mendis et al., 1996] sowie in Blutgefäßen [Soderling et al., 1997]. Die aufgrund der starken Expression gemachte Annahme einer entscheidenden Rolle von SC-1 bei Entwicklung und Funktion des ZNS konnte zwar durch Deletion des Proteins auf den ersten Blick nicht bestätigt werden, da die Nullmutanten normal erschienen und keine deutlichen anatomischen Defekte des ZNS [McKinnon et al., 2000] zeigten, neuere Studien lassen aber vermuten, dass SC-1 assoziiert an radiale Gliazellen in der oberen Schicht der Corticalplatte

durch seine antiadhäsive Wirkung die Migration von Neuronen beendet und dadurch für deren Einlagerung in die entsprechende Cortex-Schicht von Bedeutung ist [Gongidi et al., 2004].

1.4.3 TSC-36

Das Glykoprotein TSC-36 weist neben der FS- und EC-Domäne eine kurze N-terminale, aus nur 12 Aminosäuren bestehende Domäne und eine C-terminale Domäne mit schwacher Homologie zu einer von-Willebrand-Faktor Typ C-Domäne auf. Es wurde ursprünglich als ein TGF- β 1 induzierendes Protein (TGF- β stimulated clone 36) in einer murinen Osteoblasten-Zelllinie identifiziert [Shibanuma et al., 1993]. In Fibroblasten konnte die Expression von TSC-36 durch Transfektion einiger Onkogenen unterdrückt werden [Mashimo et al., 1997], wohingegen es durch Östrogen und Tamoxifen hochreguliert wird [Ohashi et al., 1997]. Außerdem wird TSC-36 eine antiproliferative [Sumitomo et al., 2000] und antiinvasive [Johnston et al., 2000] Wirkung zugeschrieben.

Es wurden bisher orthologe TSC-36 Proteine von verschiedener Spezies (Ratte, Mensch, Huhn, Xenopus und Affe) geklont und sequenziert [Zwijzen et al., 1994; Patel et al., 1996; Okabayashi et al., 1999; Tochitani et al., 2001]. Das Huhn-Ortholog Flik (follistatin-like) scheint während der embryonalen Entwicklung eine Rolle bei der mesodermalen Dorsalisierung, der neuralen Induktion [Patel et al., 1996] und bei der anschließenden Aufrechterhaltung der durch Sonic Hedgehog vermittelten Signalkaskade in der „Mittelachse“ zu spielen, die die axiale Musterbildung und die Vorderhirnentwicklung beeinflusst [Towers et al., 1999]. Außerdem zeigte es auch Auswirkung auf die Kompartimentbildung der Somiten und die Myogenese [Amthor et al., 1996]. TSC-36 wird bei der embryonalen Mausentwicklung zu Beginn der Neurulation ab E 7,5 exprimiert [De Groot et al., 2000]. In der adulten Maus ist das Protein nur in verschiedenen neuronalen Zellen des Gehirns sowie in Niere und Testis nachzuweisen [Hambrock, 2001]. Die genaue biologische Funktion von TSC-36 ist noch nicht geklärt.

1.4.4 SMOCs

SMOC-1 und SMOC-2 (secreted modular calcium-binding protein) sind jüngere, in unserer Abteilung identifizierte BM-40-Familienmitglieder. Wie der Name schon sagt, handelt es sich um sekretierte, extrazelluläre Glykoproteine, für die eine Calcium-abhängige Konformationsänderung bestimmt werden konnte und die beide keine potentielle Collagen-Bindungsstelle aufweisen [Vannahme et al., 2002; Vannahme et al., 2003]. Die SMOCs weisen potentielle N-Glykosylierungsstellen auf, die bei SMOC-1 und -2 zumindest zum Teil auch genutzt werden. Außerdem konnten bei SMOC-1 O-gebundene Zuckerketten und, trotz fehlender potentiellen GAG-Bindungsstellen, Hinweise auf Keratansulfat-Ketten gefunden werden [Vannahme et al., 2002; Vannahme et al., 2003]. Bei den SMOCs sind die EC- und FS-Domäne nicht benachbart, sondern werden durch eine neue, SMOC-spezifische und zwei

Thyroglobulin (TY)-Domänen voneinander getrennt (s. *Abb. 1.4*). Die hier neu auftretende TY-Domäne kann auch in verschiedenen anderen Proteinen wie z.B. Nidogen beobachtet werden, enthält ein charakteristisches CWCV-Tetrapeptid und wird durch drei Disulfidbrücken stabilisiert. In Thyroglobulin, dem Hypophysenhormon-Vorläufer und Namensgeber der Domäne, sind elf Kopien dieser Domäne unbekannter Funktion zu finden. Für eine Untergruppe von funktionell nicht verwandten Proteinen mit einer TY-Domäne konnte eine Rolle als Cystein- oder Kation-abhängige Proteaseinhibitoren nachgewiesen werden. Die Proteine werden daher als Thyropine bezeichnet [Lenarcic und Bevec, 1998]. Für die SMOCs konnte diese Eigenschaft bisher allerdings noch nicht bestätigt werden.

Die mRNA von SMOC-1 und -2 konnte in einer Vielzahl von Geweben detektiert werden, wobei die stärkste Expression von SMOC-1 und -2 in Ovarien nachzuweisen war [Vannahme et al., 2002; Vannahme et al., 2003]. Untersuchungen der ultrastrukturellen Lokalisation zeigten, dass SMOC-1 als integrale Komponente verschiedener Basalmembranen vorliegt. Es kann auch in Gewebestrukturen detektiert werden, die kein Laminin aufweisen, wie z.B. die Zona Pellucida [Vannahme et al., 2002]. Die Zona Pellucida ist eine die Oozyte umgebende ECM, die eine wichtige Rolle bei der Befruchtung und Wanderung des frühen Embryos durch den Eileiter spielt [Eppig et al., 1997; Elvin et al., 2000]. Da Nullmutationen der Glykoproteine ZP1, ZP2 und ZP3, aus der die Zona Pellucida hauptsächlich besteht [Bleil und Wassarman, 1980], abnorme Follikel-Entwicklung und zu verschiedenen Prozentsätzen Unfruchtbarkeit zeigten [Liu et al., 1996; Rankin und Dean, 2000; Rankin et al., 2001], könnte auch SMOC-1 eine Rolle bei der Biologie der Zona Pellucida und Fertilisations-Prozessen spielen.

1.4.5 Testicane

Auch die Testicane bzw. SPOCKs (SPARC/Osteonectin CWCV and Kazal-like domains proteoglycan) gehören aufgrund des Domänenaufbaus zur BM-40-Familie, sind aber im Gegensatz zu den anderen Familienmitgliedern potentiell Proteoglykane, wobei für Testican-1 eine Anheftung von GAG-Ketten gezeigt werden konnte [Bonnet et al., 1992]. Ihre Coreproteine weisen neben der FS- und EC-Domäne C-terminal eine TY-Domäne [Alliel et al., 1993; Maurer et al., 1995] und eine Domäne mit zwei potentiellen GAG-Bindungsstellen auf. Sie besitzen außerdem N-terminal zur FS-Domäne einen Bereich mit einem hohen Anteil saurer Aminosäuren, sowie einen hydrophoben Abschnitt, der indikativ für ein Signalpeptid ist [Bonnet et al., 1996]. Das Vorhandensein dieser Signalpeptidsequenz und das Fehlen einer zweiten hydrophoben Transmembranregion weisen darauf hin, dass die Testicane, wie auch die anderen BM-40-Familienmitglieder, sekretiert werden [Vannahme et al., 1999]. Außerdem konnte für alle drei Testicane eine Calcium-abhängige Konformationsänderung nachgewiesen werden [Kohfeldt et al., 1997; Vannahme et al., 1999; Vannahme, 2000]. Die Analyse der GAG-Ketten von rekombinanten Testican-1 und -3 ergab, dass sowohl Heparan- als auch Chondroitinsulfat an das Coreprotein gekoppelt sind [Bonnet et al., 1992; Hechler, 2003].

Das erste Testican (Testican-1) wurde ursprünglich als proteolytisches Fragment aus humaner Samenflüssigkeit isoliert [Bonnet et al., 1992]. Das danach in Mausgehirn nachgewiesene entsprechende murine Konstrukt zeigte gegenüber humanem Testican-1 eine Übereinstimmung von 95 % in der Coreprotein-Sequenz [Bonnet et al., 1996; s. Abb. 1.6]. Beim Durchmustern von EST (*expressed sequence tag*)-Datenbanken konnten in unserer Abteilung cDNA-Sequenzen mit großer Homologie zu Testican-1 identifiziert werden, die daher als Testican-2 und Testican-3 bezeichnet wurden. Die murinen Analoga zeigten auf Protein-niveau jeweils eine Konservierung von etwa 95 % gegenüber den humanen Testicanen. Testican-1 weist eine stärkere Ähnlichkeit gegenüber Testican-3 (55 % Homologie) als gegenüber Testican-2 (47 % Homologie) auf (Abb. 1.5), was sich auch in den Eigenschaften der drei Testicane widerspiegelt.

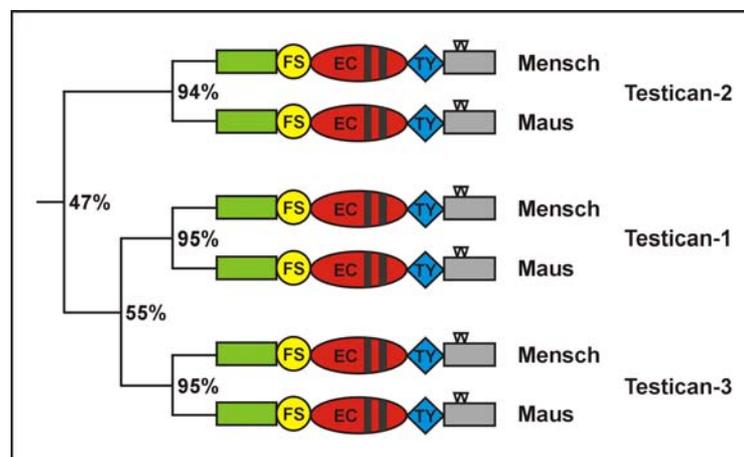


Abb. 1.5: Schematische Übersicht der Struktur und Homologien von Mitgliedern der Testican-Subfamilie. FS=Follistatin-ähnliche Domäne; EC=extrazelluläre Calcium-bindende Domäne (die schwarzen Balken stehen für EF-Hand-Motive); TY=Thyroglobulin-Domäne; V=potentielle GAG-Bindungsstellen.

Untersuchungen zur Verteilung der Testicane während der Entwicklung mittels RT-PCR zeigten eine Expression der mRNA von Testican-1 und -3 im Gehirn und gesondert im Cerebellum, beginnend mit Postnataltag (P) 2 (*nicht gezeigt*). Während bei jungen Mäusen Testican-1 und -3 zeitweise auch in Thymus und Testis sowie Testican-3 zusätzlich schwach in Lunge und Herz detektiert werden konnten, war die mRNA im adulten Tier bei beiden Testicanen ausschließlich auf das Gehirn beschränkt. Dahingegen zeigte Testican-2 im adulten Stadium außer in Gehirn auch eine Expression in Lunge und Testis, was durch Northern-Blot-Analyse bestätigt wurde [Vannahme et al., 1999]. Auch während der postnatalen Entwicklung war eine deutlich stärkere und kontinuierlichere Expression von Testican-2 zu beobachten, die bis auf Leber und Milz in allen untersuchten Geweben detektierbar war.

Im Gehirn konnten alle drei Testicane nur in neuronalen Zellen, nicht aber in Gliazellen nachgewiesen werden. Testican-1 mRNA und Protein waren bei jungen Mäusen (P 15 bzw. P 21) hauptsächlich in den Pyramidalzellen der CA3-Region (Hippocampus) und schwächer

auch in Cortex, Thalamus, Hypothalamus und Cerebellum lokalisiert. Ultrastrukturelle Analysen ergaben, dass sich Testican-1 an der postsynaptischen Seite der Synapse konzentriert und dort vermutlich mit membrangebundenen Komponenten interagiert [Bonnet et al., 1996]. In adultem, humanem Gehirn zeigte Testican-1-mRNA neben einer Verteilung in Neuronen fast aller Gehirnregionen zusätzlich Signale in Hypophyse, Choroid plexus Epithelium, aber auch in vaskulären Endothelzellen und Ventrikeln-umgebenden Ependymzellen [Marr et al., 2000]. Die mRNA von Testican-2 war ebenfalls in vielen Bereichen verschiedener Gehirnregionen zu detektieren. Starke Signale konnten in den Mitralzellen des Bulbus olfactorius, den Pyramidalzellen der CA3- und CA4-Regionen (Hippocampus), in den Purkinje-Zellen des Cerebellums und verschiedenen Neuronen-Schichten im Neocortex nachgewiesen werden. Schwächere Färbung waren in weiteren Bereichen von Bulbus olfactorius, Hippocampus und Cerebellums und sowie in Thalamus, Medulla und Pons zu erkennen [Vannahme et al., 1999]. Auch das Testican-3-Protein konnte in Neuronen fast aller Gehirnregionen detektiert werden, nur in Hypothalamus, Pons und Medulla war keine Färbung zu sehen [Hechler, 2003].

Während der embryonalen Mausentwicklung waren Testican-1 und -3 ab E 10,5 bis zur Geburt zu beobachten. Hohe Konzentrationen von Testican-1-Transkripten konnten in Gehirn, Rückenmark, Spinalganglien, der Medulla der Nebenniere und dem olfaktorischen Epithelium detektiert werden. Dabei war Testican-1 immer dann in den jeweiligen neuralen Geweben nachzuweisen, wenn diese eine Weiterentwicklung erfuhren. Was einen Einfluss von Testican-1 auf die Neurogenese vermuten ließ [Charbonnier et al., 2000]. Darüber hinaus konnte Testican-1 ab E 12 in Muskelanlagen nachgewiesen werden, wo es, mit einer cytoplasmatischen Färbung beginnend, sich immer mehr und beim adulten Tier ausschließlich, kolokalisiert mit Acetylcholin an den neuromuskulären Endplatten sammelte. Es zeigte sich im Muskel außerdem eine starke Färbung der myelinisierten Axone, die insbesondere am Ravierschünnring und im Cytoplasma von Schwann-Zellen detektiert werden konnte [Cifuentes-Diaz et al., 2000]. Auch Testican-3 war während der embryonalen Mausentwicklung im Bereich von Gehirn und Rückenmark zu detektieren. Es zeigte sich eine starke Färbung der Blutgefäßen des Rückenmarks und der Meningen an E 10,5. Es war auch eine Expression von Testican-3 im Herzen nachzuweisen (bis E 15,5). Neben der Färbung von neuralen Strukturen konnte zwischen E 12,5 und E 15,5 eine Färbung in Somiten und Leber detektiert werden. Bei neugeborenen Mäusen war Testican-3 nur noch in neuralen Geweben zu beobachten, wo vor allem die Purkinje-Zellen des Cerebellums eine starke Färbung zeigten [Hechler, 2003].

Peptidfragmente von Testican-1 mit unterschiedlicher Masse konnten in humaner cerebrospinaler Flüssigkeit [Stark et al., 2001] und in humanem Blutserum [BaSalamah et al., 2001] nachgewiesen werden. Das in cerebrospinaler Flüssigkeit detektierte Fragment war sehr kurz, hatte einen hohen Anteil an sauren Aminosäuren und entstammte der C-terminalen Domäne. Analog zu weiteren, in diesem Medium detektierten Fragmenten, entstand das Testican-1-Fragment durch Proteolyse nach ein bzw. zwei basischen Aminosäuren, was auch bei der Prozessierung von neuroendokrinen Precursoren beobachtet werden kann [Schwartz, 1986]. In

humanem Plasma war eine instabile, 130 kDa-große Form von Testican-1 detektierbar, die im Bereich der TY-Domäne vermutlich durch Serin-Proteasen proteolytisch gespalten wurde. Interessanterweise waren diese potentiellen Spaltstellen innerhalb eines Bereiches zu finden, der Homologie zu einer als Cystein-Proteaseinhibitor wirkenden Aminosäuresequenz von Thyropinen aufwies (s. 1.4.4). Durch proteolytische Spaltung innerhalb dieser Sequenz könnte die potentielle Proteaseinhibitor-Aktivität von Testican-1 in Blut inhibiert werden und dadurch eine Regulierung erfolgen [BaSalamah et al., 2001]. Die Aktivität der Thyropinsequenz von Testican-1 konnte mit Hilfe eines *in vitro*-Assay nachgewiesen werden. Gegenüber der lysosomalen Cystein-Protease Cathepsin L zeigte Testican-1 eine stark inhibierende Wirkung, während es auf das strukturell verwandte Cathepsin B keinen Einfluss hatte [Bocock et al., 2003].

Weitere Hinweise auf die Rolle von Testican-1 und -2 boten *in vitro*-Assays mit Zellen. So konnte Testican-1 in einem Zellkulturmodell die Anheftung neuronaler (N2A) Zellen verhindern und das Auswachsen der Neuriten inhibieren [Marr und Edgell, 2003]. Inhibierende Wirkung auf axonales Wachstum konnte auch bei Testican-2 gegenüber primären, dissoziierten Cerebellumszellen nachgewiesen werden [Lindgren, 1999].

Auch bei der Tumordinvasion könnten die Testicane eine Rolle spielen, da sie *in vitro* Einfluss auf die Bildung von MMPs zeigten. MMPs sind Zink-abhängige Enzyme, die essentiell für die Erneuerung der ECM unter normalen und pathologischen Bedingungen sind und in vielen humanen Tumoren überexprimiert werden [Stetler-Stevenson et al., 1993]. Die MMPs werden als inaktive Vorstufen gebildet und durch Spaltung mittels MT-MMPs (*membrane-type matrix metalloproteinases*) in die aktive MMP-Form umgewandelt. Die MT-MMPs und insbesondere MT1- und MT3-MMP sind wichtig für die Spaltung der inaktiven Pro-MMP-2 zur aktiven MMP-2-Form [Sato et al., 1994], der vorherrschenden Form in vielen Tumoren [Stetler-Stevenson et al., 1993]. Es konnte gezeigt werden, dass Testican-1 und -3 sowie ein Spliceprodukt von Testican-3 („N-Tes“) MT1- und MT3-MMP und damit die Spaltung von Pro-MMP-2 zu MMP-2 inhibieren [Nakada et al., 2001]. Dazu passt, dass Testican-1 in der metastasierenden Form einer humanen Speiseröhrenkrebs-Zelllinie im Vergleich zur nicht metastasierenden Form herunterreguliert wurde [Kawamata et al., 2003]. Testican-2 hingegen zeigte keine inhibierende Wirkung gegenüber den MT-MMPs [Nakada et al., 2001], sondern hob sogar die inhibierende Wirkung der Splicevariante von Testican-3 („N-Tes“) durch Bindung an deren EC-Domäne auf. Testican-2 könnte daher durch Inaktivierung der beiden anderen Testicane zur Invasion z.B. von Gliatumor-Zellen beitragen [Nakada et al., 2003].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, Expressionsform und -muster des Testican-2-Proteins in der Maus zu analysieren. Dabei sollte insbesondere auch auf die Lokalisation des Proteins im Verlauf der Entwicklung fokussiert werden. Außerdem sollten eine mögliche Adhäsion von Zellen an Testican-2 näher untersucht und potentielle Bindungspartner identifiziert werden.

Zur Herstellung eines bei der Untersuchung von Testican-2 als Hilfsmittel dienenden Antikörpers wurde vor Beginn der Arbeit ein Kaninchen mit rekombinant exprimiertem, murinem Testican-2 immunisiert. Die Expression des rekombinanten Proteins erfolgte zur Gewährleistung von richtiger Faltung und posttranslationaler Modifikationen in eukaryotischen Zellen (EBNA-293). Der verwendete Expressionsvektor enthielt neben dem Testican-2-Konstrukt zur Sicherstellung der Sekretion ein BM-40-Signalpeptid und für die leichtere Aufreinigung des Proteins einen *His-Myc-Tag*. Bei Reinigung des rekombinanten Testican-2 konnte eine Coreprotein-Fraktion mit einer distinkten Bande bei 67 kDa und eine Fraktion der potentiell GAG-haltige Form mit polydispenser Bande oberhalb von 80 kDa getrennt werden und der Antikörper wurde gegen ein Gemisch (50/50) beider Formen hergestellt.

Der polyklonale anti-Testican-2-Antikörper sollte zu Beginn der Arbeit charakterisiert, mittels Affinitätschromatographie gereinigt und dann für die immunhistochemische und immunologische (Western-Blot-Analyse) Charakterisierung des räumlichen und zeitlichen Expressionsmusters von Testican-2 in murinem Gewebe und insbesondere während der embryonalen Entwicklung verwendet werden. Denn neben der genauen Lokalisation von Testican-2 könnten mögliche Korrelationen der Expressionszeitpunkte mit definierten morphologischen Prozessen Hinweise auf Beteiligung von Testican-2 an diesen Vorgängen liefern.

Darüber hinaus sollten Masse und Art der posttranslationalen Modifikationen bzw. der Glykoketten untersucht werden. Dabei war die Frage zu klären, ob Testican-2 in allen Geweben als Proteoglykan vorliegt und welcher Natur dann die gebundenen GAG-Ketten sind.

Aufgrund eines N-terminalen hydrophoben Abschnitts, der indikativ für ein Signalpeptid ist, und des Fehlens einer potentiellen Transmembran-Region wird Testican-2 vermutlich sekretiert. Dies sollte durch Analyse verschiedener Zelllinien hinsichtlich endogener Expression von Testican-2 experimentell überprüft werden.

Um einen Einblick in mögliche Funktionen von Testican-2 zu erhalten, sollte das Proteoglykan außerdem hinsichtlich seiner Zellbindungseigenschaften untersucht werden. Dabei war zu prüfen, ob Zellen an Testican-2 adhären. Im Falle einer Zell-Adhäsion sollte dann untersucht werden, über welche Oberflächenproteine bzw. Rezeptoren die Zell-Bindung an Testican-2 erfolgt.

2 Ergebnisse

2.1 Charakterisierung und Reinigung des Antikörpers gegen murines Testican-2

Wie schon in der Einleitung erwähnt, sollten in dieser Arbeit das räumliche und zeitliche Expressionsmuster des Proteoglykans Testican-2 auf Proteinebene sowie das Vorhandensein von an das Coreprotein kovalent gebundener Zuckerketten untersucht werden. Eine entscheidende Voraussetzung dafür war ein spezifischer Antikörper, mit dem das Protein in den verschiedenen Experimenten gezielt detektiert werden kann. Für die vorliegenden Untersuchungen sollte ein polyklonaler anti-Testican-2-Antikörper aus Kaninchen verwendet und dafür zunächst charakterisiert und zur Abreicherung eventuell auftretender Kreuzreaktivitäten affinitätsgereinigt werden.

2.1.1 Charakterisierung des ungereinigten Testican-2-Antiserums

Der erste Schritt zur Charakterisierung eines Antikörpers ist die Bestimmung seines Titers mittels ELISA (s. 4.2.2.4). Der Titer eines Antikörpers stellt ein Maß für den Anteil an spezifischen Antikörpern gegen das jeweilige Antigen, hier Testican-2, in einer polyklonalen Antikörper-Lösung dar. Zur Titerbestimmung wurde eine Verdünnungsreihe des zu untersuchenden Antikörpers erstellt und das Maß der Bindung an das entsprechende Antigen mit Hilfe der Extinktion ermittelt. Aus der resultierenden Kurve, die einen sigmoiden Verlauf aufwies, ließ sich der Titer als Verdünnungsfaktor bei halbmaximaler Extinktion bestimmen. In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob das Antiserum das Antigen unter nativen Bedingungen erkennt bzw. ob Kreuzreaktivität gegenüber verwandten Proteinen vorliegt (Slot-Blot-Analyse) und wie es sich unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen in der Western-Blot-Analyse verhält.

Vor Beginn der vorliegenden Arbeit wurde zur Generierung des Antikörpers ein Kaninchen mit einem Gemisch aus Coreprotein und GAG-haltiger Form von Testican-2 immunisiert. Der Titer wurde für beide für die Immunisierung verwendeten Antigen-Fractionen getrennt bestimmt, um zu sehen, ob beide Fractionen erkannt werden. 61 Tage nach der ersten Antigen-Injektion wurde die erste Blutung entnommen und analysiert. Auch wenn das Antiserum auf einem Slot-Blot eine hohe Spezifität gegenüber seinem Antigen Testican-2 zeigte (*Abb. 2.1*), war der Titer mit 1:21.500 bzw. 1:8.300 noch recht niedrig und das Kaninchen wurde erneut immunisiert. Das Antiserum der nächsten Blutung (91. Immunisierungstag) zeigte bei gleicher Spezifität in der Slot-Blot-Analyse (*Abb. 2.1*) einen noch geringeren Titer (1:11.000 bzw. 4.200), daher wurde der Immunisierungsvorgang noch einmal wiederholt. Da nach vielfachen Immunisierungen die Gefahr von sich entwickelnden Kreuzreaktionen

deutlich steigt, wurde das Kaninchen zur Gewinnung des vollständigen Antiserums nach 119 Immunisierungstagen ausgeblutet. Mit 1:71.000 bzw. 1:17.000 konnte dann ein ausreichend hoher Titer ermittelt werden, der ein Vielfaches über den vorherigen Werten lag. Die an den verschiedenen Immunisierungstagen ermittelten Titer des Antiserums sind in *Tabelle 2.1* zusammengefasst.

Protein	61. Immun.-tag	90. Immun.-tag	119. Immun.-tag
Testican-2 (67 kDa)	1 : 21.500	1 : 11.000	1 : 71.000
Testican-2 (80 kDa)	1 : 8.300	1 : 4.200	1 : 17.000

Tab. 2.1: Übersicht über die mittels ELISA bestimmten Titer des Testican-2-Antiserums (aus den verschiedenen Blutungen)

Die Titer der verschiedenen Testican2(fl)-Antiseren gegenüber der GAG-freien (67 kDa) und der GAG-haltigen (80 kDa) Fraktion von rekombinantem Testican-2 wurde mittels ELISA unter Verwendung von Antikörper-Verdünnungen in einem Bereich von 1:25 bis 1:1.639.600 ermittelt. Die bei einer Extinktion von 450 nm gemessenen Werte wurden halblogarithmisch gegen den eingesetzten Verdünnungsfaktor aufgetragen. Die Werte für den Titer ergeben sich aus der Antikörper-Verdünnung bei halbmaximaler Extinktion (siehe auch *Abb. 2.10* und *Tab. 2.2*).

Immun.-tag=Immunisierungstag.

Wie schon erwähnt, wurde neben dem Titer auch die Spezifität des polyklonalen Antiserums der verschiedenen Blutungen gegenüber dem Antigen Testican-2 und die Kreuzreaktivität gegenüber anderen Testicanen mittels Slot-Blot-Analyse (s. 4.2.1.5) mit verschiedenen, zur Verfügung stehenden murinen Testican-Fragmenten untersucht. Für alle drei Immunisierungstage ergab sich ein ähnliches Bild. Es ist deutlich zu erkennen, dass das Kaninchen-serum zu keinem Zeitpunkt einen nachweisbaren Titer gegenüber rekombinanten Testican-1 und Testican-3 aufwies, weder gegen humane noch murine Fragmente. Dahingegen war eine deutliche spezifische Reaktion mit Testican-2 zu sehen. Von den hier aufgetragenen Fragmenten erkannte der Antikörper zu jedem Zeitpunkt die GAG-haltige Form von Testican-2 am besten. Deutlich wurde auch ein aus EC- und TY-Domäne bestehendes murines Testican-2-Fragment detektiert, wohingegen der Antikörper das entsprechende humane Konstrukt nicht erkannte, ebenso wenig wie die murine C-terminale Testican-2-Domäne. Das GAG-freie Testican-2-Coreprotein zeigte nur ein schwaches Signal, welches mit zunehmenden Immunisierungstagen geringfügig stärker wurde.

Es ist an dieser Stelle darauf hinzuweisen, dass aus der Tatsache, dass der Antikörper das einzige humane Testican-2-Fragment nicht erkennt, nicht geschlossen werden kann, dass er humane Testican-2-Konstrukte allgemein nicht detektieren kann. Weitere getestete humane Fragmente von Testican-2 waren in der Slot-Blot-Analyse positiv, wurden aber nicht gezeigt, da es sich um Zellkulturüberstand transfizierter Zellen handelte, deren Proteingehalt nicht quantifiziert werden konnte.

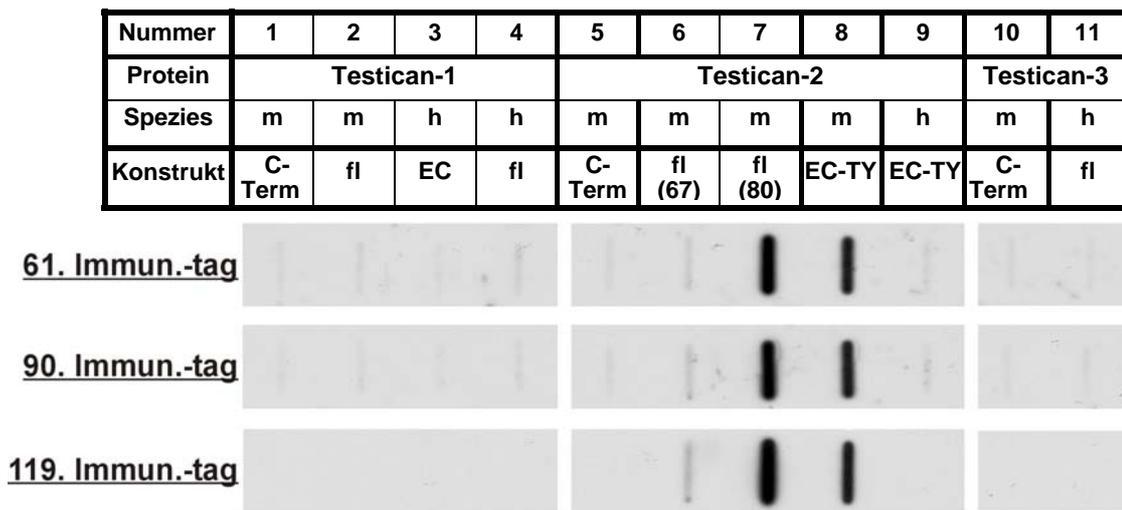


Abb. 2.1: Test der Spezifität bzw. Kreuzreaktivität des ungereinigten Testican-2-Antiserums gegenüber Testican-2 bzw. Testican-1 und Testican-3

Slot-Blots mit je 500 ng rekombinatem Protein pro Slot wurden mit Testican-2-Antiseren der Blutungen vom 61., 90., und 119. Immunisierungstag (Immun.-tag) mit einer Antikörper-Verdünnung von 1:1000 inkubiert. Die Signale wurde mit einem Peroxidase-gekoppelten anti-Kaninchen-Zweitantikörper (1:3000) und einem entsprechenden Lumineszenz-Detektionsreagenz sichtbar gemacht. 67=67 kDa-Fraktion, 80=über 80 kDa-Fraktion, C-Term=C-Terminus, EC=extrazelluläre Calciumbindende Domäne, fl=Volllänge (full length), h=human, m=murin, TY=Thyroglobulin-Domäne.

Neben der Analyse rekombinanter Proteine wurde auch die Reaktion des Antiserums in der Western-Blot-Analyse verschiedener Gewebeextrakte getestet. Für diesen Versuch wurden mit verschiedenen Puffern Extrakte von adultem Gehirn erstellt. Diese wurden zusammen mit Testis-Extrakt unter reduzierenden Bedingungen auf einem SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit dem Antiserum der verschiedenen Immunisierungstage inkubiert. Es wurden Testis- und Gehirnextrakte verwendet, da aufgrund der Northern-Blot-Analyse [Vannahme et al., 1999] eine Expression von Testican-2-Protein in diesen Geweben erwartet wurde.

Das detektierte Bandenmuster war für alle Immunisierungstage etwa gleich, entsprach aber nicht den erwarteten Signalen für Testican-2. Im Bereich um das apparente Molekulargewicht von 67 kDa, wo das rekombinante Protein eine scharfe Bande zeigte, waren zwar Banden zu erkennen, aber man konnte nicht beurteilen, welche spezifisch waren. Die für Proteoglykane typische polydisperse Bande, die auch das rekombinante Protein zeigte (vgl. Abb. 2.8), fehlte völlig. Außerdem traten unterschiedliche Kreuzreaktivitäten mit dem Marker auf (*nicht dargestellt*).

Die hier vorgestellten Daten zeigten, dass das polyklonale Antiserum zwar deutliche Spezifität gegenüber Testican-2 aufwies, aber auch Kreuzreaktivität gegenüber unbekanntem Proteinen in Gewebe hatte. Daher wurde der Antikörper im Folgenden mit Hilfe einer Antigensäule affinitätsgereinigt.

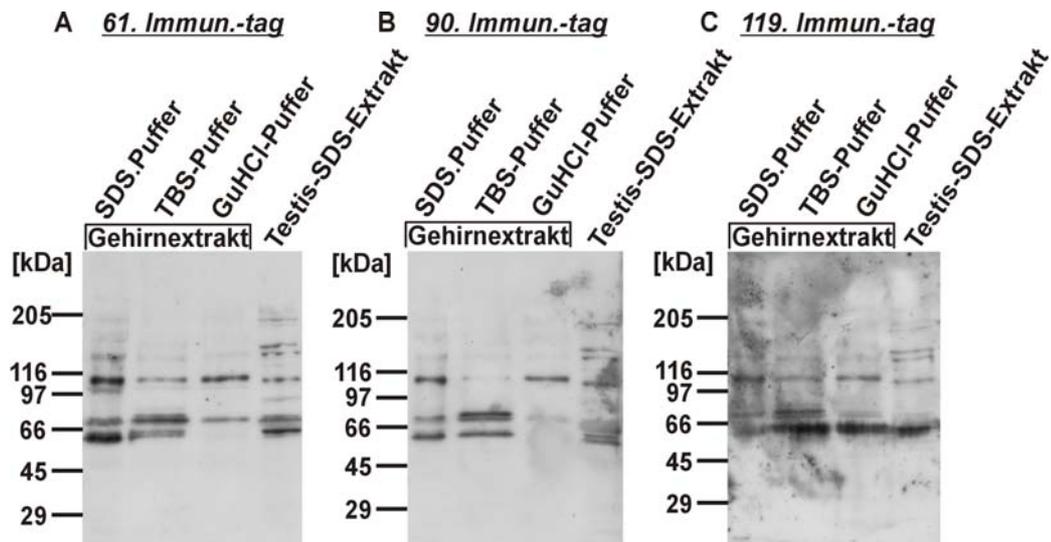


Abb. 2.2: Western-Blot-Analyse von Gewebeextrakten mit dem ungereinigten Testican-2-Antiserum

Je 50 µg mit TBS- und Guanidin-Hydrochlorid (GuHCl)-Puffern erstellter Gehirnextrakt und 10 µl Gehir- bzw. Testis-SDS-Extrakt wurden unter reduzierenden Bedingungen auf 4-15%igen SDS-Gradientengelen aufgetrennt und auf Membranen transferiert. Diese wurde mit dem Testican-2-Antiserum vom

A: 61. Immunisierungstag (Immun.-tag), (Antikörperverdünnung 1:500)

B: 90. Immunisierungstag, (Antikörperverdünnung 1:500)

C: 119. Immunisierungstag, (Antikörperverdünnung 1:1000)

inkubiert und die Signale mit einem Peroxidase-gekoppelten anti-Kaninchen-Zweitantikörper aus Schwein und entsprechendem Detektionssystem sichtbar gemacht. Als Größenstandard wurde ein HMW (high molecular weight)-Marker auf den Gelen parallel mit aufgetrennt.

2.1.2 Affinitätsreinigung des anti-Testican-2-Antikörpers

Zur Affinitätsreinigung des polyklonalen Antiserums gegen Testican-2 wurde eine Antigensäule verwendet, die durch Kopplung eines Gemisch der beiden rekombinanten Testican-2(fl)-Formen an aktivierte CNBr-Sepharose angefertigt worden war. Gibt man das polyklonale Antiserum über die Säule, binden die spezifischen Antikörper an ihr Antigen und können nach Waschen der Säule z.B. mit 3 M Kaliumthiocyanat (KSCN)-Lösung eluiert werden. Da man mit dieser Prozedur auch Antikörper verliert, lag der Titer des affinitätsgereinigten Antikörpers mit 1:25.600 (Coreprotein) bzw. 1:3.100 (GAG-Form) unter den Werten für das Rohserum (vgl. Tab. 2.1), war aber immer noch hoch genug für weitere Experimente.

Die Spezifität des gereinigten Antikörpers und mögliche Kreuzreaktivitäten gegenüber weiteren Mitgliedern der BM-40-Familie wurden unter nativen (Slot-Blot-Analyse, Abb. 2.3-A) und denaturierenden (Western-Blot-Analyse, Abb. 2.3-B) Bedingungen untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass der Antikörper unter beiden Konditionen spezifisch nur mit rekombinantem Testican-2 reagierte.

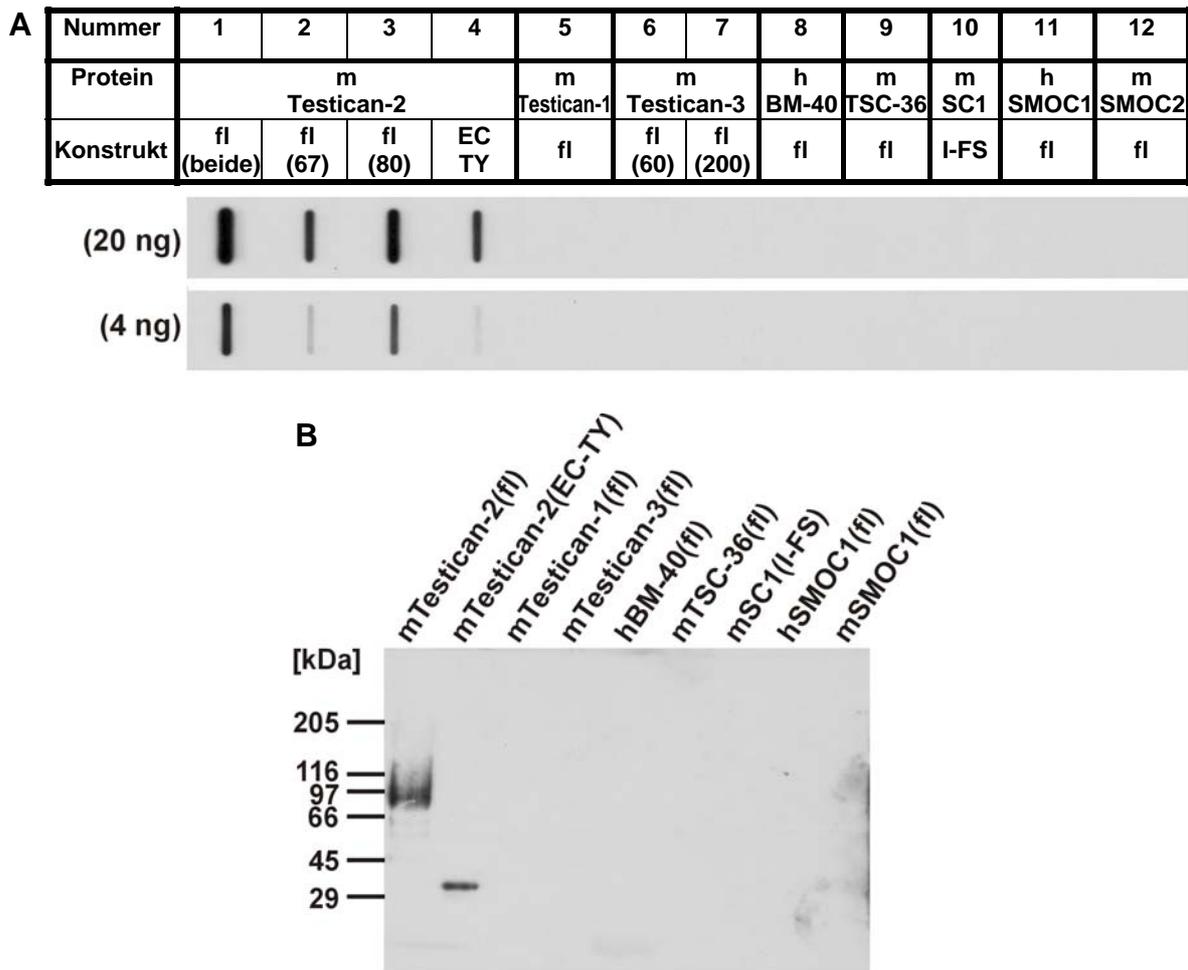


Abb. 2.3: Test von Spezifität und Kreuzreaktion des affinitätsgereinigten anti-Testican-2-Antikörpers gegenüber den Mitgliedern der BM-40-Familie

A: unter nativen Bedingungen in der Slot-Blot-Analyse

B: unter denaturierten Bedingungen in der Western-Blot-Analyse

Je 4 und 20 ng rekombinantes Protein wurden direkt auf eine Membran aufgebracht (**A**) bzw. 10 ng der gleichen Proteine unter reduzierenden Bedingungen auf einem 4-15%igem SDS-Gel aufgetrennt und dann auf eine Membran transferiert (**B**). Die Membranen wurden mit dem affinitätsgereinigten anti-Testican-2-Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 inkubiert. Als Größenstandard wurde ein HMW (high molecular weight)-Marker parallel auf dem Gel mit aufgetrennt.

Der so gereinigte Antikörper wurde nun auch zur Analyse von Gewebeextrakten verwendet, dessen Ergebnis in *Abb. 2.4* in einer Übersicht dargestellt ist.

Da die mRNA von Testican-2 mittels *in situ*-Hybridisierung auf Gewebeschnitten in verschiedenen Gehirnregionen nachgewiesen werden konnte [Vannahme et al., 1999], galt das Interesse einer Übersicht über Form und Verteilung des Testican-2-Proteins in diesem Gewebe. Dazu wurde das Gehirn einer adulten Maus in seine Segmente zerlegt und mit Tris/EDTA-Puffer Extrakte der einzelnen Gehirnbereiche angefertigt. In Übereinstimmung mit den *in situ*-Daten war das Testican-2-Protein in allen Gehirnregionen zu detektieren und es zeigte sich für alle Bereiche ein vergleichbares Bandenmuster: Neben der, aufgrund der Western-Blot-Analyse des rekombinanten Testican-2 erwarteten, polydispersen Bande mit einem apparentem Molekulargewicht zwischen 80 und 120 kDa, waren zusätzlich distinkte Banden bei 45, 65 und 130 kDa zu sehen (*Abb. 2.4-A*). Die distinkte Bande bei 65 kDa wurde

ebenfalls schon bei dem rekombinanten Testican-2 detektiert und könnte das Coreprotein darstellen. Zusätzlich wurden Gewebeextrakte weiterer Bereiche des ZNS (Hypophyse und Rückenmark) von adulten Mäusen erstellt. Der Hypophysen-Extrakt zeigte eine sehr starke Reaktion mit dem anti-Testican-2-Antikörper, obwohl im Vergleich zu den anderen Extrakten weniger Protein aufgetragen wurde. Die Analyse von Rückenmark-Extrakt ergab nur eine Bande bei 45 kDa, die auch schon in den Gehirnextrakten zu beobachten war (*Abb. 2.4-A*). Die Untersuchung weiterer Gewebe außerhalb des ZNS, die ebenfalls mit TBS/EDTA-Puffer extrahiert wurden, zeigten im Fall von Haut, Testis, Thymus, Ovarien, Lunge und Milz eine scharfe Bande von etwa 65 kDa; Gewebeextrakte von Herz, Skelettmuskulatur und Niere ergaben keine Signale (*Abb. 2.4-B*). Eine für Proteoglykane typische polydisperse Bande fehlte dabei und könnte auf unterschiedliche Expressionsformen (mit und ohne gebundene GAG-Ketten) in neuronalem und nicht neuronalem Gewebe hinweisen. Das würde bedeuten, dass es sich bei Testican-2 um ein sogenanntes „*part-time*“ Proteoglykan handelt (siehe 1.2), das in unterschiedlichen Geweben nur als Coreprotein vorliegt oder auch gebundene GAG-Ketten aufweist. Diese Hypothese war aber noch zu verifizieren.

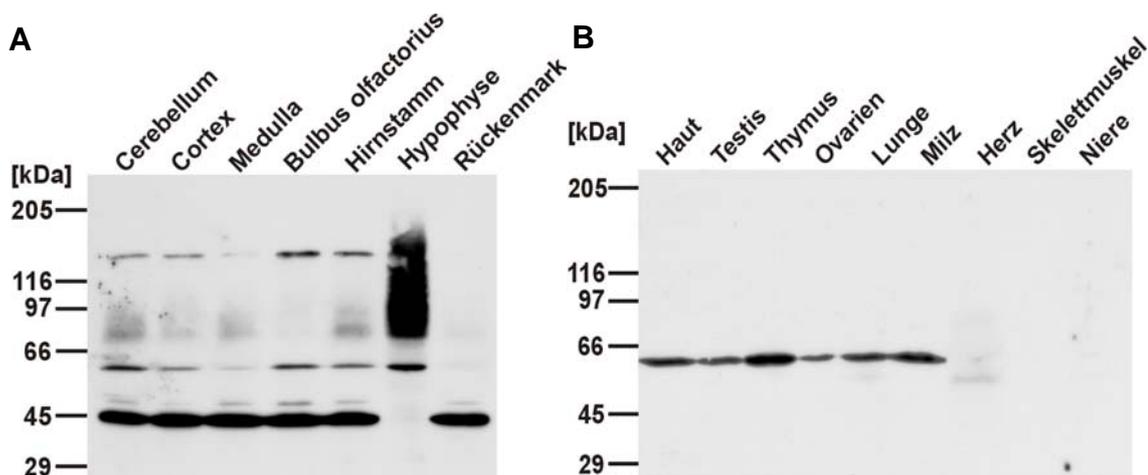


Abb. 2.4: Western-Blot-Analyse verschiedener Gewebeextrakte mit dem affinitätsgereinigten anti-Testican-2-Antikörper

A: Extrakte neuronaler Gewebe

B: Extrakte weiterer Organe

Verschiedene Gehirnsegmente bzw. neurale Gewebe wurden mit 5fachem Volumen Tris/EDTA-Puffer (**A**) und weitere Organe mit gleichem Volumen TBS-Puffer (**B**) extrahiert und zum Teil die Proteinmenge des resultierenden Extraktes ermittelt (neurale Gewebe). Je 200 µg (Hypophyse: 100 µg) (**A**) bzw. 20 µl (**B**) Gewebe wurden dann auf einem 4-15%igen SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen separiert, auf eine Membran transferiert und Testican-2 mit dem affinitätsgereinigten anti-Testican-2-Antikörper in einer Verdünnung von 1:50 nachgewiesen. Als Größenstandard wurde ein HMW-Marker verwendet.

Im Folgenden wurde versucht, die den verschiedenen Signalen in Gehirnextrakt entsprechenden Proteine aus Gehirnextrakt anzureichen. Aus einer größeren Menge Gehirngewebe wurden mit TBS/EDTA-Puffer Extrakt erstellt und zur Verhinderung von Proteolyse durch Zugabe von 8 M Harnstoff-Puffer auf eine Endkonzentration von 7 M Harnstoff gebracht. Der Extrakt wurde dann über eine Anionenaustauscher-Säule (DEAE-Matrix)

gegeben, gewaschen, mit einem Salzgradienten von 75-1000 mM Natriumchlorid (NaCl) in Gegenwart von 7 M Harnstoff eluiert und die resultierenden Fraktionen im Immuno-Blot mit dem anti-Testican-2-Antikörper analysiert (Abb. 2.5). Die resultierenden Western-Blots zeigten, dass die Testican-2-typische polydisperse Bande zwischen 80 und 120 kDa in einem NaCl-Konzentrations-Bereich von etwa 400-585 mM eluiert wurde (Abb. 2.5, Fraktionen 22-34). Auch verschiedene scharfe Banden wurden angereichert, wie Banden bei 45 kDa und 160 kDa (Abb. 2.5, Fraktionen 12-20/2-20), die bei einer Salzkonzentration von 100-380 mM zu eluieren waren.

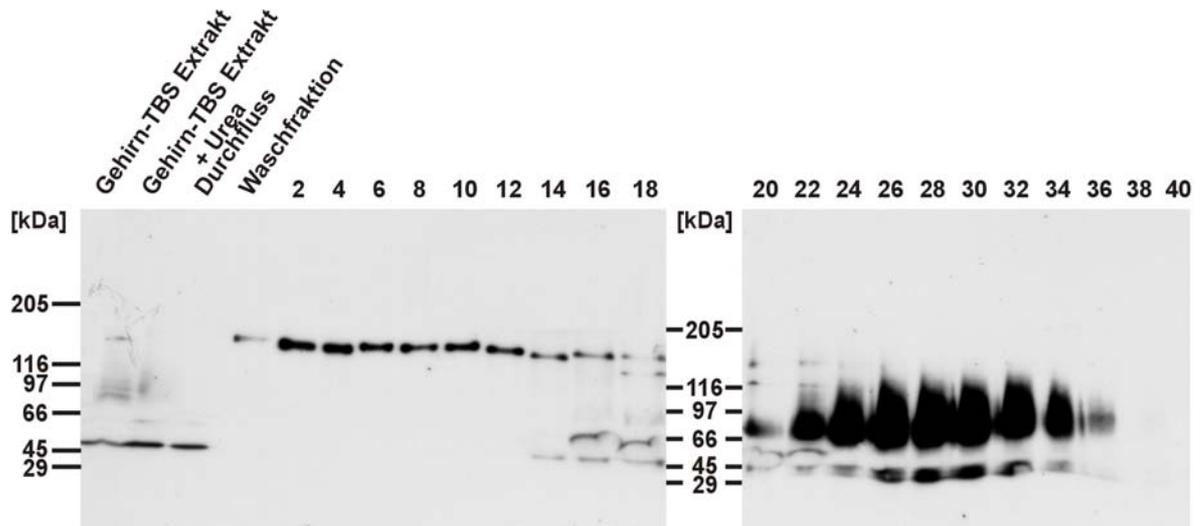


Abb. 2.5: Anreicherung von endogenem Testican-2 aus Gehirnextrakt mittels einer DEAE-Säule

Testican-2 wurde mit einer DEAE-Sephacel-Matrix aus Gehirnextrakt in Anwesenheit von 7 M Harnstoff angereichert, gewaschen und mit einem Salzgradienten von 75-1000 mM NaCl eluiert. Je 45 μ l ausgewählter Fraktionen wurden unter reduzierenden Bedingungen auf einem 4-15%igen SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit dem affinitätsgereinigten anti-Testican-2-Antikörper bei einer Verdünnung von 1:50 angefärbt.

2.1.3 Endogene Expression von Testican-2 in verschiedenen Zelllinien

Die cDNA von Testican-2 weist N-terminal einen Bereich mit 22 hydrophoben Aminosäuren mit einer Konsensus-Sequenz für eine Signalpeptidase auf (Computer-Programm: *SignalP V1.1*, [Nielsen et al., 1997]), der vermutlich als Signalpeptid fungiert und einen Transport von Testican-2 aus dem zellulären Raum heraus bewirkt. Da in der Testican-2-Sequenz keine weitere hydrophobe Region beobachtet werden kann, die typisch für eine Transmembran-Region wäre, wird Testican-2 vermutlich in den Extrazellulärraum sekretiert. Dies sollte mit Hilfe von Wildtyp-Zelllinien experimentell überprüft werden. Die Frage war zu klären, welche Zelltypen Testican-2 endogen exprimieren und in welcher Form (mit oder ohne GAG-Ketten) es gebildet wird. Dazu wurden Immuno-Blots mit Zellextrakten und gefällten serumfreien Zellkulturüberständen verschiedener Zelllinien mit dem affinitätsgereinigten anti-

Testican-2-Antikörper inkubiert (Abb. 2.6). Präzipitate der Zellkultur-Überstände von C2F3-Zellen (murine Myoblasten) und NG108-Zellen (Hybridzellen muriner Neuroblastomzellen und Gliomzellen aus Ratte) zeigten starke Signale im Western-Blot, wohingegen die Überstände von EBNA-293-Zellen (humane embryonale Nierenzellen), HaCaT-Zellen (humane Keratinozyten), PAM212-Zellen (murine Keratinozyten) und HT1080-Zellen (humane Fibrosarcomzellen) Testican-2-negativ war (Abb. 2.6-A). Das detektierte Signal bestand bei allen positiven Zelllinien aus einer polydispersen Bande zwischen 90 und 205 kDa und zwei breiten Banden von etwa 30-39 kDa und 40-49 kDa. Das apparente Molekulargewicht der oberen Bande entsprach in etwa dem der polydispersen Bande von rekombinantem Testican-2, die kleineren Banden könnten Abbauprodukte darstellen. Die Spezifität der Signale in den Kulturüberständen von C2F3- und NG108-Zellen konnte mittels Inhibition des affinitätsgereinigten anti-Testican-2-Antikörpers durch Vorinkubation mit rekombinantem Testican-2 verifiziert werden (Abb. 2.6-B). Western-Blot-Analyse der Extrakte dieser Zelllinien hingegen ergaben ein Signal für alle untersuchten Zelllinien in Form einer scharfen Bande bei etwa 65 kDa (Abb. 2.6-C). Da die Bande nur unzureichend inhibiert werden konnte (*nicht gezeigt*) und es zudem unwahrscheinlich war, dass alle Zellen Testican-2 endogen exprimieren, aber nur zwei Zelllinien das Proteoglykan auch sekretieren, handelte es sich bei dem in Zellextrakt detektierten Signal mit großer Wahrscheinlichkeit um eine Kreuzreaktivität gegenüber einem unbekanntem intrazellulären Protein.

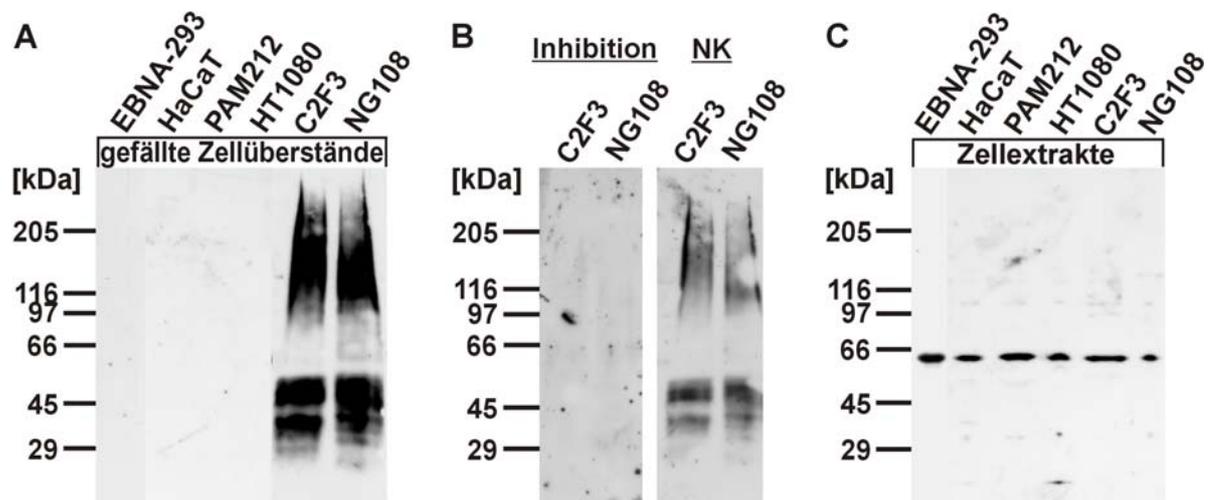


Abb. 2.6: Endogene Expression von Testican-2 in verschiedenen Zelllinien

Präzipitate serumfreier Zellkulturüberstände und Zellextrakte verschiedener Zelllinien wurden auf einem 4-15%igen SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Membran transferiert.

A: Western-Blot-Analyse der Zellüberstand-Präzipitate mit dem gereinigten anti-Testican-2-Antikörper mit einer Verdünnung von 1:75

B: Hemmung der Signale in den Zellüberstand-Präzipitaten durch Vorinkubation des gereinigten anti-Testican-2-Antikörper mit beiden Fraktionen des rekombinanten Testican-2 bei einem Mengenverhältnis von je 10/1 (Protein/Antikörper). Für die Negativkontrolle (NK) wurde der Antikörper parallel nur mit TBS-Puffer inkubiert. Die Antikörper-Verdünnung bei der Inhibition betrug 1:50.

C: Western-Blot-Analyse der Zellextrakte mit dem gereinigten anti-Testican-2-Antikörper mit einer Verdünnung von 1:75

2.1.4 Affinitätsreinigung des anti-Testican-2-Antikörpers in Kombination mit der vorherigen Abreicherung kreuzreagierender Antikörper

Zur Entfernung der Antikörper, die die Kreuzreaktivität gegenüber dem unbekanntem intrazellulären Protein hervorrufen, wurde das ungereinigte Testican-2-Antiserum erneut affinitätsgereinigt. Dabei wurden die kreuzreagierenden Antikörper zunächst mit Hilfe einer Sepharosesäule mit kovalent gebundenem EBNA293-Wildtyp-Zellextrakt abgereichert und dann die spezifischen Antikörper über eine Testican-2-Affinitätssäule angereichert.

Die Wahl der Zelllinie, deren Extrakt an die zur Abreicherung verwendeten Sepharosesäule gebundenen wurde, fiel auf EBNA-293-Zellen, da diese in allen bisherigen Untersuchungen keine Expression von Testican-2 und bei der Western-Blot-Analyse (*Abb. 2.6-C*) das stärkste kreuzreaktive Signal zeigten.

Die einzelnen Schritte der folgenden Affinitätsreinigung sind in *Abb. 2.7* schematisch dargestellt. Zur Überprüfung von Verlauf und Erfolg der Affinitätsreinigung wurde der Antikörper nach jedem Reinigungsschritt mittels Western-Blot-Analyse getestet (*Abb. 2.8*). Dabei fand für die Untersuchungen immer das gleiche Panel an Proben Verwendung. Für einen Teil der Proben wurden auch nach der erneuten Affinitätsreinigung weiterhin Testican-2-positive Signale erwartet, wie für murine Gewebeextrakte von Gehirn und Hypophyse, rekombinantes Testican-2 und gefällten Überstand bzw. Zellextrakt von mit einem Testican-2-Konstrukt transfizierten N2A-Zellen (murine Neuroblastomzellen). Vermutet wurde auch das Auftreten eines Signals im Präzipitat von NG108-Zellkultur-Überstand, da dieses Signal aufgrund der erfolgreichen Inhibition (*siehe Abb. 2.6-B*) als spezifisch angesehen werden konnte. Dahingegen wurden auch Proben eingesetzt, für die nach der neuen Reinigung des Antikörpers keine Signale mehr erwartet wurden. Dazu zählte EBNA-Zellextrakt, das zuvor die für unspezifisch erachtete Bande bei 65 kDa aufwies und anhand dessen der Erfolg der Abreicherung verfolgt werden sollte, aber auch Thymusextrakt, bei dem die Spezifität des zuvor detektierten Signals (*siehe Abb. 2.4*) aufgrund eines fehlenden Signals bei der Northern-Blot-Analyse [Vannahme et al., 1999] fraglich war. Außerdem war bei Proben, bei denen das Auftreten von Testican-2-Signalen erwartet wurde, zu verfolgen, ob bisher detektierte Banden eher ungewöhnlicher Größe, wie die distinkten Banden bei 45 und 130 kDa in Gehirnextrakt, verschwinden würden. Als Negativkontrolle wurde Nierenextrakt verwendet, da dieses Gewebe in allen bisherigen Untersuchungen keine Signale für Testican-2 aufwies.

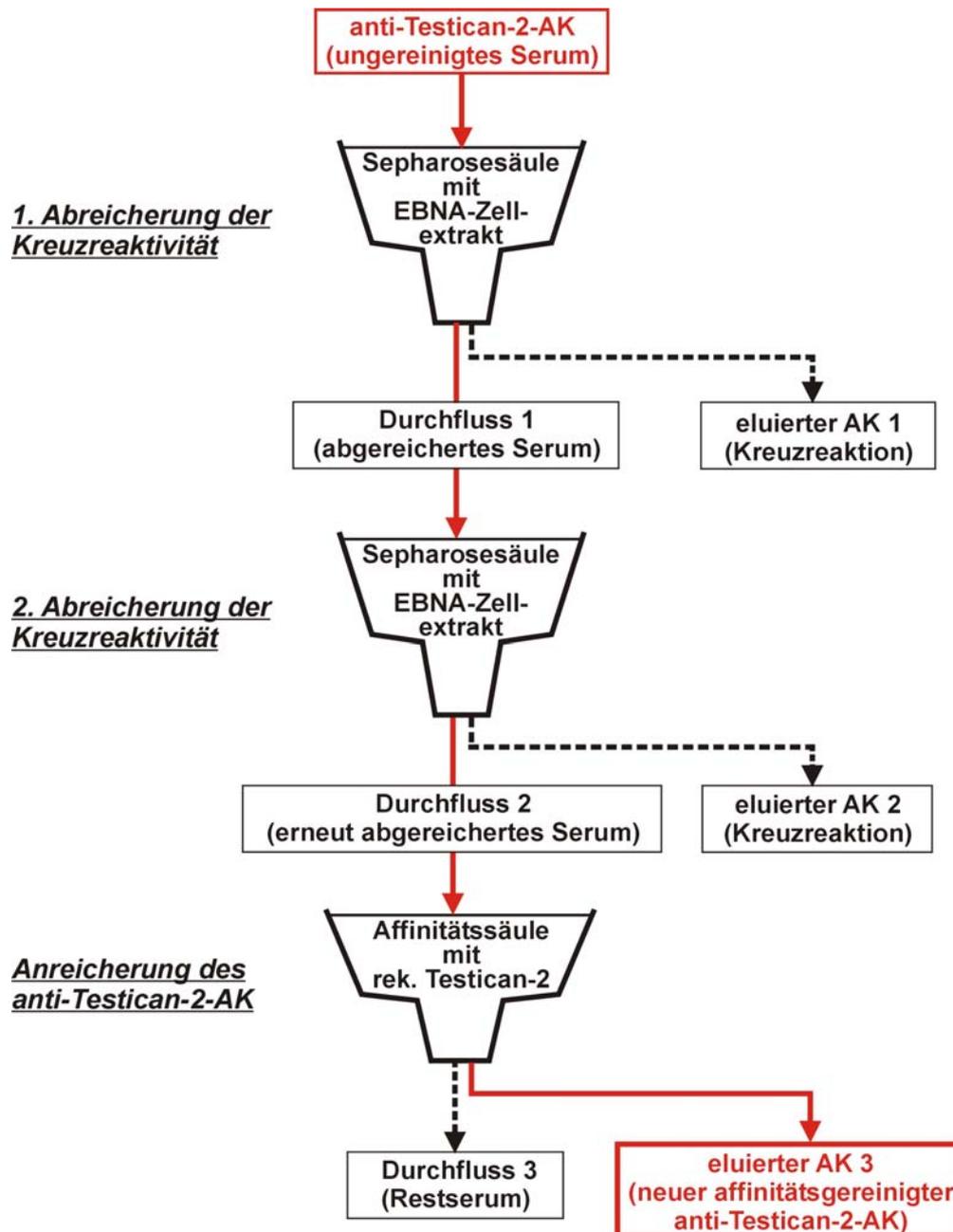


Abb. 2.7: Schema der Affinitätsreinigung des anti-Testican-2-Antikörpers mit vorheriger Abreicherung von mit Zellextrakt kreuzreagierenden Antikörpern mittels einer Sepharosesäule mit kovalent gebundenem EBNA-Zellextrakt

Die rote Linie verfolgt die Reinigung des anti-Testican-2-Antikörpers selbst, die gestrichelten schwarzen Linien deuten andere erhaltene Fraktionen an, die ebenfalls untersucht wurden (s. auch Abb. 2.8).

Auf dem ersten Immunoblot (A) von Abb. 2.8 ist die Reaktion der verschiedenen Proben mit dem ungereinigten anti-Testican-2-Antiserum zu erkennen. Für die aufgetragenen Proben konnte ein heterogenes und komplexes Bandenmuster detektiert werden, bei dem zwar für Hypophyse, rekombinantes Testican-2 und Präzipitat von Zellkulturüberstand transfizierter N2A-Zellen schon die Testican-2-typische polydisperse Bande zu erkennen war, aber auch noch viele unspezifische Signale detektiert wurden. Zum Abreichern der Kreuzreaktivität des anti-Testican-2-Antikörpers gegenüber Zellextrakten wurde das ungereinigte Antiserum

zunächst über die selbst angefertigte Sepharosesäule mit gekoppeltem EBNA-Zellextrakt gegeben. Die Western-Blot-Analyse des durchgeflossenen abgereicherten Serums zeigte immer noch die Testican-2-typische polydisperse Bande oberhalb von 80 kDa in Hypophysenextrakt, rekombinantem Testican-2 und N2A-Überstand. Doch es konnte auch eine deutliche Reduktion unspezifischer Banden beobachtet werden (*Abb. 2.8-C*), besonders für die Proben, für die, wie oben erläutert, kein Testican-2-positives Signal erwartet wurde (EBNA-Zellextrakt, Thymus- und Nierengewebeextrakt; *Abb. 2.8-C Spalten 7-9*). Die Inkubation einer weiteren Membran mit den von der „EBNA-Säule“ eluierten und folglich die Kreuzreaktivität hervorrufenden Antikörpern zeigte für verschiedene Proben ein komplexes Bandenmuster von distinkten Banden, die in Größe und Verteilung den für unspezifisch gehaltenen Signalen entsprachen (*Abb. 2.8-D*). Die stärksten Banden hatten dabei ein apparentes Molekulargewicht von etwa 45, 65, 115 und 130 kDa. Da diese Banden aber noch schwach im durchgeflossenen Antiserum detektiert werden konnten, wurde die Abreicherung noch einmal wiederholt. Der Test des zweiten Durchflusses und der wiederum von der „EBNA-Säule“ eluierten Antikörpern zeigte, dass die Kreuzreaktivität vollständig beseitigt werden konnte. Im nächsten Schritt wurden die Testican-2-spezifischen Antikörper aus dem Durchfluss der zweiten Abreicherung mittels einer Testican-2-Affinitätssäule angereichert. Wie die Western-Blot-Analyse des Durchflusses dieses letzten Säulengangs verdeutlichte (*Abb. 2.8-E*), erfolgte zwar keine vollständige Bindung der spezifischen anti-Testican-2-Antikörper, aber der Titer der angereicherten anti-Testican-2-Antikörper war für die weiteren geplanten Versuche ausreichend.

Die Untersuchung der angereicherten spezifischen anti-Testican-2-Antikörper mittels Western-Blot-Analyse (*Abb. 2.8-F*) wies in Bezug auf das Bandenmuster zum Teil einen deutlichen Unterschied zu den Signalen eines Immuno-Blots auf, der mit dem zuvor affinitäts-gereinigten anti-Testican-2-Antikörper angefärbt wurde (*Abb. 2.8-B*): Die für unspezifisch erachtete Bande des EBNA-Zellextraktes mit einem apparenten Molekulargewicht von 65 kDa wurde von dem erneut affinitätsgereinigten anti-Testican-2-Antikörper im Gegensatz zu dem zuvor affinitätsgereinigten Antikörper nicht mehr detektiert (*roter Kasten in Abb. 2.8-B/F*) und die Abreicherung der kreuzreagierenden Antikörper war demzufolge erfolgreich (*gestrichelter roter Kasten in Abb. 2.8-D*). Auch Banden in anderen Proben mit gleichem apparenten Molekulargewicht konnten nicht mehr detektiert werden und schienen, wie vermutet, ebenfalls unspezifisch zu sein, wie z.B. das Signal im Thymusextrakt.

Daneben wurden noch weitere Antikörper abgereichert, die hauptsächlich Banden bei 45 und 130 kDa detektierten. So zeigt die Western-Blot-Analyse von Gehirn- und Hypophysenextrakt nur noch die für eine Proteoglykan typische polydisperse Bande, die zuvor detektierten distinkten Banden waren nicht mehr zu sehen (*vgl. Abb. 2.8-B/F-Spuren 1 und 2*).

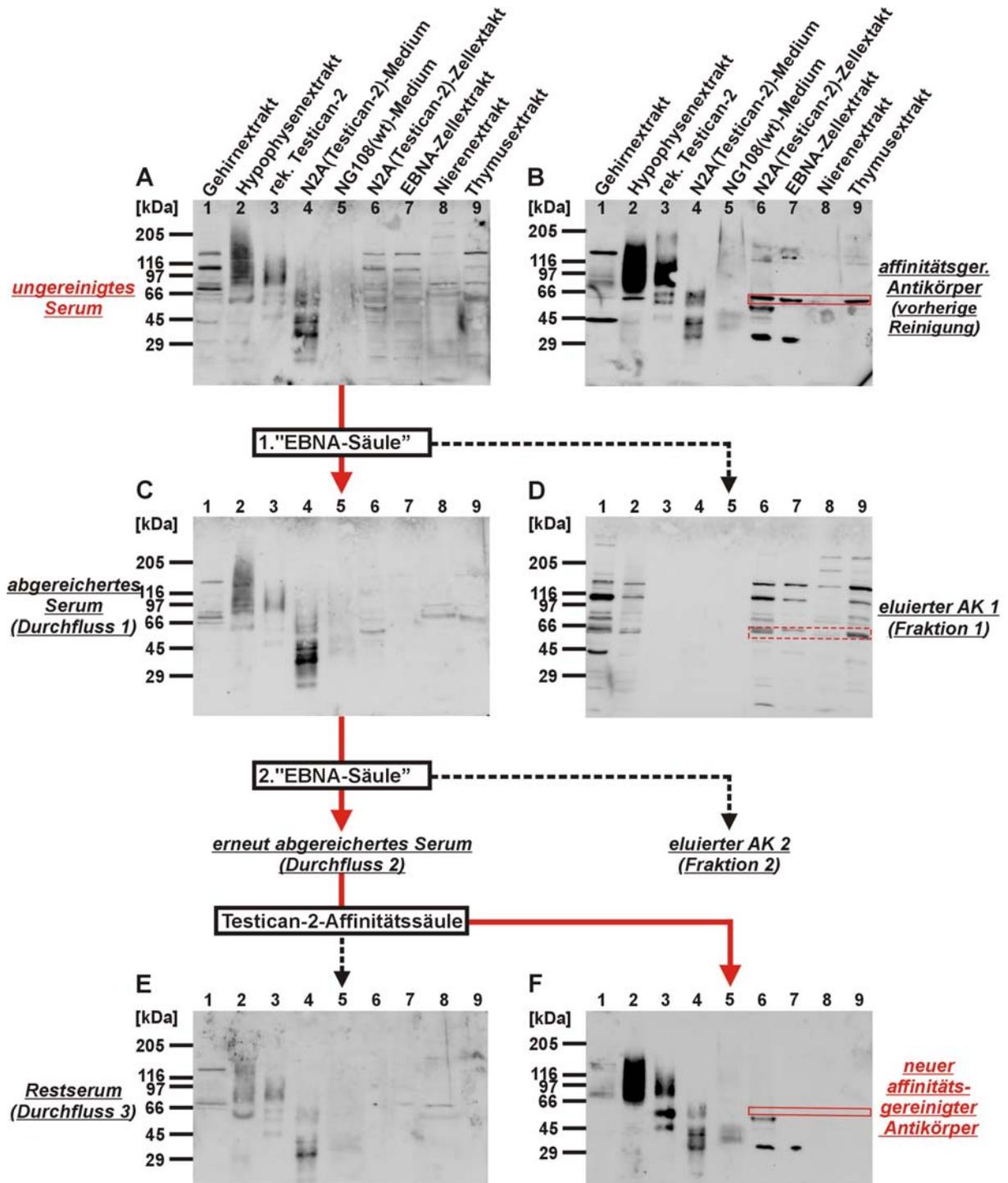


Abb. 2.8: Überprüfung der einzelnen Reinigungsschritte der erneuten Reinigung des anti-Testican-2-Antikörpers mittels Western-Blot-Analyse (Schema siehe Abb. 2.7)

TBS-Extrakte von Gehirn, Hypophyse, Niere und Thymus, Zellextrakte transfizierter N2A- und Wildtyp-EBNA-293-Zellen, gefällte Zellüberstände von transfizierten N2A- und Wildtyp-NG108-Zellen und rekombinantes Testican-2 wurden auf 4-15%igen SDS-Gelen unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt, auf Membranen geblottet und mit dem

A: ungereinigten Testican-2-Antiserum, Verdünnung 1:700

B: zuvor gereinigten anti-Testican-2-Antikörper, Verdünnung 1:75

C: ungereinigten anti-Testican-2-Antikörper nach der Abreicherung, Verdünnung 1:700

D: von der „EBNA“-Säule eluierten, kreuzreagierenden Antikörper, Verdünnung 1:75

E: durch die Testican-2-Affinitätssäule geflossenes Testican-2-Antiserum, Verd. 1:700

F: nach Abreicherung gereinigten anti-Testican-2-Antikörper, Verdünnung 1:50

angefärbt. Als Größenstandard wurde ein HMW-Marker verwendet.

Der rote Kasten kennzeichnet abgereicherte Kreuzreaktionen.

Die Signale von rekombinatem Testican-2 und von präzipitierten Überständen von NG108- und transfizierter N2A-Zellen blieben dahingegen unverändert (*Abb. 2.8-B/F-Spuren 3 bis 5*). (Das schwache Signal des NG108-Zellüberstandes konnte mit demselben Antikörper bei weiteren Western-Blot-Analysen noch deutlicher detektiert werden (*s. Abb. 2.13*.) Bei diesen Proben waren mit den abgereicherten, kreuzreagierenden Antikörper auch keine Signale zu detektieren (*Abb. 2.8-D-Spuren 3-5*). Der Zellextrakt der transfizierten N2A-Zellen zeigte mit dem abgereicherten Antikörper nur noch eine Bande bei 60 kDa, die wahrscheinlich das Coreprotein des in diesen Zellen hergestellten rekombinanten Testican-2 darstellt. Dazu ist zu erwähnen, dass diese Zelllinie mit einem Testican-2-Konstrukt ohne *Tag* transfiziert wurde und das exprimierte Coreprotein demzufolge kleiner ist als das von den transfizierten EBNA-293-Zellen exprimierte.

Bei der Zellextrakt-Bande von 29 kDa, die auch in *Abb. 2.8-B* auftritt (der Western-Blot wurde parallel gefärbt) handelte es sich um ein Artefakt dieser Immunfärbung, da das Signal in keiner weiteren Western-Blot-Analyse mehr detektiert werden konnte (*vgl. auch Abb. 2.6-A, Spur 1*). Somit hatte man durch diese erneute Affinitätsreinigung mit vorheriger Abreicherung kreuzreagierender Antikörper einen anti-Testican-2-Antikörper erhalten, der in Gewebe keine Kreuzreaktivität mehr zeigte.

Wie der zuvor affinitätsgereinigte anti-Testican-2-Antikörper, musste nun auch der neu affinitätsgereinigte anti-Testican-2-Antikörper weiter charakterisiert und hinsichtlich Kreuzreaktivität gegenüber der BM-40-Familie untersucht werden. Die Titerbestimmung ergab, dass der aus der neuen Affinitätsreinigung resultierende Antikörper einen deutlichen Titer gegenüber dem Coreprotein und der GAG-Form von Testican-2 zeigte, aber auch eine gewisse Kreuzreaktivität gegenüber Testican-1 und Testican-3. Diese war allerdings im Vergleich zu den Titern gegenüber den verschiedenen Testican-2-Formen mindestens um einen Faktor 10 geringer (*Abb. 2.9 und Tabelle 2.2*).

Protein	Titer	Protein	Kreuzreaktion
Testican-2 (67 kDa)	1 : 10.500	Testican-1	1 : 400
Testican-2 (80 kDa)	1 : 7.070	Testican-3 (60 kDa)	1 : 145
Testican-2 (beide)	1 : 4.150	Testican-3 (200 kDa)	1 : 230

Tab. 2.2: Zusammenstellung der in *Abb. 2.9* ermittelten Werte für Titer und Kreuzreaktivität des neu affinitätsgereinigten anti-Testican-2-Antikörpers

Die Werte für Titer und Kreuzreaktion ergeben sich aus der Antikörper-Verdünnung bei halbmaximaler Extinktion (gestrichelte Linien in *Abb. 2.9*).

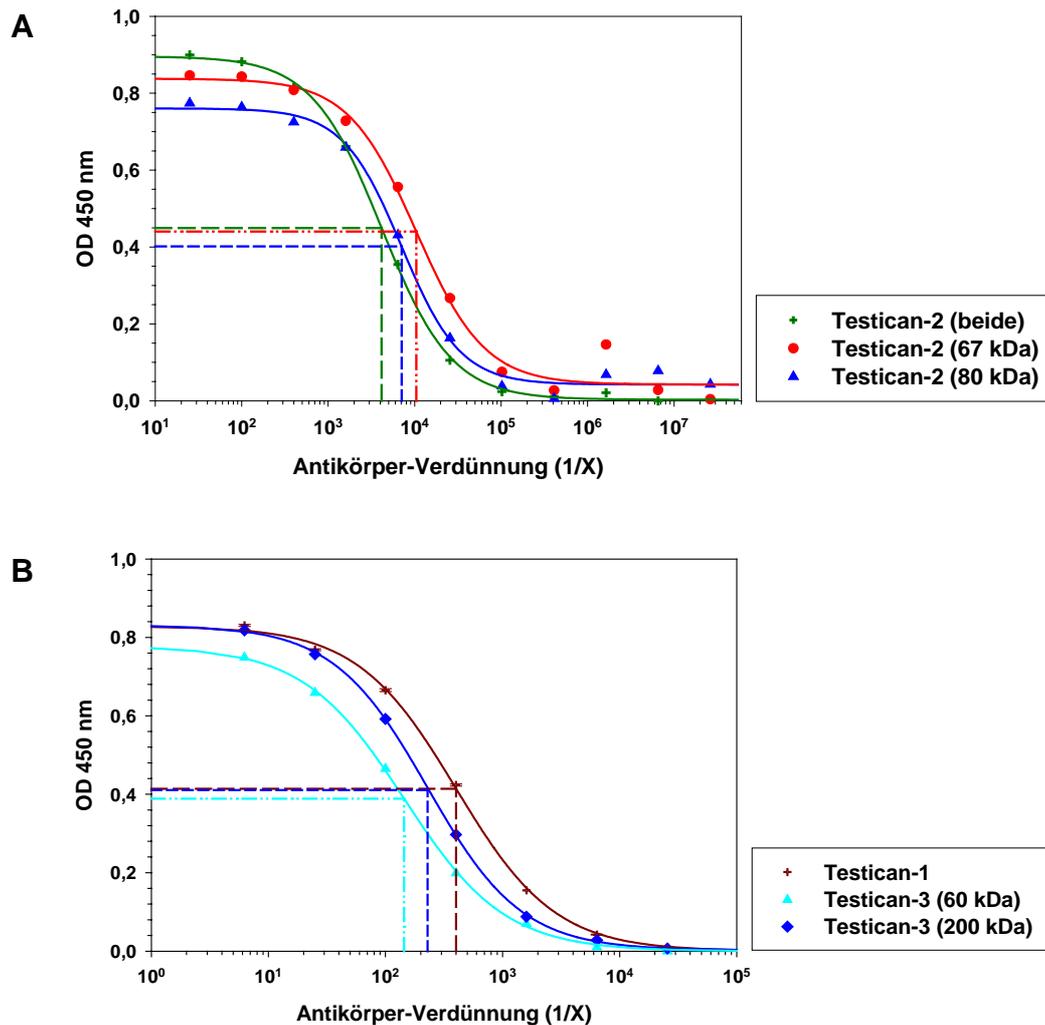


Abb. 2.9: Titer- und Kreuzreaktivitätsbestimmung des mit der neuen Reinigungsmethode gereinigten anti-Testican-2-Antikörpers mittels ELISA (siehe auch Tab. 2.2)

A: Titerbestimmung gegenüber dem Coreprotein von Testican-2 (67 kDa), der GAG-Form (80 kDa) von Testican-2 und einem Gemisch beider Formen (beide) mit einer Antikörper-Verdünnung von 1:25 bis 1:26.214.400

B: Bestimmung der Kreuzreaktivität gegenüber rekombinantem Testican-1 und der 60 kDa- bzw. der 200 kDa-Fraktion von rekombinantem Testican-3 (60/200 kDa) mit einer Antikörper-Verdünnung von 1:6,25 bis 1:25.600

Die bei einer Extinktion (OD) von 450 nm gemessenen Werte wurden halblogarithmisch gegen den eingesetzten Verdünnungsfaktor aufgetragen.

Die Analyse des Antikörpers auf Proben verschiedener rekombinanter Proteine (*Abb. 2.10*) ergab eine deutliche Spezifität des Antikörpers unter nativen Bedingungen (Slot-Blot): Hier ist nur für eine Auftragsmenge von 20 ng Protein eine ganz leichte Bande bei murinem Testican-1 und humanem SMOC1 zu detektieren. In Gegensatz dazu waren die spezifischen Signale von Testican-2 sehr deutlich zu sehen. Unter denaturierten, reduzierenden Bedingungen (Western-Blot-Analyse) hingegen war eine eindeutige Kreuzreaktivität gegenüber Testican-1 sichtbar.

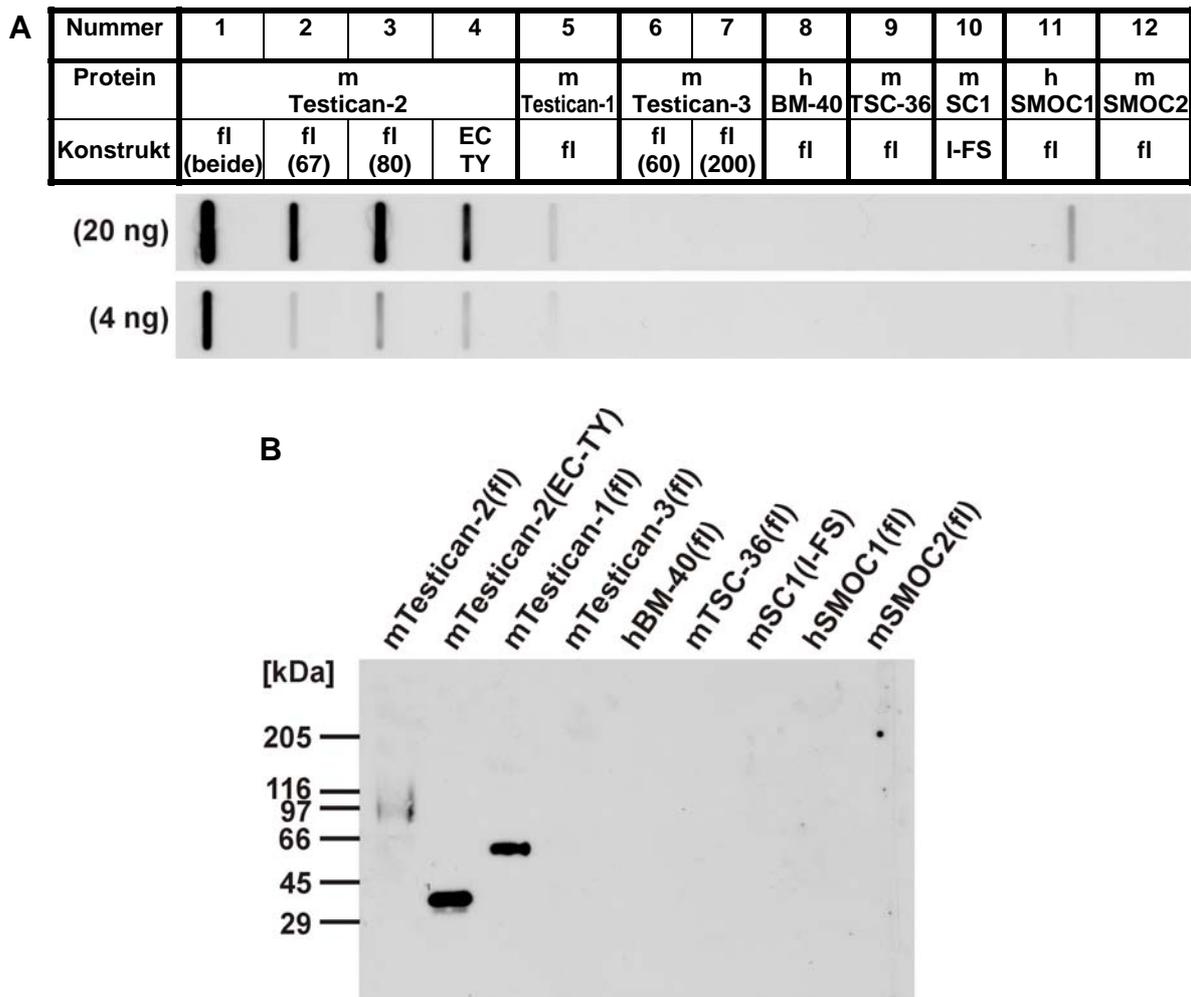


Abb. 2.10: Test von Spezifität und Kreuzreaktion des neu affinitätsgereinigten anti-Testican-2-Antikörpers gegenüber den Mitgliedern der BM-40-Familie

A: unter nativen Bedingungen in der Slot-Blot-Analyse

B: unter denaturierten Bedingungen in der Western-Blot-Analyse

Je 4 und 20 ng rekombinantes Protein wurden direkt auf eine Membran aufgebracht (A) und 10 ng der gleichen Proteine unter reduzierenden Bedingungen auf einem 4-15%igen SDS-Gel aufgetrennt und dann erst auf eine Membran transferiert (B). Die Membranen wurden mit dem neu affinitätsgereinigten anti-Testican-2-Antikörper mit einer Verdünnung von 1:75 inkubiert und die Signale mit einem geeigneten Zweitantikörper und Detektionssystem sichtbar gemacht. Als Größenstandard wurde ein HMW (high molecular weight)-Marker verwendet.

Der neu affinitätsgereinigte anti-Testican-2-Antikörper sollte auch für immunhistochemische Untersuchungen von Kryoschnitten verwendet werden. Obwohl bei dieser Anwendung weitgehend natives Protein detektiert wird, also keine Kreuzreaktivität gegenüber Testican-1 zu erwarten wäre, könnte die Fixierung des Gewebes zu Beginn der Färbung mit Paraformaldehyd einen denaturierenden Einfluss haben. Daher war die Frage zu klären, ob der Antikörper auch in Gegenwart von Paraformaldehyd eine Kreuzreaktivität gegenüber Testican-1 zeigen würde oder ob das Auftreten dieser Kreuzreaktivität nur auf die bei der Western-Blot-Analyse herrschenden Bedingungen begrenzt war. Deshalb wurde versucht, die bei der Fixierung von Protein in Gewebe mit Formaldehyd-Lösung auftretenden Konditionen in einem vereinfachten Versuch darzustellen.

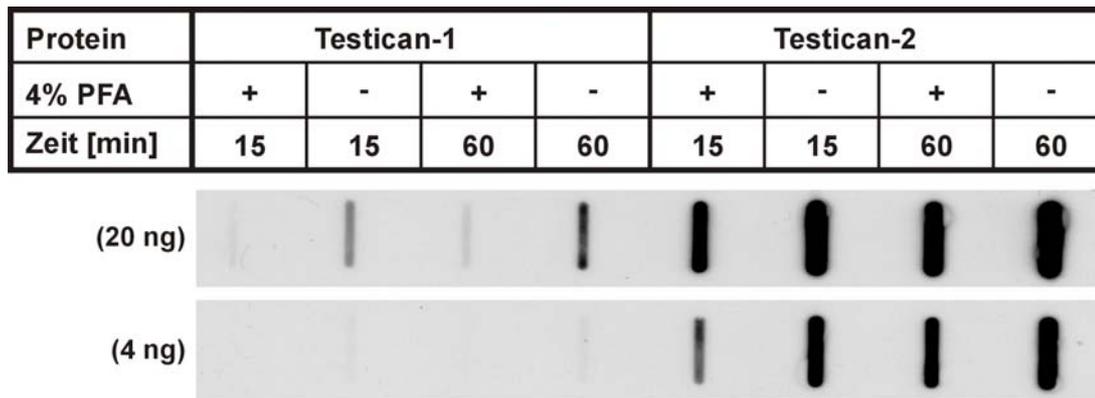


Abb. 2.11: Simulation der Bedingungen bei einer immunhistochemischen Färbung

4 bzw. 20 ng rekombinantes Testican-1 und Testican-2 wurden mit 8%iger SDS-Lösung und/oder 4%iger β -Mercaptoethanol-Lösung inkubiert und/oder erhitzt (A). Außerdem wurde die gleiche Menge rekombinantes Protein für 15 bzw. 60 min mit einer 4%igen PFA-Lösung in PBS inkubiert (B). Die so behandelten Lösungen wurden auf Membranen aufgebracht, mit dem neu affinitätsgereinigten anti-Testican-2-Antikörper mit einer Verdünnung von 1:50 inkubiert und mit einem geeigneten Antikörper und Detektionssystem sichtbar gemacht.

Dazu wurden je ein Aliquot rekombinantes Testican-1 und Testican-2 für 15 bzw. 60 Minuten mit einer 4%igen Paraformaldehyd(PFA)-Lösung in PBS-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Zu den entsprechenden Negativkontrollen wurden nur PBS-Puffer zugesetzt und diese danach ebenfalls bei den gleichen Bedingungen inkubiert. Wie in *Abb. 2.11* deutlich zu sehen ist, verringerte die Zugabe von PFA die Signalstärke sowohl von Testican-1 als auch von Testican-2. Dabei wurden die Signale für Testican-1 so schwach, dass sie nahezu nicht mehr detektierbar waren, während Testican-2 auch nach der Inkubation mit PFA-Lösung immer noch sehr deutliche Signale zeigte. Aus dem Ergebnis dieses Experiments konnte man schließen, dass bei immunhistochemischen Färbungen mit dem neu gereinigten anti-Testican-2-Antikörper keine Kreuzreaktivität gegenüber Testican-1 zu erwarten und der Antikörper folglich ausreichend spezifisch für nachfolgende immunhistochemische Untersuchungen war. Das Ergebnis, dass auch die längere Inkubation (60 min) die Kreuzreaktivität des Antikörpers gegenüber Testican-1 nicht steigerte, machte auch einen späteren Einsatz des Antikörpers für die Analyse von Paraffin-Schnitten möglich.

Um den Antikörper für Western-Blot-Analysen unter reduzierenden Bedingungen verwenden zu können, musste er zuvor mit rekombinantem Testican-1 gehemmt werden. Das Titrieren der für die Hemmung erforderlichen Menge an rekombinantem Testican-1 ergab, dass schon 1 ng Protein ausreichte, um die Kreuzreaktivität von 10 ng Antikörper nahezu vollständig zu entfernen (*Abb. 2.12*). Zur Sicherheit wurde für die Inhibition die doppelte Menge an Testican-1 verwendet, also 2 ng Protein für 10 ng Antikörper.

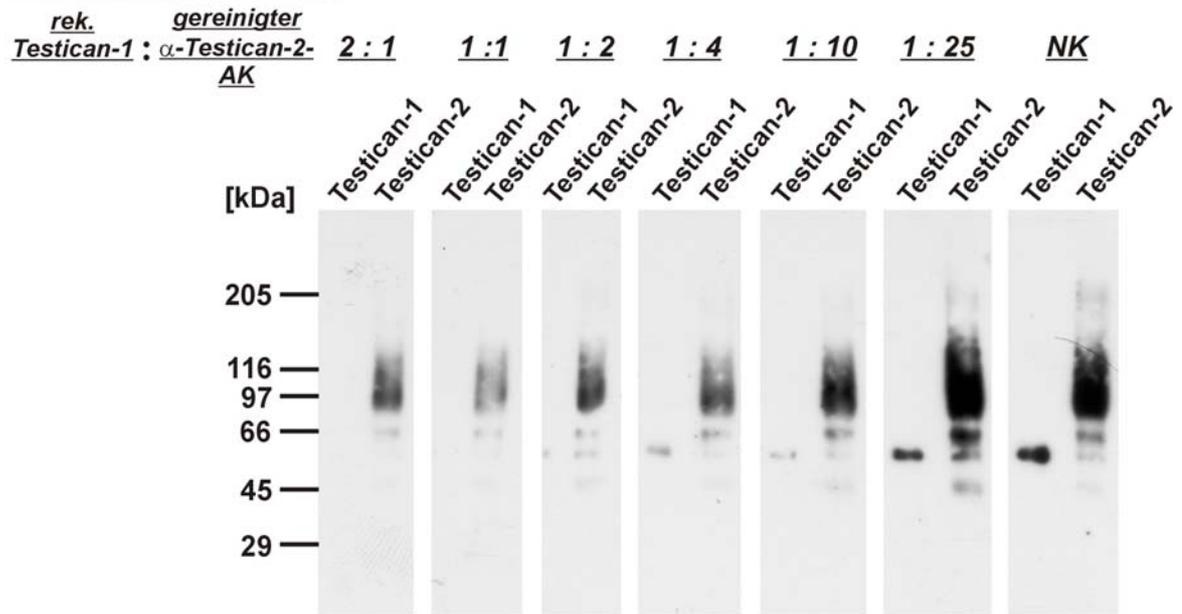
Verhältnis bei der Hemmung

Abb. 2.12: Bestimmung der für die Hemmung des affinitätsgereinigten anti-Testican-2-Antikörpers in der Western-Blot-Analyse erforderliche Menge an rekombinantem Testican-1

Rekombinantes Testican-1 und Testican-2 wurden auf einem 4-15%igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die Membran wurde in Streifen geschnitten und die verschiedenen Streifen mit dem neu affinitätsgereinigten anti-Testican-2-Antikörper nach dessen Hemmung mit rekombinantem Testican-1 inkubiert. Das bei der Hemmung eingesetzte Verhältnis von Antikörper und rekombinantem Testican-1 ist in der Abbildung über den Western-Blots angegeben. Für die Negativkontrolle (NK) wurde der Antikörper nur mit TBS-Puffer inkubiert.

2.2 Charakterisierung der Glykoform und Verteilung von Testican-2 in Gewebe

Nach der erneuten Affinitätsreinigung des anti-Testican-2-Antikörpers mit vorheriger Abreicherung kreuzreagierender Antikörper, war der Antikörper nun bereit für den Einsatz in weiteren Untersuchungen. Dabei galt es, die Ergebnisse der zuvor mit dem anti-Testican-2-Antikörper der ersten Affinitätsreinigung durchgeführten Experimente zu überprüfen und die Verteilung von nativem Testican-2 im Gewebe weiter zu untersuchen.

Da Testican-2 auf Paraffinschnitten nur unzureichende Signale zeigte, mussten für die immunhistochemischen Färbungen Kryoschnitte verwendet werden, obwohl diese im Vergleich zu Paraffinschnitten einen schlechteren Morphologieerhalt aufweisen, was zum Teil die Zuordnung der Signale zu bestimmten Strukturen erschwerte.

2.2.1 Endogene Expression von Testican-2 in verschiedenen Zelllinien

Zunächst wurde die Suche nach Testican-2 exprimierenden Zelllinien, die in Kapitel 2.1.3 mit dem anti-Testican-2-Antikörper der vorherigen Affinitätsreinigung begonnen wurde, fortgeführt. Dazu erfolgte eine Western-Blot-Analyse von serumfreien Zellkulturüberständen verschiedener Zelllinien (*Abb. 2.13-A*). Etablierte Zelllinien dreier Zelltypen zeigten eine endogene Expression von Testican-2: Neurone (N2A, N18TG2), Myoblasten (C2F3) und Zellen, die aus der Medulla der Nebenniere stammen (PC12). Auch NG108-Zellen, eine Hybrid-Zelllinie aus Neuroblastom- und Gliomzellen zeigten eine polydisperse Bande. Da aber eine reine Glioma-Zelllinie (C6) keine Testican-2-positiven Signale aufwies, rührt das Signal vermutlich vom neuronalen Anteil der Zellen her. Embryonale Nierenzellen (EBNA), Fibroblasten (WI26) und Keratinocyten (HaCaT) wiesen keine Signale auf. Als Größenvergleich wurde Zellüberstand von mit einem Testican-2-Konstrukt transfizierten N2A-Zellen aufgetragen. Das von den N2A-Zellen rekombinant exprimierte Testican-2-Protein zeichnet sich, wie schon erwähnt, durch das Fehlen eines *Tags* aus und läuft im Gel daher etwas niedriger als das von EBNA-Zellen rekombinant exprimierte Protein.

Bei allen Testican-2-positiven Zelllinien war eine polydisperse Bande zu erkennen, die in Abhängigkeit von dem Herkunftsgewebe unterschiedlich hoch verlief. So hatte die Bande der PC12-Zellen ein höheres apparentes Molekulargewicht als die Bande von neuronalen Zellen (N2A und N18TG2). Das bei den Myoblasten beobachtete Signal erstreckte sich sogar bis zu noch höheren Werten. Zusätzlich waren bei allen positiven Zellüberständen mehrere Banden zwischen 30 und 45 kDa zu beobachten. Nun trat die Frage auf, ob es sich dabei um durch Enzyme im Zellüberstand entstandene Abbauprodukte oder sekretierte Testican-2-Fragment handelte. Um diese Frage zu klären, wurde auf eine konfluente Platte mit Wildtyp-PC12-Zellen serumfreies Medium gegeben, der konditionierte Zellüberstand zu verschiedenen

Zeitpunkten wieder entnommen und damit eine Kinetik erstellt. Die Auswertung der Überstände mittels Western-Blot-Analyse zeigte deutlich, dass die besagten Banden von Beginn an auftraten (Abb. 2.13-B). Falls es sich also um Abbauprodukte handeln sollte, müsste der Abbau intrazellulär oder außerhalb der Zelle recht schnell (innerhalb von 6 h) erfolgen. Proteolyse nach Gewinnung des serumfreien Zellkulturüberstandes wurde durch Zugabe von Proteaseinhibitoren und sofortige Ethanol-fällung verhindert.

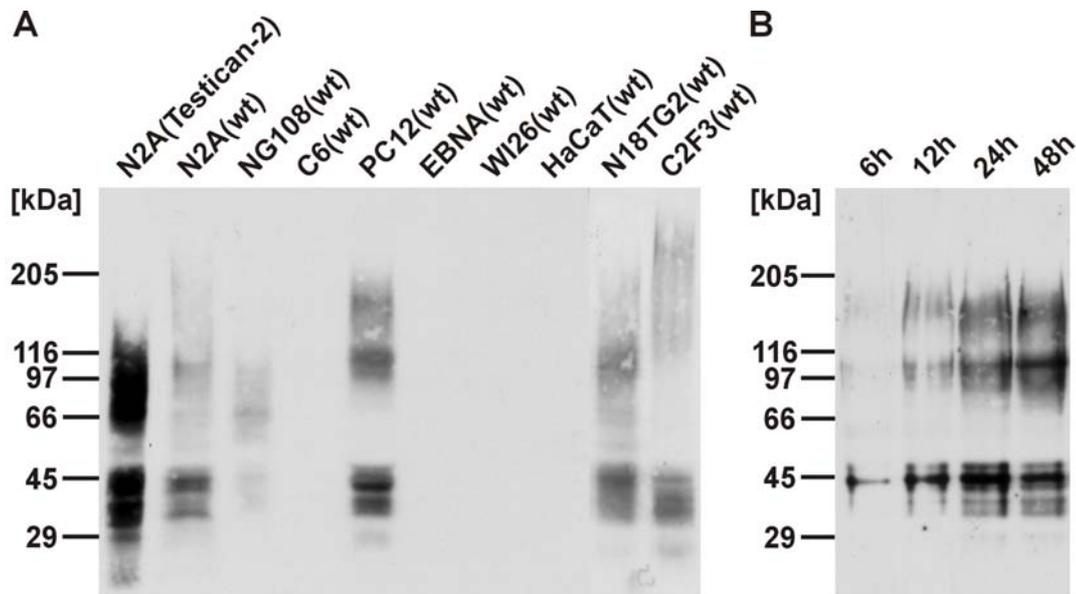


Abb. 2.13: Endogene Expression von Testican-2 in verschiedenen Zelllinien.

A: Untersuchung verschiedener Zelllinien hinsichtlich endogener Expression von Testican-2.

B: Kinetik der Proteolyse von endogenem Testican-2 aus PC12-Zellen.

Je 1 ml serumfreier Zellkulturüberstand verschiedener Zelllinien bzw. zu verschiedenen Zeitpunkten (6-48 h) entnommene Zellkulturüberstände von PC12-Zellen wurde mittels TCA-Fällung (A) bzw. mit Ethanol (B) präzipitiert. Die Proben wurden auf einem 4-15%igen SDS-Gel aufgetrennt und mit dem affinitätsgereinigten, mit Testican-1 präinkubiertem anti-Testican-2-Antikörper bei einer Verdünnung von 1:50 einer Western-Blot-Analyse unterzogen.

Nähere Informationen zu den Zelllinien s. 4.1.4.

2.2.2 Testican-2 in der adulten Maus

2.2.2.1 Nervengewebe

Wie zuvor erwähnt, konnte die mRNA von Testican-2 mittels *in situ*-Hybridisierung in verschiedenen Gehirnregionen der Maus detektiert werden und schien dort neuronalen Ursprungs zu sein [Vannahme et al., 1999]. Auch wurden neuronale Zelllinien gefunden, die endogen Testican-2-Protein exprimieren (s. Abb. 2.13). Nun sollte die Verteilung des Proteins in Gehirn untersucht werden. Da es sich bei Testican-2 aufgrund der Proteinsequenz und der Ergebnisse von 2.2.1 *in vivo* um ein extrazelluläres Protein handelt [Vannahme et al., 1999], könnten Sekretions- und Depositionsort unterschiedlich sein.

Immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass das Testican-2-Protein analog zu den mRNA-Daten eine weite Verteilung im Gehirn aufwies. Testican-2-spezifische Signale

konnten sehr deutlich in Perikaryon und Axon und zum Teil auch in den Dendriten größerer Neuronen detektiert werden, wie z. B. in den Mitralzellen des Bulbus olfactorius (*Abb. 2.14-A*), den Pyramidalzellen von Cortex und Hippocampus (*Abb. 2.14-B und -C*) sowie den Purkinje-Zellen des Cerebellums (*Abb. 2.14-D*). Diese Zellgruppen gehören zu den sogenannten „Projektionsneuronen“, die sich durch ein besonders langes Axon auszeichnen und deren Aufgabe es ist, Informationen aus einem begrenzten Gebiet heraus zu weiter entfernt liegenden Arealen und Kerngebieten zu übertragen. So reichen z.B. die Axone großer Pyramidalzellen des Cortex z.T. bis zum Hirnstamm bzw. Rückenmark [Zilles und Rehkämper, 1998].

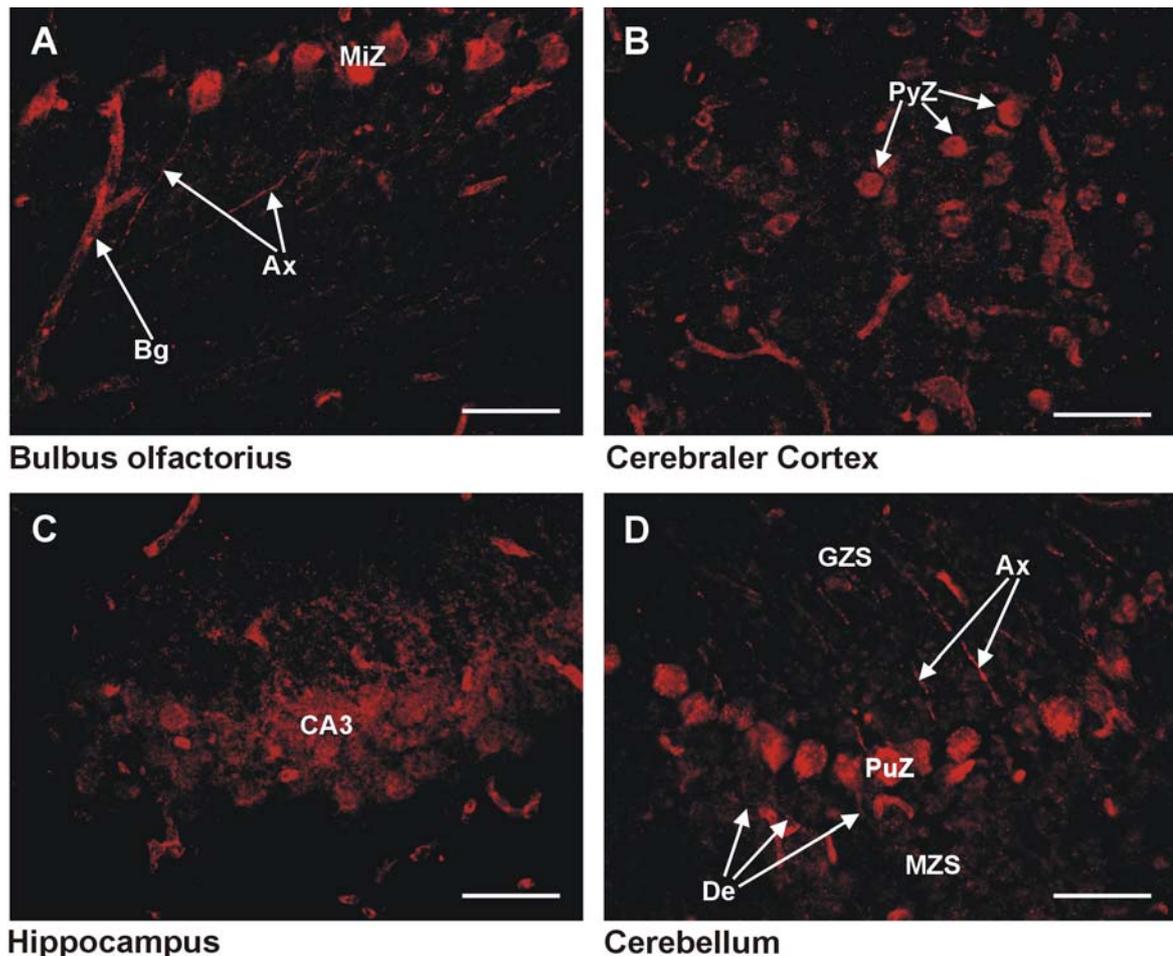


Abb. 2.14: Lokalisation von Testican-2 in verschiedenen Gehirnbereichen einer adulten Maus

Bar=50 µm

A: Bulbus olfactorius; Ax=Axon, Bg=Blutgefäße, MiZ=Mitralzellschicht

B: Cerebraler Cortex; PyZ=Pyramidalzellen

C: Hippocampus; CA3=Hippocampusfeld CA3

D: Cerebellum; Ax=Axon, De=Dendriten, GZS=Granulärzellschicht, MZS=Molekularzellschicht, PuZ=Zellen

Zusätzlich zu den gefärbten Neuronen waren in allen Gehirnbereichen auch deutliche Signale der Blutgefäße zu erkennen (*Abb. 2.14-A*). (Da die Maus vor der Präparation mit Puffer perfundiert wurde, konnte es sich bei den Signalen nicht um eventuell in Blut vorliegendes und abgelagertes Testican-2 handeln.) Das übrige Gehirngewebe zeigte eine schwache diffuse Färbung, die, wie sich später herausstellte, nur in neuronalem Gewebe detektiert wurde.

Obwohl Testican-2 nachweislich ein sekretiertes Proteoglykan darstellt, erschien die neuronale Färbung im Gehirn eher zellulär. Um die Frage zu klären, ob Testican-2 intra- oder extrazellulär vorliegt, wurden mit dem anti-Testican-2-Antikörper primäre Hippocampuszellen mit und ohne Permeabilisierung der Zellmembran mittels Detergenz angefärbt (Abb. 2.15; Frau Dr. Witter, Institut für Anatomie, Universität zu Köln). Eine Beeinträchtigung der Zellmembranstruktur durch Fixierung der Zellen konnte durch Verwendung Sucrose-haltiger Fixierungslösung verhindert werden, da in Anwesenheit von Sucrose das Gleichgewicht des osmotischen Drucks innerhalb und außerhalb der Zelle erhalten bleibt. Obwohl die Pyramidalzellen unter beiden Bedingungen analog zur Lokalisation im Gewebe sowohl in Perikaryen als auch in Neuriten positive Signale für Testican-2 zeigten, waren auch Unterschiede zwischen den Färbungen mit und ohne Permeabilisierung der Zellen zu erkennen. So war die Färbung ohne Permeabilisierung insbesondere im Bereich des Zellkerns schwächer, während nach der Permeabilisierung der Zellkörper durchgehend gefärbt war, was sowohl auf eine intrazelluläre als auch eine extrazelluläre Lokalisation von Testican-2 hindeutete.

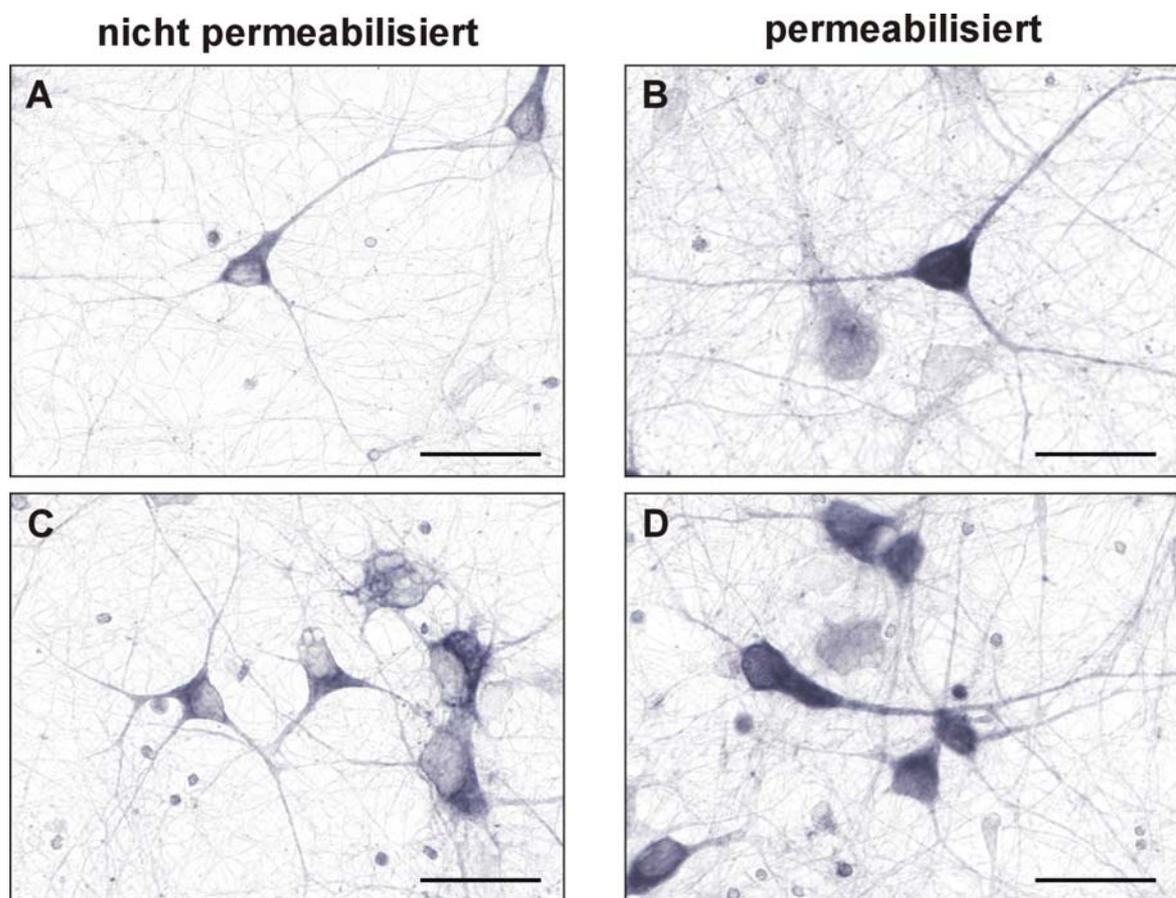


Abb. 2.15: Lokalisation von Testican-2 in primären Hippocampuszellen

durch Inkubation der Zellen mit dem affinitätsgereinigten anti-Testican-2-Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 und Nachweis der Signale mittels DAB-Färbung; Bar=50 μ m

A, C: Färbung ohne vorherige Permeabilisierung

B, D: Färbung mit vorheriger Permeabilisierung mittels Detergens

[Diese Färbung wurde von Frau Dr. Witter im Institut für Anatomie der Universität zu Köln durchgeführt.]

Neben der Färbungen im ZNS waren auch Signale im peripheren Nervensystem zu detektieren. Als Beispiel ist hier die immunhistochemische Färbung eines den Oberschenkelmuskel durchziehenden peripheren Nervs gezeigt. Es waren deutliche, aber unterschiedlich starke Signale der Nervenfasern zu erkennen, die aus peripheren Axonen und Schwann-Zellen aufgebaut sind (Abb. 2.16). Ob neben der Axone auch die sie umgebenden Schwann-Zellen eine schwache Testican-2-Färbung zeigten, konnte anhand der vorliegenden Daten nicht genau bestimmt werden.

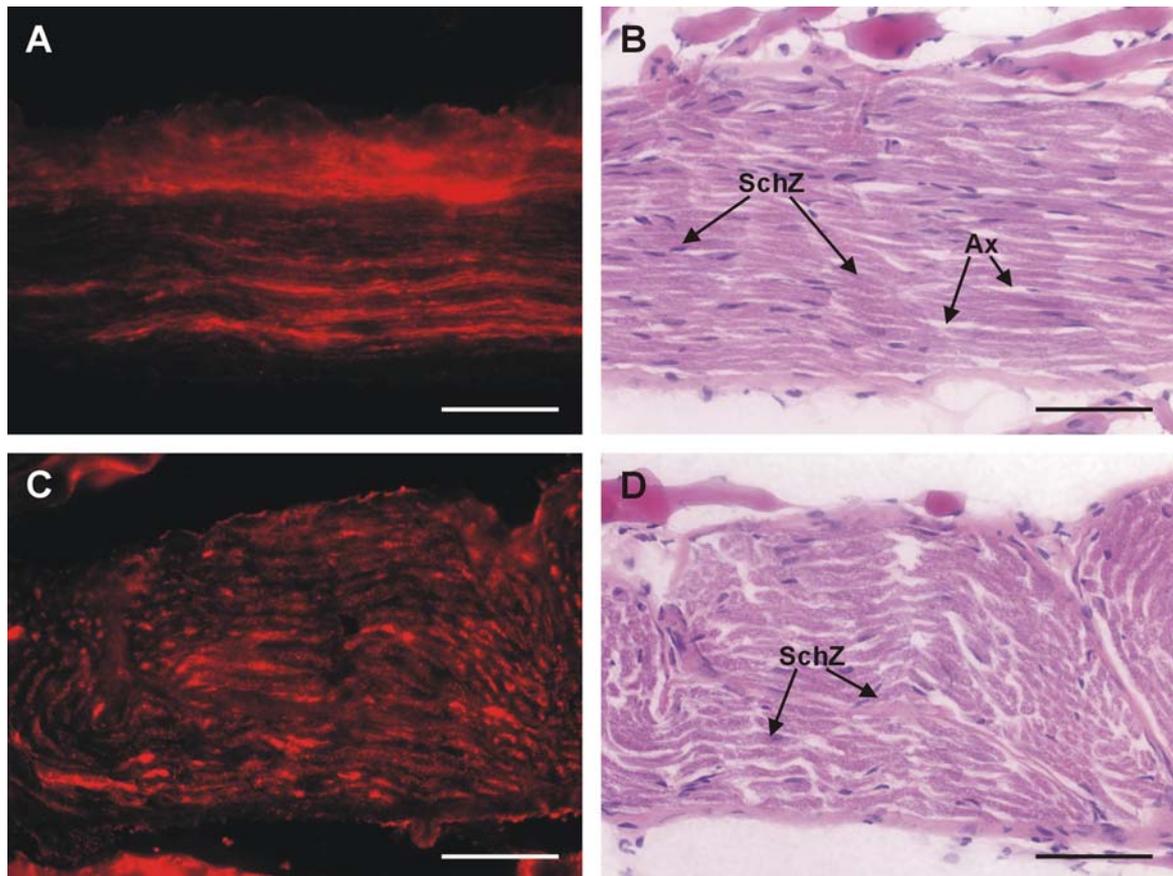


Abb. 2.16: Lokalisation von Testican-2 im PNS am Beispiel eines den Muskel durchziehenden Nerven

A/B: sagittaler Schnitt durch einen Nervenstrang

C/D: transversaler Schnitt durch einen Nervenstrang

A, C: anti-Testican-2-Antikörper; **B, D:** Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

Ax=Axon, SchZ= Schwann-Zelle; Bar=50 μ m

2.2.2.2 Endokrine Drüsen

Außer den hier erwähnten neuronalen Geweben wurde ein weiteres, dem ZNS zugehöriges Organ hinsichtlich der Expression von Testican-2 untersucht: die Hypophyse. Die Hypophyse ist aus Adeno- und Neurohypophyse aufgebaut, die in der embryonalen Entwicklung aus verschiedenen Strukturen entstehen und in Bezug auf Morphologie und Funktion deutliche Unterschiede zeigen. Die Adenohypophyse bildet eine eigenständige endokrine Drüse, in der zahlreiche Effektor- und Steuerhormone gebildet werden. Die Pars intermedia liegt an der Grenze zwischen den beiden Hypophysenstrukturen und wird funktionell der Adenohypo-

physe zugeordnet, obwohl ihre Zellen vorwiegend andere Hormone synthetisieren. Sie nimmt eine Sonderstellung ein, da nicht alle Lebewesen diesen Teil der Hypophyse besitzen. Während die Pars intermedia beim Menschen kaum ausgebildet ist [Junqueira und Carneiro, 1996], nimmt sie bei der adulten Ratte 10 % des Gesamtvolumens der Hypophyse ein [Diepen, 1962]. Sie produziert hauptsächlich das Melatonin-stimulierende Hormon (MSH), das Einfluss auf die Melanozyten nimmt. Dieses Hormonpeptid wird aber auch in verschiedenen Gehirnregionen produziert und hat auch Effekte auf das ZNS. In der Pars intermedia konnte eine sehr starke, gleichmässige Färbung beobachtet werden. Die Signale der Adenohypophyse waren ebenfalls stark, aber mehr vereinzelt bzw. punktiert. Die Neurohypophyse wird hauptsächlich von marklosen Nervenfasern gebildet, deren Zellkörper im Hypothalamus liegen und die große Mengen an hypothalamischer Effektorhormone speichert, selbst aber keine Hormone produziert. Sie zeigte im Verhältnis eine schwächere Testican-2-Färbung (*Abb. 2.17-A/B*).

Funktionell gehört die Hypophyse zu den endokrinen Organen. Diese bilden zusammen mit dem Nervensystem die zentralen Regelsysteme des Körpers und entstehen in der embryonalen Entwicklung wie das Nervensystem aus dem Neuroektoderm. Sie zeichnen sich morphologisch im Gegensatz zu den exokrinen Drüsen durch das Fehlen von Ausführungsgängen aus und sekretieren verschiedene Hormone. Die immunhistochemische Untersuchung verschiedener weiterer endokriner Drüsen ergab zum Teil eine starke Expression von Testican-2: Das Proteoglykan konnte in der Medulla der Nebenniere, die Adrenalin-, und Noradrenalinbildende Zellen enthält, lokalisiert werden, während der Nebennieren-Cortex Testican-2-negativ war (*Abb. 2.17-C/D*). Das korreliert auch mit dem im Zellüberstand von PC12-Zellen detektiertem Signal (*s. Abb. 2.13*), da diese Zellen der Medulla der Nebenniere entstammen. Die Testican-2-Signale der Medulla schienen ubiquitär und nicht auf einen Zelltyp beschränkt zu sein. (Es ist zu bemerken, dass aus technischen Gründen für Immunfluoreszenz- und HE-Färbung in diesem Fall keine Nachbarschnitte verwendet werden konnten.)

Auch der endokrine Anteil des Pankreas, die Langerhans-Inseln, zeigte ein positives Signal für Testican-2, wohingegen das Proteoglykan im exokrinen Pankreas-Anteil nicht detektiert werden konnte (*Abb. 2.17-E/F*). Die Langerhans-Inseln bestehen zum größten Teil aus Insulin-produzierenden Zellen (β -Zellen), die eher in der Mitte, und einem kleineren Anteil an Glukagon-produzierenden Zellen (α -Zellen), die eher in der Peripherie der Inseln zu finden sind. Aus dieser Tatsache sowie nach Vergleich mit geeigneten histochemisch angefärbten Präparaten [Gude et al., 1982] konnte man schließen, dass eine Färbung sowohl der Insulin- als auch der Glukagon-produzierenden Zellen zu detektieren war.

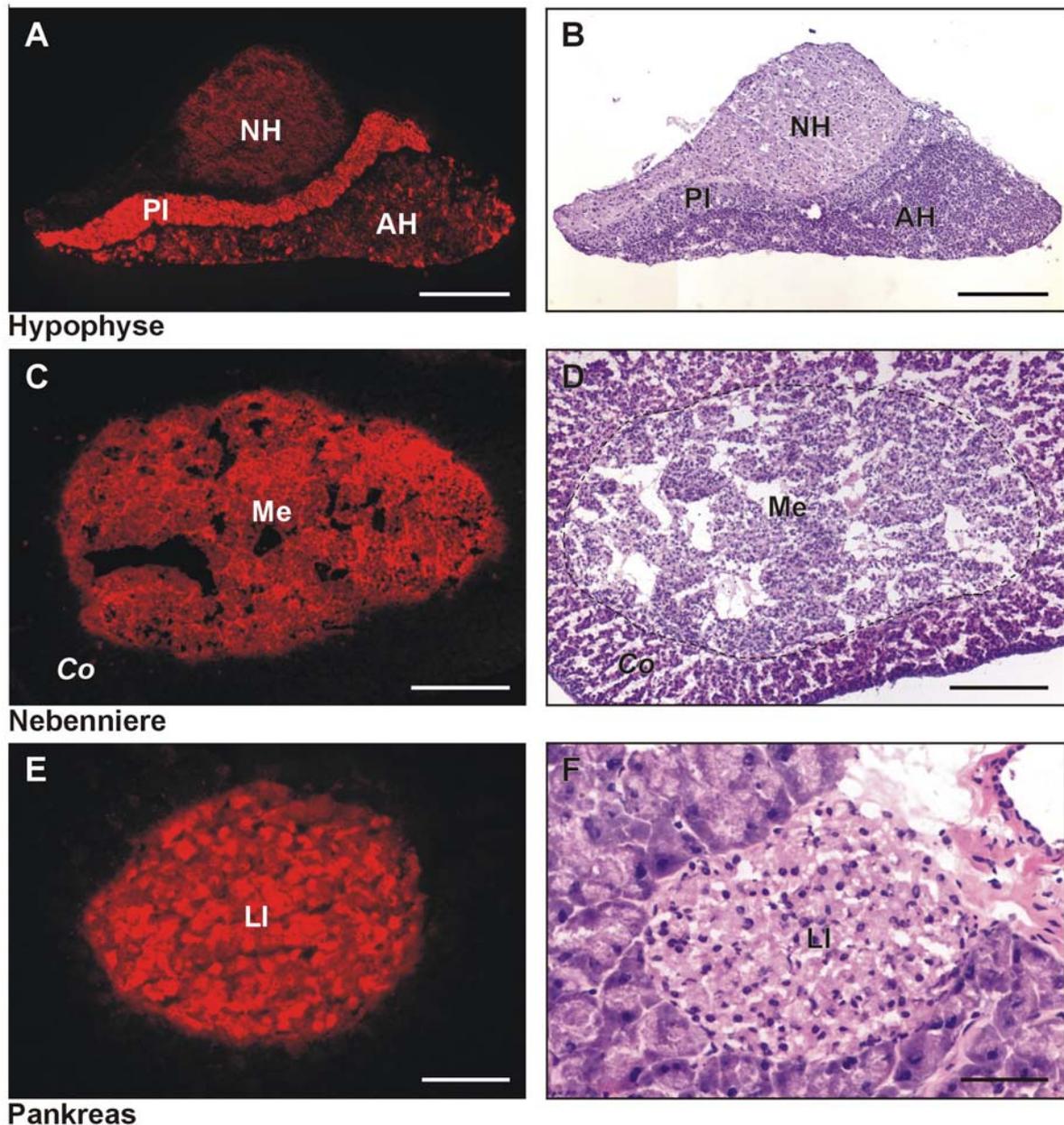


Abb. 2.17: Lokalisation von Testican-2 in endokrinen Drüsen

A, B: Hypophyse; AH=Adenohypophyse, NH=Neurohypophyse, PI=Pars intermedia. Bar=200 μ m

C, D: Nebenniere; Co=Cortex, Me=Medulla. Bar=200 μ m

E, F: Pankreas; LI=Langerhans-Iseln. Bar=50 μ m

A, C, E: anti-Testican-2-Antikörper; **B, D, F:** Hämatoxylin-Eosin-Färbung

In den Gonaden konnten ebenfalls distinkte, Testican-2-spezifische Signale detektiert werden. In Testis (*Abb. 2.18*) war in vielen Hodenkanälchen eine schwache punktierte Färbung zu erkennen, die sich vom Rand, wo sie etwas stärker auftrat, bis zur Mitte zog. Dabei könnte es sich um an Sertoli-Zellen assoziierte Signale handeln. Diese Zellen dienen zur Ernährung und dem Schutz der Samenzellen und synthetisieren spezifische Proteine wie Hormone, Wachstumsfaktoren und Bestandteile der Basalmembran. Das medial gelegene Signal könnte den Spermatisden und Spermien zugeordnet werden. Die eindeutige Lokalisation der Signale ist jedoch nicht möglich. Eine sehr deutliche Färbung war um die Hodenkanälchen herum in der Lamina limitans zu finden (*Abb. 2.18-B*). Wie durch Kolokalisation mit dem Basalmembran-

Protein Nidogen-1 gezeigt werden konnte, ist Testican-2 dort mit der Basalmembran assoziiert (Abb. 2.18-C/D). In Ovarien konnte nur ein sehr schwaches Signal in der Thekanschicht detektiert werden (*nicht gezeigt*).

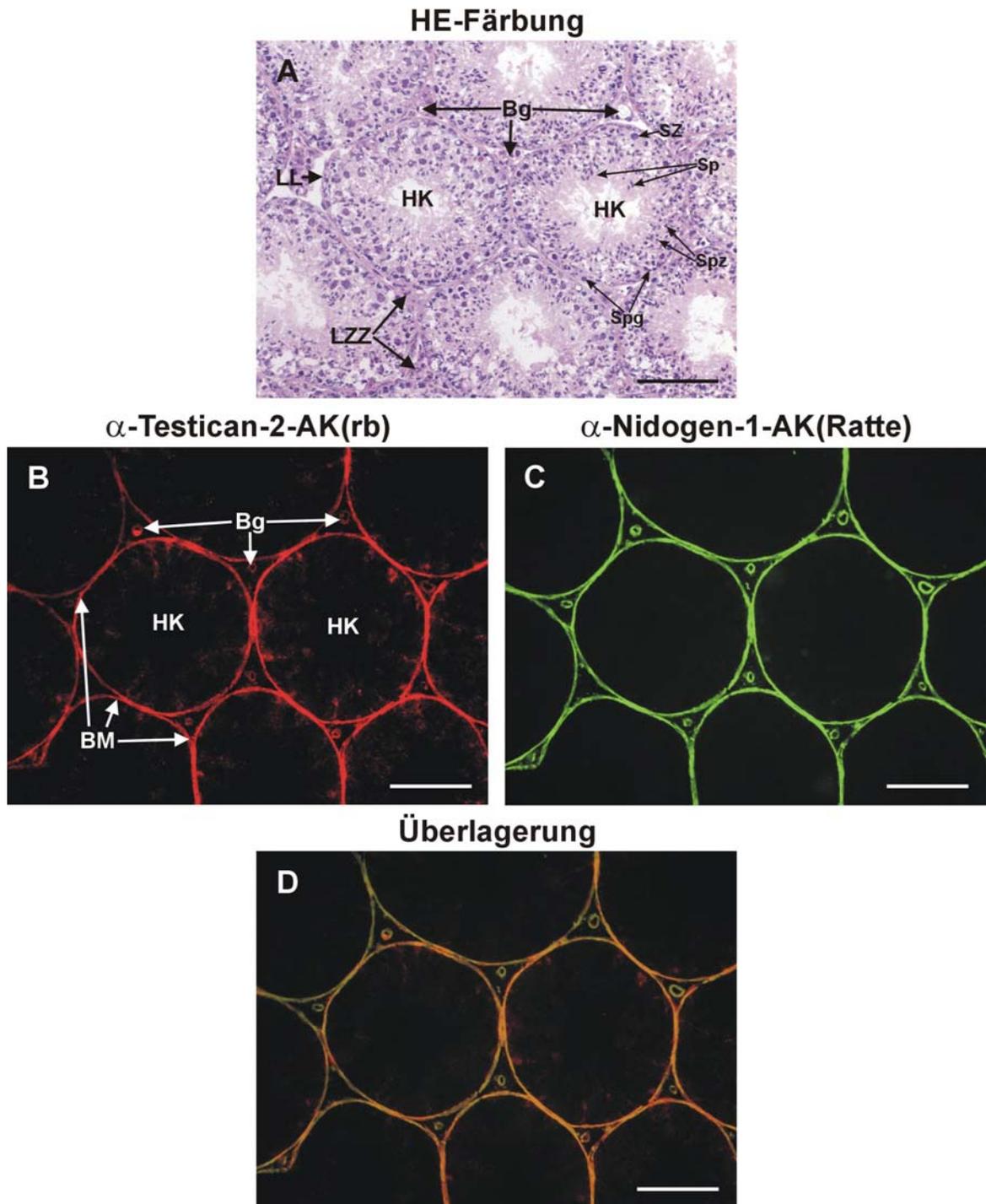


Abb. 2.18: Lokalisation von Testican-2 in Testis

A: Hämatoxylin-Eosin-Färbung

B: gefärbt mit dem affinitätsgereinigten anti-Testican-2-Antikörper, Verd. 1:75

C: gefärbt mit einem monoklonalen anti-Nidogen-1-Antikörper aus Ratte, Verd. 1:50 (s. 4.1.3)

D: Überlagerung der Färbungen von Testis mit dem anti-Testican-2-Antikörper (B) und dem anti-Nidogen-1-Antikörper (C)

Bg=Blutgefäße, BM=Basalmembran, HK=Hodenkanal, LL=Lamina limitans, LZZ=Leydig-Zwischenzellen, Sp=Spermatiden und Spermien, Spg=Spermatogonie, Spz=Spermatozyt, SZ=Sertoli-Zellen; Bar=100 μ m

2.2.2.3 Weitere Testican-2-positive Gewebe

Immunhistochemische Untersuchungen weiterer größerer Organe zeigten außerdem noch ein starkes Signal von Testican-2 in der Lunge. Auf die genaue Lokalisation von Testican-2 wird aber im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen, da es nicht möglich war, Lungen-schnitte guter morphologischer Qualität zu erstellen. (Die Färbungen wurden auf Gefrier-schnitten (Kryoschnitten) mit bei der Einbettung unfixiertem Gewebe durchgeführt.)

Darüber hinaus konnten vereinzelte, punktierte Signale in Haut und Thymus detektiert werden, die nicht näher zugeordnet werden konnten.

2.2.3 Analyse der Glykosylierung von Testican-2

Nach Analyse der räumlichen Verteilung von Testican-2 in der Maus mittels Immun-histochemie galt das Interesse nun der Art der posttranslationalen Modifikationen und dabei insbesondere der Glykoformen (GAGs, N-Glykane) von Testican-2 in den verschiedenen Geweben. Darüber hinaus bot die für diese Zwecke verwendete Western-Blot-Analyse die Möglichkeit, die mittels Immunhistochemie ermittelten Daten zu verifizieren.

Für erste Hinweise auf die Art der Glykosylierung in Gewebe wurde das Bandenmuster von Testican-2 mit Hilfe der Western-Blot-Analyse untersucht. Dazu wurden Extrakte von neuro-lem Gewebe (Gehirn, Hypophyse, Rückenmark) und anderer Organe unter reduzierenden Bedingungen auf SDS-Gelen aufgetrennt und mit dem affinitätsgereinigten Testican-2-Antikörper angefärbt. Da das Gehirn aus mehreren, funktionell unterschiedlichen Bereichen besteht und Testican-2 mittels Immunhistochemie in vielen verschiedenen Gehirnabschnitten detektiert werden konnte, wurden einige Gehirnsegmente getrennt extrahiert und in der Western-Blot-Analyse einzeln untersucht. Das Testican-2-Bandenmuster war in den Extrakten aller Gehirnsegmente in etwa gleich. In jedem untersuchten Bereich war eine polydisperse Bande zu detektieren, deren untere Grenze mit etwa 70 kDa etwas unterhalb des Signals der rekombinanten GAG-haltigen Testican-2-Fraktion (etwa 80 kDa) verlief und nur bis etwa 120 kDa deutlich zu erkennen war. Oberhalb dieses Molekulargewichts wurde die Bande schwächer und war noch bis etwa 200 kDa sichtbar (*Abb. 2.19*). Die Ähnlichkeit des Banden-musters von Testican-2 bei den verschiedenen Gehirnsegmenten deutete darauf hin, dass die Glykoform von Testican-2 aller Gehirnregionen der adulten Maus in etwa gleich war. Eine Bande gleichen Verlaufs konnte auch in Rückenmark-Extrakt detektiert werden. Analog zu den immunhistochemischen Daten zeigte der Hypophysenextrakt ein stärkeres Signal, das von etwa 70 bis 200 kDa reichte und damit ebenfalls ein ähnliches apparentes Molekulargewicht wie die polydisperse Bande des rekombinanten Testican-2 aufwies (*Abb. 2.19*).

Es wurden auch Extrakte nicht neuronaler Gewebe getestet. Dabei waren starke Signale in Nebenniere und Lunge zu detektieren (*Abb. 2.19*), wohingegen bei Leber, Milz, Niere, Herz, Testis und Thymus keine Banden detektiert werden konnten (*nicht gezeigt*). Dies korrelierte weitgehend mit den zuvor dargestellten immunhistochemischen Daten (*vgl. Abb. 2.14 bis 18*).

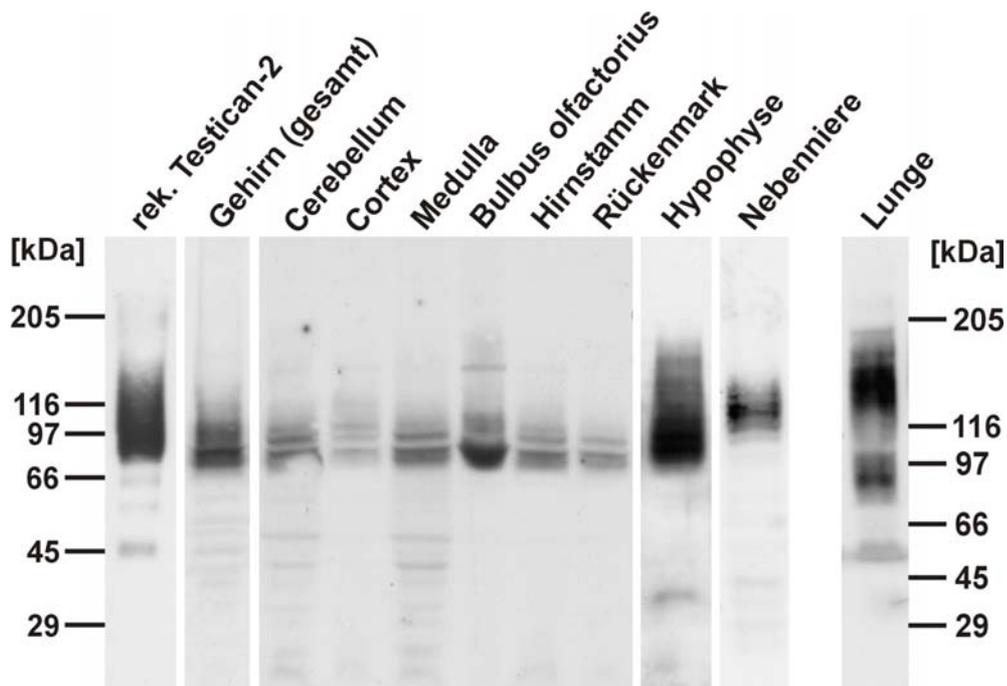


Abb. 2.19: Western-Blot-Analyse von Extrakten verschiedener Gewebe

Verschiedene Gehirnsegmente und neuronale sowie andere Gewebe wurden mit fünffachem Volumen Tris/EDTA-Puffer (Hypophyse, Gehirn, Nebenniere) oder TBS/Harnstoff-Puffer (Lunge) extrahiert, abzentrifugiert und die Proteinmenge des Überstandes ermittelt. 8 μ g rekombinantes Testican-2, 100 μ g Hypophysen- und Lungenprotein, 150 μ g Protein aus Nebenniere und je 200 μ g Protein von Gehirngewebe wurden auf 4-15%igen SDS-Gelen unter reduzierenden Bedingungen separiert, auf Membranen transferiert und Testican-2 mit dem affinitätsgereinigten anti-Testican-2-Antikörper (Verdünnung 1:40) nach Präinkubation mit rekombinatem Testican-1 zur Inhibition der Kreuzreaktivität nachgewiesen. Als Größenstandard wurde ein HMW-Marker verwendet.

Während bei neuralem Gewebe das Laufverhalten im Immunoblot gleich erschien, konnte man bei der Betrachtung von Testican-2 in nicht-neuralen Geweben deutliche Unterschiede erkennen. In allen Testican-2-positiven Geweben war zwar eine polydisperse Bande zu erkennen, es schien sich also in allen Geweben um eine GAG-haltige Form von Testican-2 zu handeln, das apparente Molekulargewicht der diffusen Bande unterschied sich aber in den unterschiedlichen Geweben. Das Signal der Nebenniere war nicht so ausgedehnt wie das von Testican-2 in neuralem Gewebe bzw. von rekombinatem Testican-2. Es begann erst bei einem apparenten Molekulargewicht von 95 kDa und endete bei etwa 130 kDa. Ein insgesamt höheres Molekulargewicht der polydispersen Bande konnte zuvor auch bei Zellüberstand von aus der Nebenniere stammenden PC12-Zellen beobachtet werden (*s. Abb. 2.13*). Beim Lungenextrakt waren zwei breite und diffuse Banden zu erkennen (70-97 kDa und 115-200 kDa), die ineinander übergingen.

Um einen Hinweis zu erhalten, ob Testican-2 mit extrazellulären Strukturen verbunden ist oder in freier löslicher Form vorliegt, wurden fraktionelle Gehirnextrakte mit unterschiedlichen Puffern erstellt (*s. Abb. 2.20*). Zur Analyse eventueller Unterschiede der Verteilung während der Mausentwicklung wurde parallel auch das noch nicht vollständig entwickelte Gehirn einer jungen Maus (P6) fraktionell extrahiert.

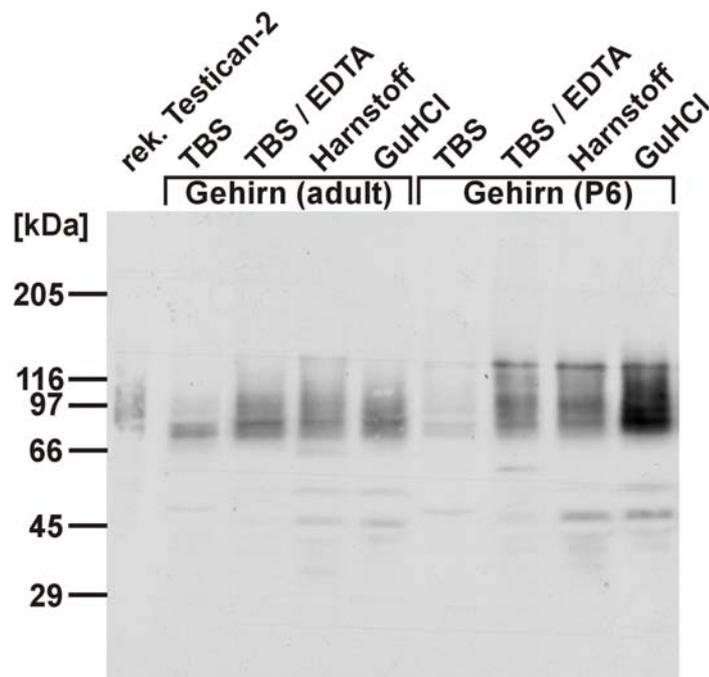


Abb. 2.20: Western-Blot-Analyse von mit verschiedenen Puffern fraktionell erstellten Gehirnextrakten zweier Entwicklungsstadien

Gehirngewebe von zwei Zeitpunkten der Mausentwicklung wurde einer fraktionellen Extraktion mit TBS-, TBS/EDTA-, TBS/Harnstoff- und Guanidiniumhydrochlorid(GuHCl)-Puffer unterzogen. 20 µg rekombinantes (rek.) Testican-2 und 200 µg Gehirngewebe wurden auf einem 4-15%igen SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und Testican-2 mit dem affinitätsgereinigten, mit Testican-1 präinkubiertem anti-Testican-2-Antikörper bei einer Verdünnung von 1:40 nachgewiesen. Die Guanidiniumextrakte mussten vor der SDS-PAGE mit Ethanol gefällt werden. Als Größenstandard wurde ein HMW-Marker verwendet.

Mit TBS/EDTA-Puffer konnte Testican-2 in deutlichen Mengen aus Gewebe extrahiert werden, ebenso mit Harnstoff- und Guanidiniumhydrochlorid-Puffer. Das deutet darauf hin, dass es sowohl einen löslichen als auch einen fester gebundenen Anteil von Testican-2 in Gewebe gibt. Dabei fällt auf, dass die Testican-2-Bande bei der jungen Maus in dem Guanidiniumhydrochlorid-Extrakt deutlich stärker ist als die anderen detektierten Banden. Außerdem ist bei der jungen Maus bei etwa 120 kDa eine scharfe Bande zu erkennen.

2.2.3.1 GAG-Analyse

Zur Bestimmung von Aufbau bzw. Art der Glykosaminoglykan(GAG)-Ketten von Testican-2, wurde Testican-2 mit verschiedenen Lyasen verdaut und das Resultat mittels Western-Blot analysiert. Dabei wurde sowohl rekombinantes als auch natives Testican-2 mit den Enzymen behandelt, um festzustellen, ob beide Formen die gleichen GAG-Ketten aufweisen.

Für die GAG-Analyse von rekombinantem Testican-2 wurde sowohl aus Zellüberstand transfizierter humaner embryonaler Nierenzellen (EBNA-293) aufgereinigtes Testican-2 als auch rekombinant von Zellen einer Maus-Fibroblasten- (LMTK⁺) und murinen Neuroblastoma-Zelllinie (N2A) exprimiertes Protein verwendet.

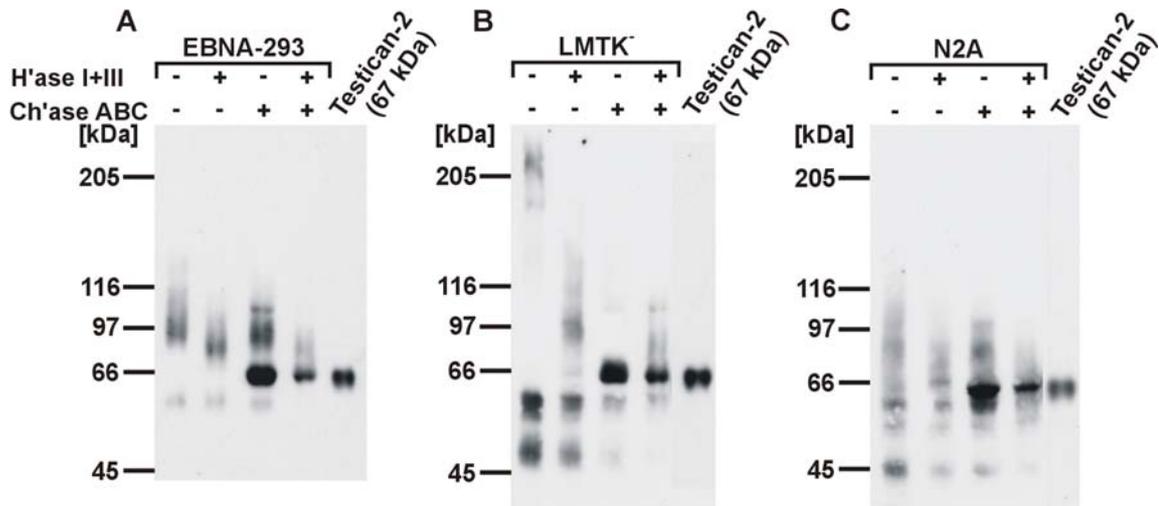


Abb. 2.21: Analyse der GAG-Ketten von rekombinantem Testican-2 aus folgenden Zelllinien:

A: EBNA-293-(humane embryonale Nieren-)Zellen

B: LMTK⁻-(murine Fibroblasten-)Zellen

C: N2A-(murine Neuroblastom-)Zellen

Aus dem serumfreien Überstand verschiedener mit einem Testican-2(fl)-Konstrukt transfizierter Zelllinien aufgereinigtes Testican-2 wurde mit Heparinase (H'ase) I und III über Nacht in Anwesenheit von 4 mM Calcium, mit Chondroitinase (Ch'ase) ABC für 4 Stunden in Anwesenheit von 50 mM Acetat oder einer Kombination beider Enzyme mit beiden Zusätzen jeweils bei 37 °C inkubiert. Die Negativkontrolle wurde bei gleichen Bedingungen wie bei dem Doppelverdau nur ohne Enzym behandelt. Die Proben wurden auf einem 4-15%igen Gel aufgetrennt und einer Western-Blot-Analyse mit dem affinitätsgereinigten anti-Testican-2-Antikörper unterzogen.

[Dieser Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Hannie Hülsmann durchgeführt.]

Bei dem Versuch, die Zucker der rekombinanten Proteine aus den verschiedenen Zelllinien abzuspalten, konnte bei rekombinantem Testican-2 aus allen drei Zelllinien sowohl mit Chondroitinase ABC, als auch mit Heparinase I+III ein Shift zu kleineren Molekulargewichten hin detektiert werden. Die Kombination beider Lyasen führte in der Western-Blot-Analyse zu einer distinkten Bande, deren apparentes Molekulargewicht mit dem der 67 kDa-Fraktion von rekombinantem Testican-2 aus EBNA-293-Zellen übereinstimmte (Abb. 2.21 A-C). Das bedeutete, dass an das Coreprotein rekombinant exprimierten Testican-2-Proteins sowohl Heparansulfat- als auch Chondroitinsulfat-Ketten gebunden waren. Dies galt für das Protein transfizierter EBNA-293-Zellen wie auch für rekombinantes Testican-2 aus N2A- und LMTK⁻-Zellen. Eine Änderung der molekularen Masse nach Inkubation mit Chondroitinase ABC könnte auch indikativ für das Vorhandensein von Dermatansulfatketten sein. Dies konnte durch in der Arbeitsgruppe von Prof. Hans Kresse (Institut für physiologische Chemie an der Universität Münster) durchgeführte, unabhängige Versuche ausgeschlossen werden.

Nun ergab sich die Frage, ob auch natives Testican-2 aus Mausgewebe diese beiden Zuckerketten aufweisen würde. Um dies zu untersuchen, wurden verschiedene Gewebeextrakte mit Heparinase I und III, Chondroitinase ABC und einer Kombination beider Enzymen behandelt. Für die Zuckeranalyse fanden Testican-2-positive Gewebe Verwendung, deren Extrakte im Immunoblot zuvor unterschiedliches Laufverhalten zeigten: Gehirn von jungen und adulten Mäusen sowie Hypophyse und Nebenniere einer adulten Maus.

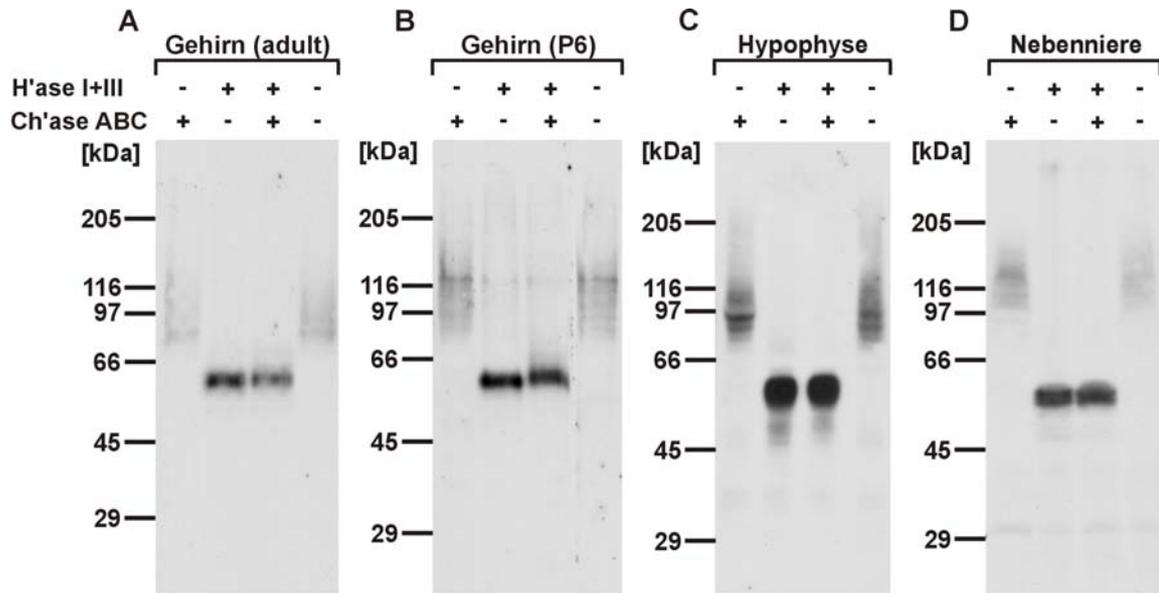


Abb. 2.22: Western-Blot-Analyse der GAG-Ketten von nativem Testican-2 aus Gehirn, Hypophyse und Nebenniere

A: Gehirnextrakt adulter Mäuse

B: Gehirnextrakt postnataler Mäuse (Postnataltag (P) 6)

C: Hypophysenextrakt

D: Nebennierenextrakt

Die Gewebe wurden mit 5fachem Volumen TBS/EDTA-Puffer (Gehirnextrakte und Hypophysenextrakt) bzw. TBS-NP40-Puffer (Nebennierenextrakt) extrahiert, abzentrifugiert und 150 µg (Gehirnextrakte), 50 µg (Hypophysenextrakt) und 175 µg (Nebennierenextrakt) Gewebe mit Heparinase (H'ase) I und III über Nacht in Anwesenheit von 4 mM Calcium, mit Chondroitinase (Ch'ase) ABC für 4 h in Anwesenheit von 50 mM Acetat oder einer Kombination beider Enzyme mit beiden Zusätzen jeweils bei 37 °C inkubiert. Die Negativkontrolle wurde zusammen mit dem Doppelverdau inkubiert. Die Proben wurden nach Ethanol-Fällung auf einem 4-15%igen Gel aufgetrennt und einer Western-Blot-Analyse mit dem affinitätsgereinigten anti-Testican-2-Antikörper unterzogen.

Die Inkubation mit Chondroitinase ABC zeigte bei keinem Gewebe eine Veränderung des Testican-2-Signals, wohingegen nach der Inkubation mit Heparinase I und III für alle vier Extrakte der vollständige Shift des polydispersen Testican-2-Signals in einem Molekularmassenbereich von etwa 80 bis 150 kDa zu einer scharfen Bande bei etwa 60 bis 65 kDa zu erkennen war (Abb. 2.22). Nach kombinierter Anwendung beider Lyasen zeigte sich jeweils das gleiche Bandenmuster wie nach Inkubation mit Heparinase I und III. Man konnte daher schließen, dass das native Testican-2 im Gegensatz zu dem rekombinanten Proteoglykan in den hier untersuchten Geweben als Heparansulfat-Proteoglykan vorliegt.

2.2.3.2 Analyse der N-Glykane

Wie in Abb. 2.21 und 2.22 zu sehen ist, konnten die GAG-Ketten vollständig verdaut werden und nach der Inkubation mit Chondroitinase ABC und Heparinase I und III verblieb eine scharfe Bande, die in ihrer Höhe etwa dem apparenten Molekulargewicht des rekombinanten Testican-2(67 kDa)-Pools entsprach. Der geringe Unterschied zwischen der Bande des rekombinanten Proteins und nativem Testican-2 ist durch den Tag des rekombinanten Testican-2 zu

erklären, der ein Molekulargewicht von etwa 5,2 kDa aufweist. Trotzdem lagen beide Banden, im Fall von rekombinatem Testican-2 auch abzüglich *Tag*, noch über der errechneten molekularen Masse des sekretierten Testican-2-Coreproteins von 44,6 kDa, was durch atypische Laufverhalten verursacht sein könnte, aber auch auf weitere posttranslationale Modifikationen hindeuten könnte. Die massenspektroskopische Untersuchung (MALDI-TOF-Analyse) des Coreproteins ergab eine molekulare Masse von 57 kDa, was die Annahme sowohl eines ungewöhnlichen Laufverhaltens als auch posttranslationaler Modifikationen bestätigte. Da in der Testican-2-Sequenz eine mögliche N-Glykosylierungsstelle zu finden ist, wurde durch Inkubation mit PNGaseF überprüft, ob diese Glykosylierungsstelle genutzt wird und N-Glykane an das Coreprotein gebunden sind. Die Behandlung mit PNGaseF bestätigte dies. Dabei konnten die N-Glykane sowohl bei rekombinatem Testican-2 als auch bei nativem Protein nach dessen Verdau mit Heparinase nachgewiesen werden (Abb. 2.23). Der Unterschied des apparenten Molekulargewichts der Banden von nativem Testican-2 in Hypophysenextrakt und der 67-kDa-Fraktion von rekombinatem Testican-2 ist wie schon erwähnt durch den an das rekombinante Protein gebundenen *Tag* bedingt (Abb. 2.23-B).

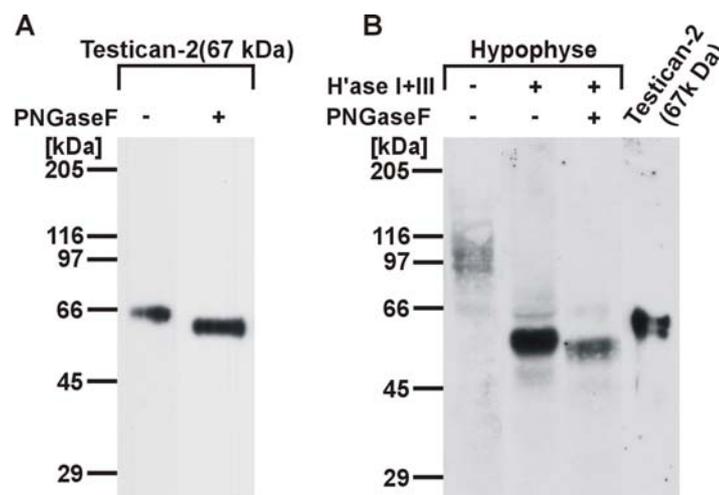


Abb. 2.23: N-Glykan-Analyse von rekombinatem und nativem Testican-2

A: PNGaseF-Behandlung der 67 kDa-Fraktion von rekombinatem Testican-2

B: Heparinase- und PNGaseF-Behandlung von nativem Testican-2 in Hypophysenextrakt

50 ng der 67-kDa-Fraktion von Testican-2 und 50 µg Hypophysenextrakt, der zuvor mit Heparinase (H'ase) I+III für 10 h in Anwesenheit von 4 mM Calcium bei 37 °C verdaut wurde, wurden nach Vorbehandlung mit 1 U (rekombinantes Protein) bzw. 2 U (Hypophysenextrakt) PNGaseF für 10 h inkubiert. Die Negativkontrolle wurde analog behandelt. Die Proben wurden nach Ethanol-fällung auf einem 4-15%igen Gel aufgetrennt und einer Western-Blot-Analyse mit dem affinitätsgereinigten, mit Testican-1 präinkubiertem anti-Testican-2-Antikörper bei einer Verdünnung von 1:50 unterzogen.

Um festzustellen, ob außer der Glykosylierung noch weitere posttranslationale Modifikationen des Coreproteins auftreten, wurde das exakte Molekulargewicht der 67 kDa-Fraktion von rekombinanten Testican-2 nach der Inkubation mit PNGaseF mit Hilfe von MALDI-TOF-Massenspektrometrie ermittelt und mit der Masse vor Abspaltung des N-Glykans verglichen. Die Analyse der Proben ergab einen Shift um 4 kDa von 57 auf 53 kDa (Abb. 2.24-A). Das bedeutete, dass die N-Glykane ein Molekulargewicht von 4 kDa aufweisen.

Damit war die kalkulierte molekulare Masse des rekombinanten Proteins von 49,8 kDa aber noch nicht erreicht. Es müssten daher noch weitere posttranslationale Modifikationen des Coreproteins zu finden sein, die ein Molekulargewicht von etwa 3 kDa ausmachen.

Auch die molekulare Masse der 80-kDa-Fraktion von rekombinatem Testican-2 wurde untersucht (*Abb. 2.24-B*). Dabei wurden zwei kleinere Peaks mit einem Maximum bei etwa 35 und 138 kDa und ein großer Peak mit einem Maximum von etwa 70 kDa ermittelt. Die beiden Peaks bei 70 und 138 kDa erstrecken sich über einen großen Molekulargewichtsbereich (50-95 kDa bzw. 120-160 kDa). Dies weist auf eine breite, polydisperse Bande in der Western-Blot-Analyse hin, wie sie auch tatsächlich im Immunoblot beobachtet wurde (*siehe Abb. 2.19 bzw. 2.20*). Der Peak bei 35 kDa könnte der in Zellextrakten beobachteten Abbaubande entsprechen (*vgl. Abb. 2.13*). Die hier auftretende Diskrepanz zwischen tatsächlicher, mittels Massenspektroskopie bestimmter molekularer Masse und apparentem Molekulargewicht im SDS-Gel ist typisch für Proteoglykane.

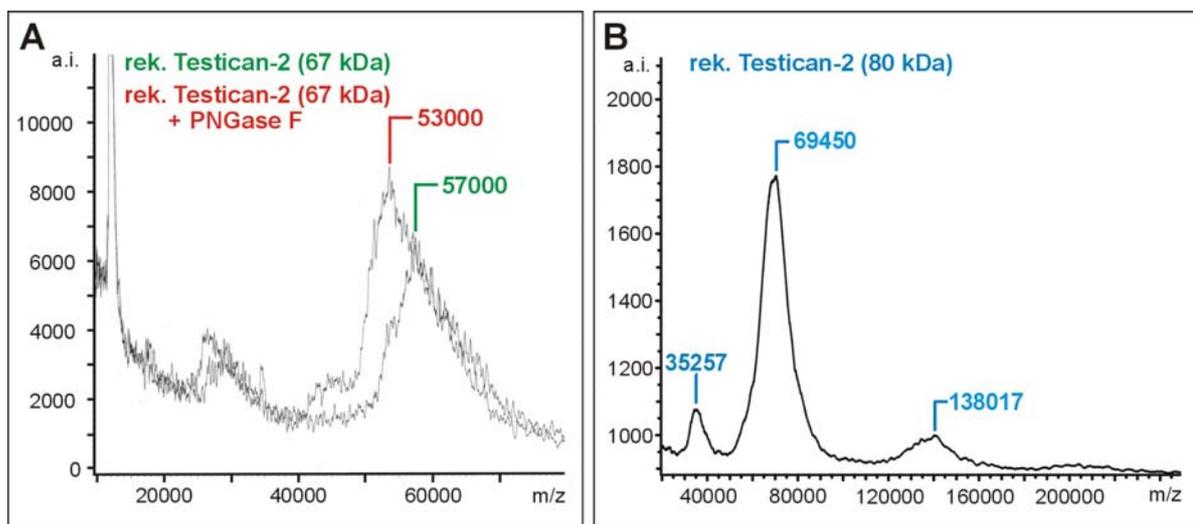


Abb. 2.24: Molekulargewichtsbestimmung von rekombinatem Testican-2 mittels MALDI-TOF-Analyse

A: Bestimmung der molekularen Masse der GAG-freien (67 kDa)-Fraktion von rekombinatem (rek.) Testican-2 vor und nach Abspaltung der N-Glykanketten durch Inkubation mit PNGase F

B: Bestimmung der molekularen Masse der GAG-haltige (80 kDa)-Fraktion von rekombinatem Testican-2

[Die Messung einschließlich Probenvorbereitung wurden im ZMMK-ServiceLabor mit einem MALDI-TOF-Massenspektrometer durchgeführt.]

2.2.4 Testican-2 in der Entwicklung

Wie in *Abb. 2.19* festgestellt wurde, können abhängig vom Gewebetyp unterschiedliche Bandenmuster für endogenes Testican-2 detektiert werden, die auf unterschiedliche Glykosylierungen des Proteoglykane in den entsprechenden Geweben hinweisen. Aber auch zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (P6, adult) konnte in demselben Gewebe (Gehirn) ein Unterschied im Bandenmuster und damit vermutlich auch in der Glykosylierungsform beobachtet werden (*s. Abb. 2.20*). Um dieses Phänomen im Laufe der Entwicklung zu beobachten, wurden Gehirnextrakt von Mäusen verschiedener Entwicklungsstadien erstellt und untersucht. Es waren deutliche Unterschiede zu verschiedenen Zeitpunkten der Mausentwicklung zu erkennen. In der späteren embryonalen Entwicklung (E 16,5) war sowohl das Coreprotein bei etwa 65 kDa als auch eine polydisperse Bande mit sehr hohem apparenten Molekulargewicht und damit vermutlich eine sehr hoch glykosylierte Form von Testican-2 detektierbar, außerdem war noch eine schwache distinkte Bande bei etwa 120 kDa zu erkennen. Mit fortschreitendem Alter der Maus wurde die Coreprotein-Bande und die Bande bei 120 kDa schwächer und das apparente Molekulargewicht der polydispersen Bande verlagerte sich zu immer kleineren Werten (*Abb. 2.25*). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Länge oder Anzahl der Zuckerketten von Testican-2 in Gehirngewebe mit zunehmenden Alter abnimmt.

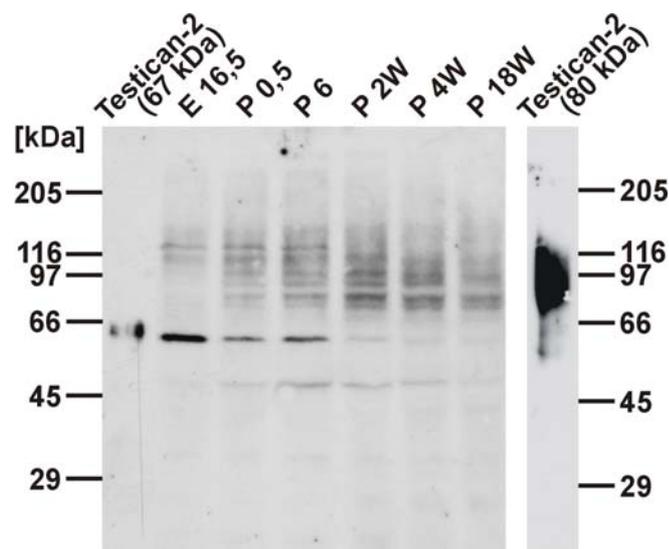


Abb. 2.25: Expression von Testican-2 im Gehirn während der Mausentwicklung

Gehirngewebe von Mäusen verschiedener Entwicklungsstadien (von Embryonaltag (E) 16,5 bis 18 Wochen (W) postnatal (P)) wurde mit 5fachem Volumen TBS/EDTA-Puffer extrahiert. 20 µg der beiden Fraktionen von rekombinantem Testican-2 und 200 µg Gehirngewebe wurden auf einem 4-15%igen SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und Testican-2 mit dem affinitätsgereinigten, zuvor mit Testican-1 präinkubiertem anti-Testican-2-Antikörper bei einer Verdünnung von 1:40 nachgewiesen. Als Größenstandard wurde ein HMW-Marker verwendet.

Viele Proteoglykane spielen in der Entwicklung von Vertebraten eine wichtige Rolle. Um einen Hinweis auf mögliche Aufgaben von Testican-2 in der Entwicklung zu erhalten, wurde

die Lokalisation von Testican-2 zu verschiedenen Zeitpunkten der embryonalen Mausentwicklung untersucht.

Für Zuordnung und Auswertung der im folgenden beschriebenen und dargestellten Ergebnisse der Färbungen von Embryonen bzw. eines Neugeborenen mit dem nach Abreicherung kreuzreagierender Antikörper affinitätsgereinigten anti-Testican-2-Antikörper wurden, wenn nicht anders erwähnt, folgende Bücher verwendet: „The Mouse – Its Reproduction and Development“ von R. Rugh, „The House Mouse - Development and Normal Stages from Fertilization to 4 Weeks of Age“ von K. Theiler, „The Atlas of Mouse Development“ von M.H. Kaufmann und „The Anatomical Basis of Mouse Development“ von M.H. Kaufmann und J.B.L. Bard.

2.2.4.1 Embryonaltage 5,5 bis 7,5

Bei der Maus nistet sich am Tag 4,5 post coitum (p.c.) die Blastozyste nach Abstoßung der Zona Pellucida in die Uterusschleimhaut ein. Innerhalb der Blastozyste haben sich zu diesem Zeitpunkt schon zwei Zellarten entwickelt, der Trophoblast und der Embryoblast. Die Trophoblastzellen umgeben den Embryoblasten vollständig, treten bei der Implantation mit dem maternalen Gewebe in Kontakt, verschmelzen mit diesem und bilden später u.a. die Plazenta. Der Embryoblast, aus dem der spätere Embryonalkörper hervorgeht, wiederum differenziert sich weiter zum Epiblast (embryonales Ektoderm), in dem sich nun die Amnionhöhle ausbildet, und dem Hypoblast (extraembryonales Entoderm), der den Dottersack erzeugt. Ab dem Embryonaltag 5,5 beginnt mit der Gastrulation die eigentliche Entwicklung des Embryos. Es entstehen zwei Keimblätter, die 6,5 Tag p.c. zum ersten Mal zu erkennen sind: das Ektoderm als dicke innere Masse, aus der sich u.a. neuronale Strukturen entwickeln, und eine dünne äußere Schicht, das Entoderm, das später u.a. den gastrointestinalen Trakt bildet. Es ist zu erwähnen, dass bei Nagetieren im Vergleich zu der menschlichen Entwicklung eine Umkehr der Keimblätter (d.h. das Entoderm ist außen und das Ektoderm innen) zu finden ist. Ab E 7,5 entsteht ein drittes Keimblatt, das Mesoderm, das zwischen Ektoderm und Entoderm liegt. Parallel zu den Keimblättern entwickelt sich dann auch durch Verdickung des embryonalen Ektoderm die Primitivrinne, die die primäre Achse der Embryos bestimmt.

Wegen der geringen Größe der Embryonen zum Beginn der Entwicklung wurden diese bis E 9,5 mit dem sie umgebenden Uterusgewebe eingebettet und gefärbt. Im folgenden wird nur auf die im Bereich der Embryonen beobachteten Signale Bezug genommen, auf die im Uterus auftretenden Signale wird nicht weiter eingegangen. Die Grenze zwischen maternalem und embryonalem Gewebe wird in *Abb. 2.26 und 2.27* durch eine gestrichelte Linie verdeutlicht.

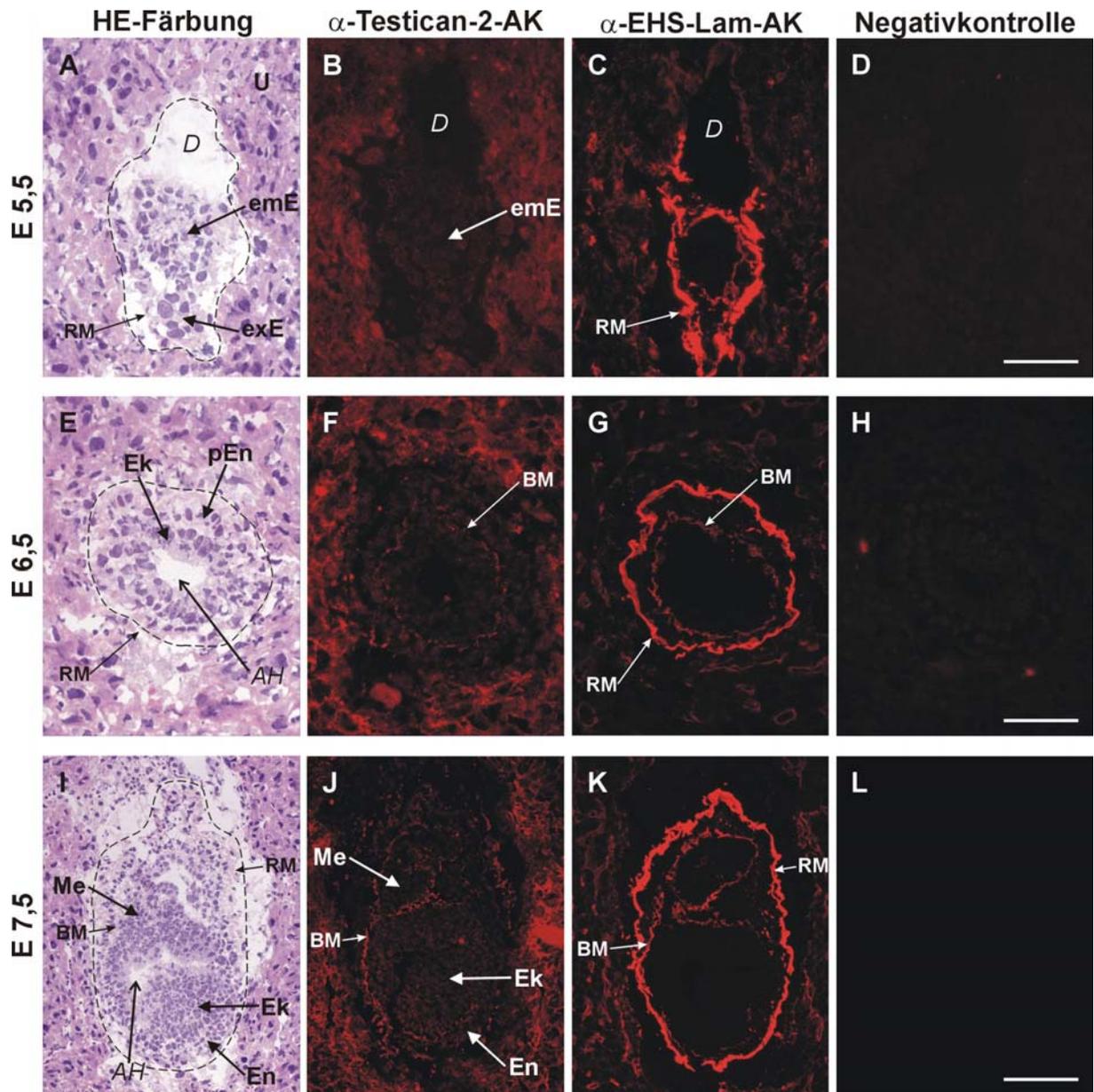


Abb. 2.26: Lokalisation von Testican-2 in der embryonalen Entwicklung der Maus von Embryonaltag (E) 5,5 bis 7,5

A-D: longitudinaler Schnitt von E 5,5; Bar=50 μ m

E-H: transversaler Schnitt von E 6,5; Bar=50 μ m

I-L: sagittaler Schnitt von E 7,5; Bar=100 μ m

A, E, I: Hämatoxylin-Eosin-Färbung; B, F, J: anti-Testican-2-Antikörper in Verdünnung 1:75;

C, G, K: anti-EHS-Laminin1-Antikörper in Verdünnung 1:1000; D;H;L: Negativkontrolle

AH=Amnionhöhle, BM=Basalmembran zwischen den Keimblättern, D=Dottersack, emE= embryonales Ektoderm, En=Entoderm, Ek=Ektoderm, exE=extraembryonales Ektoderm, Me=Mesoderm, pEn=proximales Entoderm, RM=Reichert's Membran, U=Uterusschleimhaut

Die gestrichelte Linie verdeutlicht die Grenze zwischen maternalem und embryonalem Gewebe.

Während bei der immunhistochemischen Färbung von E 5,5 mit dem anti-Testican-2-Antikörper noch kein Signal zu detektieren war (*Abb. 2.26-B*), konnte Testican-2 am 6,5 Tag p.c. zum ersten Mal nachgewiesen werden. Durch Färbung eines Parallel-Schnittes mit einem Antikörper gegen Laminin, einem Markerprotein für Basalmembranen, konnte das Testican-2-Signal in der ersten auftretenden embryonalen Basalmembran, die die beiden sich entwickelnden Keimschichten Ektoderm und Entoderm voneinander trennt, lokalisiert werden (*Abb. 2.26-F*). Die Lokalisation von Testican-2 in extrazellulärer Matrix war auf die Embryo-assoziierte Basalmembran beschränkt. In der Reichert-Membran, einer von den Trophoblastzellen gebildeten Membran, die den gesamten Embryo umgibt und von der maternalen Uterusschleimhaut trennt, war zwar Laminin zu detektieren (*Abb. 2.26-G*), aber keine Testican-2-positiven Signale zu erkennen. Die Reichert-Membran ist nur bei Nagetieren zu finden und wird zwischen dem embryonalen Entoderm und der Trophoblastenschicht 5,5 Tage p.c. gebildet. Auch am Embryonaltag 7,5 war in Basalmembranen (BM) zwischen den beiden Keimblättern ein Testican-2-Signal zu detektieren. Zu diesem Zeitpunkt ist auch das dritte Keimblatt - das Mesoderm - entwickelt, welches als verstreute mesenchymale Zellen zwischen Ektoderm und Entoderm liegt. In den Basalmembranen, die das Mesoderm von den beiden umliegenden Keimblättern abgrenzen, war ebenfalls ein Testican-2-Signal sichtbar (*Abb. 2.26-J*).

2.2.4.2 Embryonaltage 8,5 bis 9,5

Ab dem Embryonaltag 7,5 beginnt die Bildung des Neuralrohres (Neurulation), welches am Tag 8,5 p.c. klar zu sehen ist. Zu diesem Zeitpunkt war wieder eine Basalmembran-Färbung zu erkennen (*Abb. 2.27-B*), die im eigentlichen Embryogewebe im Bereich der Neuralrinne und damit im späteren Nervensystem deutlicher war als in den übrigen extraembryonalen Teilen (*Abb. 2.27-F*). Auch das Amnion, eine Membran, die embryonales von nicht embryonalem Gewebe trennt, zeigte ein Signal für Testican-2.

Etwa ab E 8,5 beginnt die Organogenese und damit die Ausbildung der Organe. Sie startet mit der Entwicklung elementarer Funktionssysteme wie Neuralrohr, Darmrohr und Herz-Kreislauf-System. Die Bildung des Herz-Kreislauf-Systems ist entscheidend für die Entwicklung der weiteren Organe, da zum einen dafür Nährstoffe benötigt werden, die an ihren Bestimmungsort transportiert, und zum anderen Abfallprodukte entstehen, die entfernt werden müssen.

Ab Embryonaltag 9 kann zum ersten Mal die spätere Form des Embryos beobachtet werden. Der Körper des Embryos ist noch so sehr gewunden, dass man auf einem transversalen Schnitt den Kopf (oben) und zweimal den Rückenbereich bzw. Schwanz erkennen kann (unterer Teil des Rückens unten und neben der Kopfanlage den Schwanz) (*Abb. 2.27-H*).

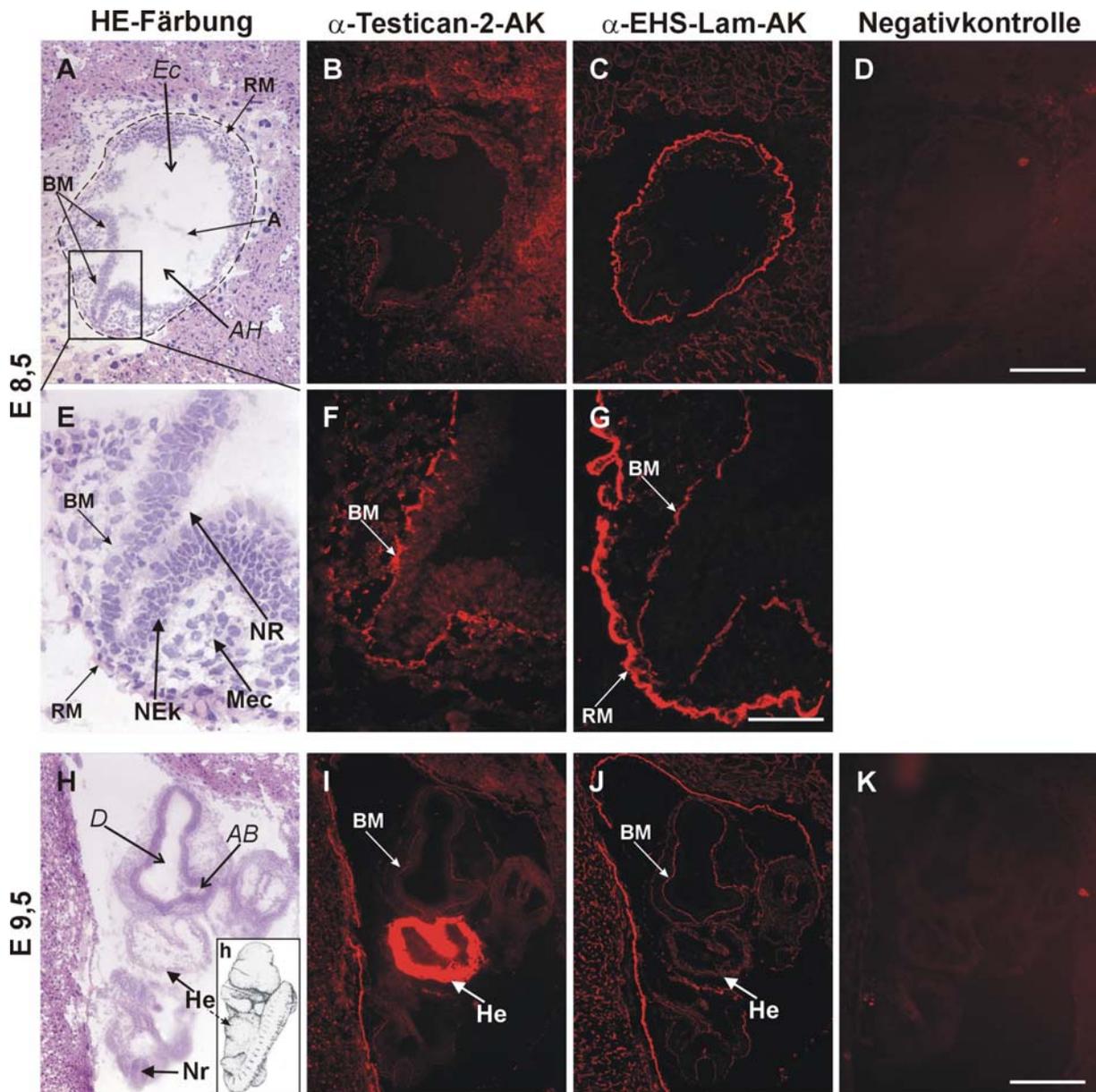


Abb. 2.27: Lokalisation von Testican-2 in der embryonalen Entwicklung von Embryonaltag (E) 8,5 bis 9,5

A-G: sagittale Schnitte von E 8,5; Bar=200 μ m (A-C) bzw. 50 μ m (D-F)

H-K: transversale Schnitte von E 9,5; Bar=400 μ m

h: Zeichnung eines Embryos von E 9,5 [The Mouse, R. Rugh, Oxford University Press, 1990]

A, E, H: Hämatoxylin-Eosin-Färbung; B, F, I: anti-Testican-2-Antikörper in Verdünnung 1:75;

C, G, J: anti-EHS-Laminin1-Antikörper in Verdünnung 1:1000; D, K: Negativkontrolle

A=Amnion, AB=Augenbläschen, AH=Amnionhöhle, BM=Basalmembran zwischen den Keimblättern, D=Zwischenhirnlumen (Diocoel), Ec=Exocoelom, emE=embryonales Ektoderm, En=Endoderm, Ek=Ektoderm, exE=extraembryonales Ektoderm, He=Herzanlage, Mec=Mesenchym, NEk=Neuroektoderm, NR=Neuralrinne, Nr=Neuralrohr, pEn=proximales Endoderm, RM=Reichert's Membran

Die gestrichelte Linie verdeutlicht die Grenze zwischen maternalem und embryonalem Gewebe.

Die Gehirnbläschen beginnen sich zu separieren und werden größer. Zur Verdeutlichung der Lage des angeschnittenen Embryos von E 9,5 ist in der unteren Ecke des HE-gefärbten Schnittes (Abb. 2.27-H) die Zeichnung eines kompletten Embryos gleicher Orientierung abgebildet (Abb. 2.27-h). Auf dem transversalen Schnitt des Embryonaltes 9,5 ist die zu diesem Zeitpunkt noch außerhalb des Embryonalkörpers liegende Herzanlage schon deutlich zu

erkennen (*Abb. 2.27-H*). Bei der Färbung des Embryos diesen Stadiums mit dem anti-Testican-2-Antikörper zeigte sich neben der Basalmembran-Färbung, die schon zuvor beobachtet wurde, eine extrem starke Färbung der Herzanlage (*Abb. 2.27-I*). Da die Färbung der Herzanlage deutlich stärker war als die der Basalmembran und beide Signale auf einem Bild dargestellt werden sollten, erscheint das Signal der Herzanlage überbelichtet.

Die Embryonen vom Embryonaltag 5,5 bis 9,5 wurden wie schon erwähnt, mit dem Uterus eingebettet und geschnitten. Da der Embryo in diesem Zeitraum unterschiedliche Bewegungen durchführt, konnte die Schnittebene nicht immer exakt vorhergesagt werden, stimmt aber weitgehend mit den in der Literatur zu findenden Abbildungen überein. Bei den im Folgenden gezeigten Bildern ist jeweils die Schnittebene gewählt worden, die die Signale am deutlichsten hervorhebt.

Ab dem Embryonaltag 10,5 wurde der Embryo vor der Einbettung aus dem Uterus präpariert, einzeln eingebettet und es wurden sagittale Schnitte erstellt und angefärbt. Um möglichst alle Gewebe zu erfassen, die Testican-2-positive Signale zeigen, wurden Schnittreihen mit Schnitten aus verschiedenen Ebenen untersucht. Die hier abgebildeten Schnitte sollen einen Überblick über die stärksten Signale der jeweiligen Testican-2-positiven Organe geben. Aus Platzgründen kann allerdings nicht jede Ebene gezeigt werden. Die Embryonen wurden sowohl immunhistochemisch (DAB) als auch mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Zweitantikörper (Cy3) gefärbt. In den folgenden Entwicklungsstadien wird zur besseren Orientierung und Übersicht die DAB(Diaminobenzidin)-Färbung des kompletten Embryos dargestellt. Die einzelnen Testican-2-positiven Organe werden zusätzlich vergrößert mit Fluoreszenzmarkierung abgebildet, da diese Methode schärfere Konturen erkennen lässt und damit eine genauere Zuordnung der Signale auf bestimmte Strukturen ermöglicht.

2.2.4.3 Embryonaltag 10,5

Am E 10,5 zeigt die Embryogenese einen deutlichen Fortschritt. Es sind schon einige größere Organe wie Leber und primitive Lungenflügel zu erkennen. Aber nur das Herz ist fast vollständig differenziert, was, wie schon erwähnt, entscheidend für die weitere Entwicklung der anderen Organen ist. Die vier Kammern des Herzens sind ausgebildet und die Atrien können eindeutig von den Ventrikeln unterschieden werden. Wieder war eine starke Färbung des Herzens zu erkennen, die sich, wie durch den Vergleich mit der HE-Färbung bestimmt werden konnte (*Abb. 2.29-4*), auf das Myokard beschränkte (*Abb. 2.29-3*). Muskelgewebe zeichnet sich bei der HE-Färbung durch eine starke rosafarbene Markierung aus und ist daher gut von dem umliegenden Gewebe zu unterscheiden. Eine Parallelfärbung mit dem Basalmembran-Protein Nidogen (*s. Abb. 2.28-C*) zeigte in einigen Bereichen des Myokards eine Übereinstimmung in der Lokalisation der beiden Proteine (*s. Abb. 2.28-B*), aber die Basalmembran, die das Myokard von den anderen Bereichen des Herzens (Endokard, Epikard) trennt, war bei Testican-2 größtenteils nicht gefärbt (*s. Abb. 2.28-A*).

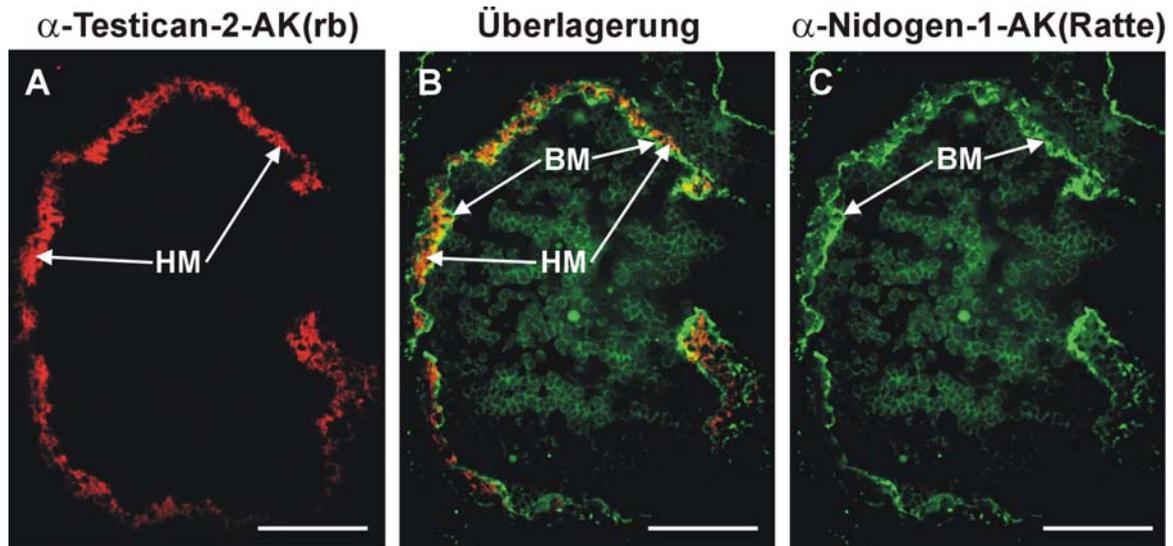


Abb. 2.28: Parallelfärbung von Testican-2 und Nidogen im Herzen an E 10,5

A: gefärbt mit dem affinitätsgereinigten anti-Testican-2-Antikörper(rb), Verd. 1:75

B: Überlagerung der Färbungen von Testis mit dem anti-Testican-2-Antikörper(rb) (A) und dem anti-Nidogen-1-Antikörper (C)

C: gefärbt mit einem monoklonalen anti-Nidogen-1-Antikörper auch Ratte, Verd. 1:50 [Fox et al., 1991]

BM=Basalmembran, HM=Herzmyokard; Bar=100 μ m

Auch das neurale System und besonders die Kopffregion erfahren eine deutliche Weiterentwicklung mit Vergrößerung der Hirnbläschen, insbesondere des Mesenzephalons, und Unterteilung einiger der bestehenden Gehirnabschnitte (Prosenzephalon, Rhombenzephalon) in insgesamt fünf Ventrikel (Telenzephalon, Dienzephalon, Mesenzephalon, Metenzephalon und Myelenzephalon). Die gesamte Gehirn- und Neuralanlage war Testican-2-positiv, was auf weiter median-sagittal liegenden Schnitten noch klarer zu erkennen war. Aber auch auf dem parasagittalen Schnitt des Embryos war nach Inkubation mit dem anti-Testican-2-Antikörper und Visualisierung der Signale mittels DAB-Färbung (*Abb. 2.29-A*) eindeutige Färbungen im Bereich des Gehirns und in weiteren neuralen Geweben zu detektieren. Dabei fand man die stärksten Signale im Rückenmark (*Abb. 2.29-1*) und im trigeminalen Ganglion, welches unter dem IV. Ventrikel liegt (*Abb. 2.29-2*). Im Bereich des Rückenmarks konnte nun zum ersten Mal eine Färbung von Blutgefäßen beobachtet werden. Im Gegensatz zu dem zuvor untersuchten Embryonalstadium waren hier allerdings keine Signale in den Basalmembranen mehr zu detektieren.

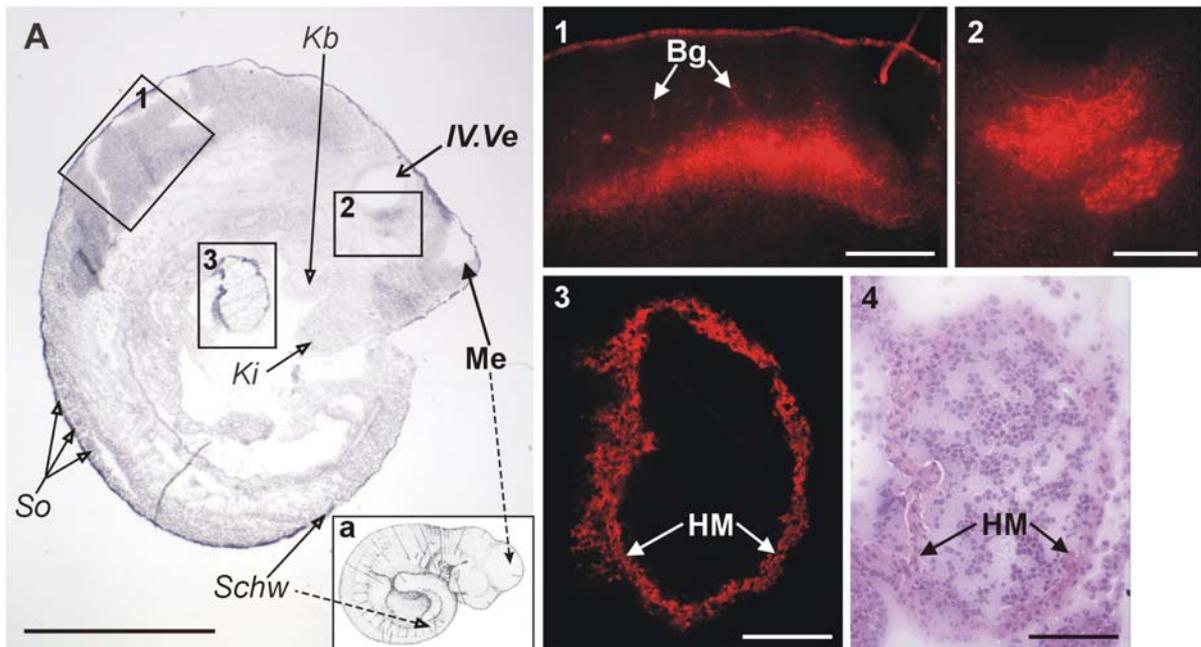


Abb. 2.29: Lokalisation von Testican-2 in der Maus am Embryonaltag 10,5 (para-sagittal)

A: DAB-Übersichtsfärbung eines Embryos von E 10,5; Kb=Kiemebogen, Ki=Kiefer, Me=Mesenzephalon, Schw=Schwanz, So=Somiten, IV.Ve=IV. Ventrikel; Bar=1 mm

a: Zeichnung eines Embryos von E 10,5 [The Mouse, R. Rugh, Oxford University Press, 1990]

1: Rückenmark mit Neuralrohröffnung; Bg=Blutgefäße; Bar=200 µm

2: trigeminales Ganglion; Bar=100 µm

3: ventrikuläre Herzkammer-angefärbt mit dem affinitätsgereinigten anti-Testican-2-Antikörper und einem fluoreszenzmarkierten (Cy3) Zweitantikörper; HM=Herz-Myokard; Bar=100 µm

4: HE-Färbung der ventrikulären Herzkammer; HM=Herz-Myokard; Bar=100 µm

2.2.4.4 Embryonaltag 12,5

Als Nächstes wurde eine Maus vom Embryonaltag 12,5 untersucht (Abb. 2.30-A). Der Körper des Embryos ist zu diesem Zeitpunkt immer noch stark gekrümmt, beginnt aber sich zu strecken. Der Kopfbereich entwickelt sich am stärksten und nimmt etwa ein Drittel des gesamten Körpervolumens ein. Das wird besonders durch die fortschreitende Differenzierung des Gehirns verursacht, in dem eine Proliferation von Neuroblasten beobachtet werden kann. Die Gehirnwandungen werden dadurch immer weiter verdickt und die Hirnventrikel sukzessive verschlossen, was hier insbesondere bei Mesenzephalon und Telenzephalon auftritt. In allen Gehirnbereichen konnte Testican-2 detektiert werden, wobei die Signale von Mittel- (Mesenzephalon) und Rautenhirn (Metenzephalon und Myelenzephalon) besonders stark waren (Abb. 2.30-A). Bei genauerer Betrachtung der Gehirnbereiche konnte darüber hinaus ein Signal in den vermehrt auftretenden Blutgefäßen des Gehirns beobachtet werden (Abb. 2.30-1). Auch in den inzwischen ausgeformten Spinalganglien waren Signale für Testican-2 zu erkennen (Abb. 2.30-3/4), ebenso im Rückenmark (Abb. 2.30-4). Das Herz ist zu diesem Zeitpunkt fast komplett. Die Öffnung zwischen den beiden Atrien schließt sich immer mehr und die Vorhofsepten verschmelzen mit den Endokardkissen. Die ventrikuläre Wand hat sich verdickt, während die Wand des Atriums dünner erscheint und sich ausdehnt. Wie schon bei

E 10,5 zeigte wieder das gesamte Myokard, also die muskuläre Struktur des Herzens, eine starke Färbung für Testican-2. Das Signal des dünner-wandigen Atriums und der dickeren Ventrikel ist auf *Abb. 2.30-2* klar zu erkennen.

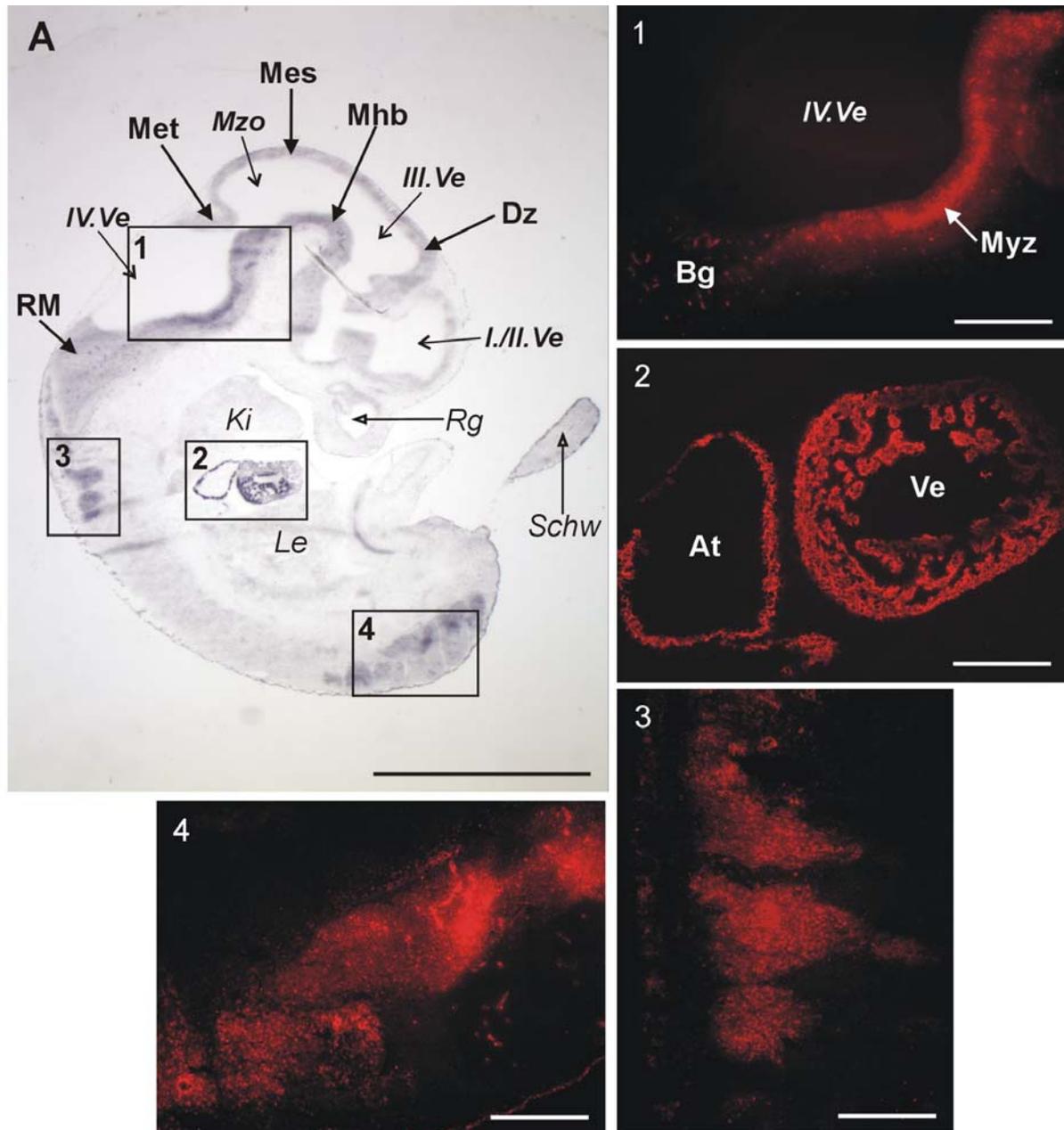


Abb. 2.30: Lokalisation von Testican-2 in der Maus am Embryonaltag 12,5 (median-sagittal)

A: DAB-Übersichtsfärbung; Dz=Diencephalon, Ki=Kiefer, Le=Leber, Mes=Mesencephalon, Met=Metencephalon (Cerebellum), Mhb=Mittelhirnbeuge, Mzo=Mesochoel, Rg=Riechgrube, RM=Rückenmark, Schw=Schwanz, I./II.Ve=I. oder II. Ventrikel (Telocoel), III.Ve=III. Ventrikel (Diocoel), IV.Ve=IV. Ventrikel; Bar=2 mm

1: Myelencephalon (Myz); Bg=Blutgefäße, IV.Ve=IV. Ventrikel; Bar=400 µm

2: Herz; At=Atrium, Ve=Ventrikel; Bar=200 µm

3: Spinalganglion-Anlage; Bar=200 µm

4: Rückenmark und Spinalganglion-Anlage; Bar=200 µm

2.2.4.5 Embryonaltag 14,5

Am Embryonaltag 14,5 erscheint der Körper des Embryos schon viel gerader, bedingt durch den sich streckenden Rücken. Der Kopf des Embryos ist im Verhältnis zum Körper noch immer sehr groß und das Gesicht bekommt eine Schwein- oder Nagetier-ähnliche Kontur. Die Gliedmaßen sind sehr weit ausgebildet und es sind schon einzelne Finger erkennbar. Die meisten wichtigen Organe sind gebildet und zeichnen in der nachfolgenden Entwicklung nur noch durch weitere Vaskularisierung und zelluläre Differenzierung aus. Der Embryo ist somit topografisch komplett. Das Gehirn wurde durch fortschreitende Verdickungen der Ventrikel-Wandungen weiter ausgebildet und seine Hauptabschnitte können nun optisch unterteilt und identifiziert werden. Darüber hinaus sind neben der Hypophyse auch Riechgrube und die Augenanlage deutlich zu erkennen und es bilden sich Nervenfasern aus, die die Sinnesorgane mit dem Gehirn verbinden. Dabei tritt das optische System mit dem sich aus dem Prosenzephalon entwickelten Dienzephalon und das olfaktorische System mit dem sich ebenfalls aus dem Prosenzephalon differenzierten Telenzephalon in Kontakt.

Am E 14,5 konnten auf den DAB-gefärbten Übersichten vielfache Signale für Testican-2 detektiert werden (*Abb. 2.31-A/B*). Diese schienen auf den ersten Blick nahezu ubiquitär verteilt zu sein, doch bei näherer Betrachtung war eine genauere Zuordnung möglich: Wie zuvor zeigte sich eine Färbung des zentralen Nervensystems. Dabei waren starke Signale für Testican-2 sowohl in den verschiedenen Gehirnbereichen (Telenzephalon, Mesenzephalon, Metenzephalon und Myelenzephalon) (*Abb. 2.31-B/5*), dem Rückenmark und schwach in der sich entwickelnden Hypophyse als auch in den zu diesem Zeitpunkt recht großen Ganglien im Kopf (z.B. trigeminales Ganglion) und den Spinalganglien im Rücken zu detektieren (*Abb. 2.31-A/B,-3/5*). Auch die starke Färbung des Herzmyokards konnte wieder beobachtet werden (*Abb. 2.31-2*), ebenso die Signale der Gefäße im Nervensystem (*Abb. 2.31-4*). Hinzu kam eine Färbung der Muskulatur, die zu diesem Zeitpunkt überall im Körper zu finden ist und bis auf die Muskulatur des Kopfes auf das Mesoderm zurückgeht. Die stärksten Signale konnten dabei in der Skelettmuskulatur beobachtet werden (*Abb. 2.31-1*). Die Myoblasten, die die Skelettmuskulatur bilden, entwickeln sich aus dem Mesenchym der aus Rumpfsomiten stammenden Myotome. Ab E 11 beginnen Zellen des Myotoms mesenchymalen Charakter anzunehmen und entwickeln sich weiter zu Myoblasten. Etwa an E 13 zeigen die Myoblasten eine aktive Proliferation und fangen an zu differenzieren. Die Differenzierung der Myoblasten beginnt mit einer Verlängerung der Zellen, die sich gleichzeitig zu Bündeln zusammenlagern und miteinander zu Myofibrillen verschmelzen. Zum jetzigen Zeitpunkt (E 14,5) besteht die Muskulatur noch aus nicht-kontraktile Muskelfibrillen. Ab E 15 kann dann eine Kontraktion der Muskel beobachtet werden und 16 Tage p.c. sind quergestreifte Myofibrillen in allen sich entwickelnden Muskeln zu finden.

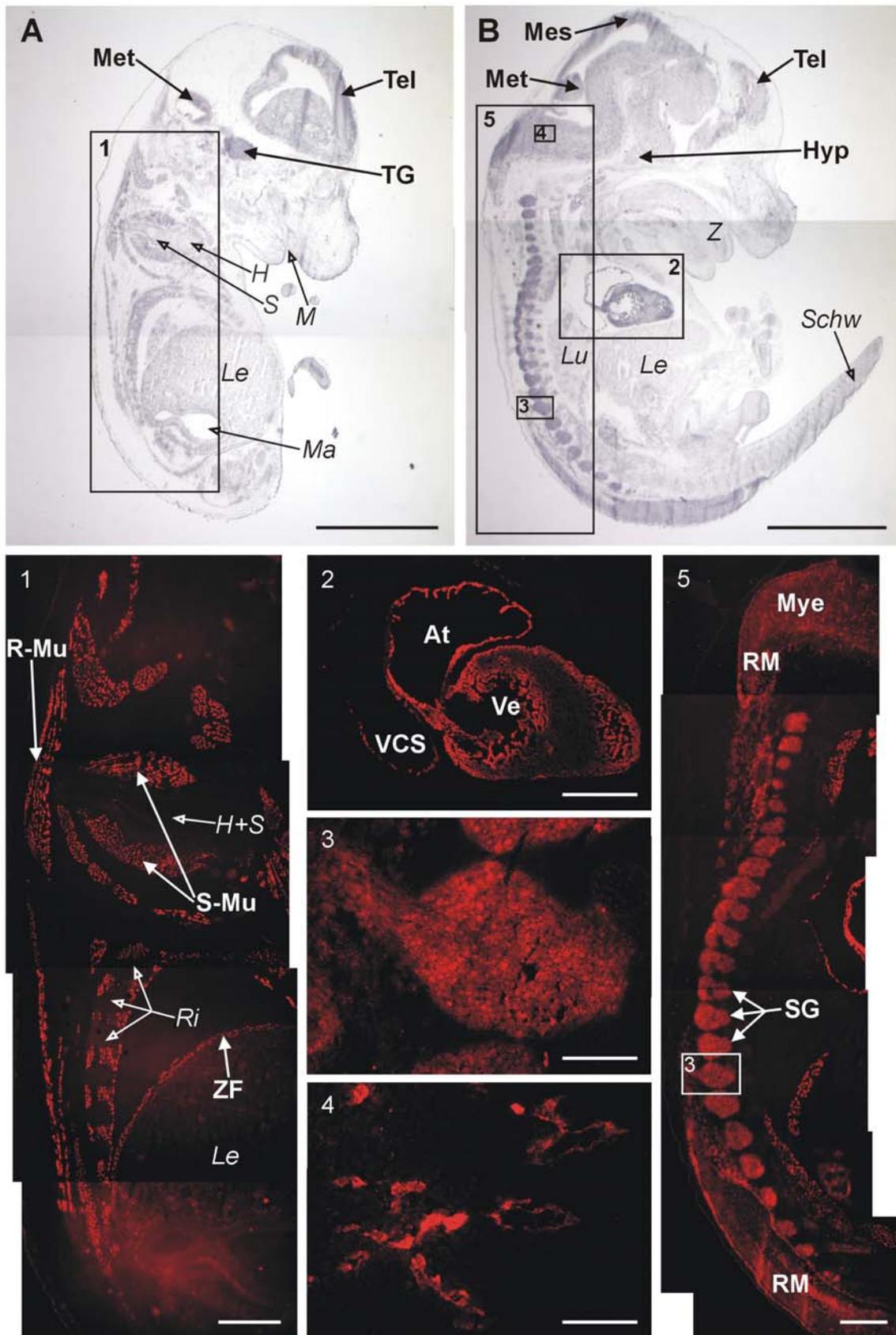


Abb. 2.31: Lokalisation von Testican-2 in der Maus am Embryonaltag 14,5.

A/B: para-sagittale/median-sagittale DAB-Übersichtsfärbung; H=Humeruskopf (Oberschenkelknochen), Hyp=Hypophyse, Le=Leber, Lu=Lunge, M=Mund, Ma=Magen, Mes=Mesenzephalon, Met=Metenzephalon (Cerebellum), S=Scapula (Schulterblatt), Schw=Schwanz, Tel=Telenzephalon, TG=trigeminales Ganglion, Z=Zunge; Bar=2 mm (weiter: folgende Seiten)

- 1: Rückenbereich mit Muskeln; H+S=Humerus+Scapula, Le=Leber, Ri=Rippen, R-Mu=autochthone Rückenmuskulatur, S-Mu=Muskeln der Schultergelenkes, ZF=Zwerchfell; Bar=400 µm
 2: Herz; At=Atrium, VCS=Vena cava superior, Ve=Ventrikel; Bar=400 µm
 3: Spinalganglion; Bar=100 µm
 4: Blutgefäße im Myelenzephalon; Bar=50 µm
 5: Rückenbereich mit neuronalen Gewebe; Mye=Myelenzephalon, RM=Rückenmark, SG=Spinalganglion; Bar=400 µm

In *Abb. 2.31-1* ist ein Ausschnitt der Muskelfärbung dargestellt und man kann z.B. deutlich die Testican-2-positiven Signale der autochthonen (an Ort und Stelle entstandenen) Rückenmuskulatur, der Muskeln des Schultergelenks, der interkostalen Muskulatur (zwischen den Rippen) und des Zwerchfells an E 14,5 erkennen. Auch im Kopfbereich konnten zu diesem Zeitpunkt eine Färbung der Muskulatur detektiert werden, wie z.B. in den Muskeln der Zunge (*nicht gezeigt*).

2.2.4.6 Embryonaltag 16,5

Am Embryonaltag 16,5 ist der Embryo äußerlich schon eindeutig als Maus erkennbar und ist durch die nun funktionsfähigen Muskeln im Uterus sehr aktiv. Auch vom „inneren Aufbau“ her ist die Maus prinzipiell komplett, bis auf die weitere endochondrale Verknöcherung der Knochenanlagen, in denen zu diesem Zeitpunkt häufig noch der Knorpelanteil vorherrscht. Das Gehirn ist bis auf das Cerebellum vollständig entwickelt und zeichnet sich ab diesem Zeitpunkt nur noch durch weiteres Wachstum und Myelisierung aus. Die Organe sind ausgebildet und funktionsfähig, wie z.B. das Herz und die großen Blutgefäße, deren Konfiguration sich bis zur Geburt nicht mehr verändert. Die Muskulatur ist kontraktile, aber noch nicht vollständig ausgebildet.

Wie an E 14,5 zeigten die mit dem anti-Testican-2-Antikörper und DAB angefärbten Mausschnitte 16,5 Tage p.c. viele positive Signale. Es war erneut eine deutliche Färbung des neuronalen Gewebes zu erkennen. Dabei ist zum Einen das gesamte Gehirn und das Rückenmark inklusive der darin vorkommenden Blutgefäße zu erwähnen (*Abb. 2.32-A/B*), zum Anderen auch die Ganglien des Kopfes, wie z.B. das trigeminale Ganglion (*Abb. 2.32-A*), und die Spinalganglien des Rückens (*Abb. 2.32-1*). Es zeigte sich jetzt auch ein sehr deutliches Signal der Hypophyse (*Abb. 2.32-5*), das an E 14,5 zunächst schwach beobachtet werden konnte (*siehe Abb. 2.31-B*). Das Signal schien im unteren Teil, der aus dem Epithel der ektodermalen Mundbucht gebildeten Adenohypophyse, stärker zu sein als im oberen Teil, der sich aus einer Ausstülpung des Mesenzephalon entwickelten Neurohypophyse, aber eine genaue Unterscheidung war auf dieser Abbildung noch nicht möglich (*Abb. 2.32-5*), obwohl alle drei Teile der Hypophyse (Adenohypophyse, Neurohypophyse und Pars intermedia) schon ausgebildet sein sollten.

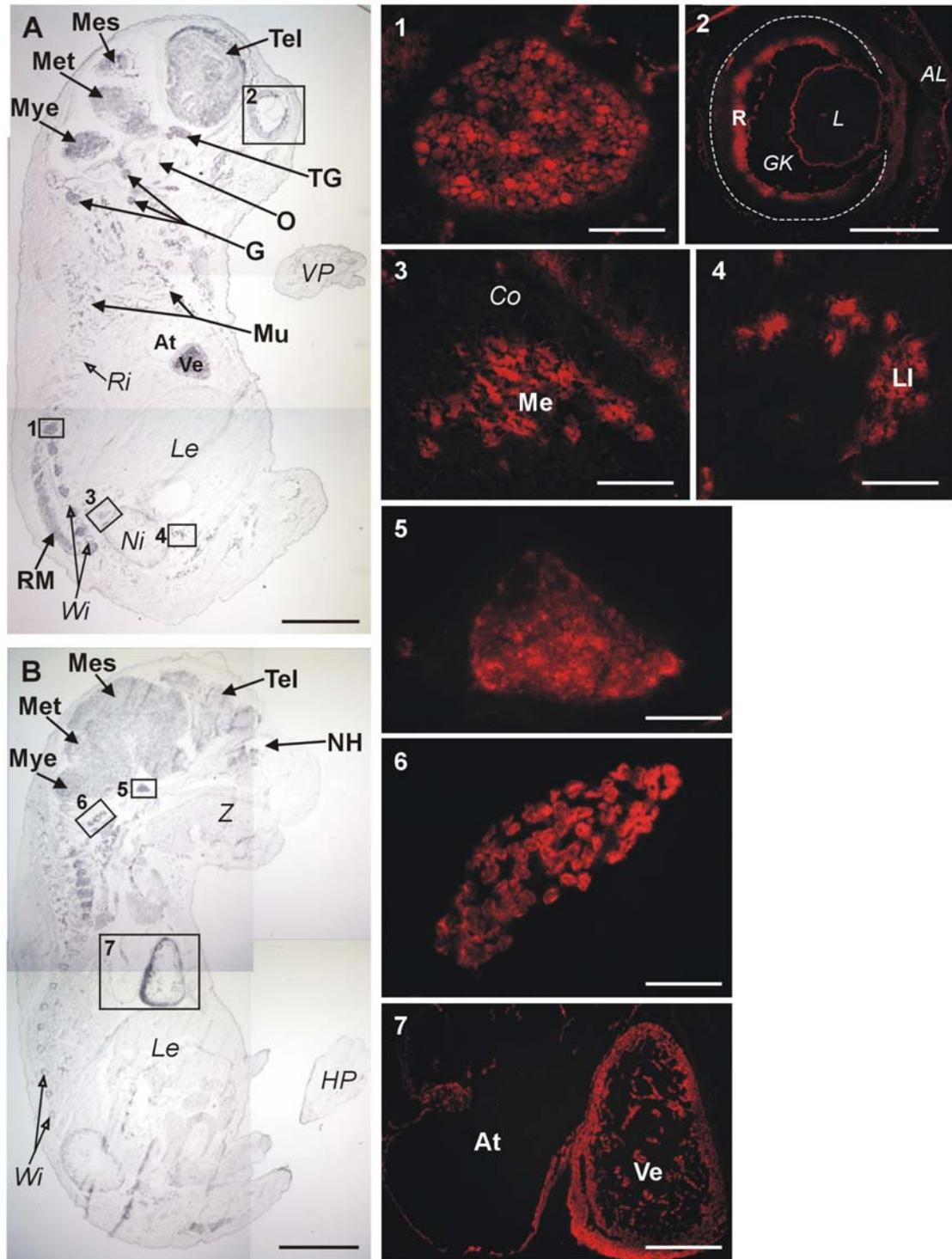


Abb. 2.32: Lokalisation von Testican-2 in der Maus am Embryonaltag 16,5

A/B: para-sagittale/median-sagittale DAB-Übersichtsfärbung; At=Atrium, G=Ganglien, HP=Hinterpfote, Le=Leber, Mes=Mesenzephalon, Met=Metenzephalon, Mu=Muskel, Mye=Myelenzephalon, NH=Nasenhöhle, Ni=Niere, Ri=Rippen, RM=Rückenmark, Tel=Telenzephalon, O=Ohranlage, TG=trigeminale Ganglion, Ve=Ventrikel, VP=Vorderpfote, Wi=Wirbel, Z=Zunge; Bar=2 mm

1: Spinalganglion; Bar=100 µm

2: Auge; AL=Augenlid, GK=Glaskörper, L=Linse, R=Retina, gestrichelte Linie=äußere Grenze der Retina; Bar=400 µm

3: Nebenniere; Co=Cortex, Me=Medulla; Bar=100 µm

4: Anlage der Langerhanschen Inseln (LI) im Pankreas; Bar=100 µm

5: Hypophyse; Bar=100 µm

6: Muskeln; Bar=50 µm

7: Herz; At=Atrium, Ve=Ventrikel; Bar=400 µm

Es konnte noch in einem weiteren aus dem Neuroektoderm entstandenen Gewebe ein Testican-2-positives Gewebe detektiert werden: die Retina des Auges (*Abb. 2.32-2*). Sie entsteht aus einer Abschnürung des Dienzephalon, dem optischen Bläschen, das ab E 9,5 (*s. Abb. 2.27-H*) beobachtet werden kann. Zu dem Zeitpunkt war aber noch keine Färbung des neuralen Gewebes zu detektieren, hingegen zeigte die Basalmembran zwischen Neuroektoderm und Mesenchym ein positives Signal (*s. Abb. 2.27-G*). An E 14,5 konnte in der Retina schon eine diffuse Färbung beobachtet werden (*nicht gezeigt*), 16,5 Tage p.c. ist das Signal hauptsächlich in der inneren Schicht der Netzhaut zu finden, die später unter anderem die Optikusganglienzellen hervorbringt, wie bei stärkerer Vergrößerung ermittelt werden konnte (*nicht gezeigt*). Aus dem Neuroektoderm entwickelt sich auch die Medulla der Nebenniere, die ebenfalls ein deutliches Signal zeigte (*Abb. 2.32-3*). Dieses Signal war nur auf die Medulla der Nebenniere begrenzt, wie auch schon für eine erwachsene Maus gezeigt werden konnte (*s. Abb. 2.17-C/D*), der Cortex war nicht gefärbt. Auch im Pankreas konnten Signale detektiert werden, die vermutlich im sich zu diesem Zeitpunkt der embryonalen Mausentwicklung ausbildenden endokrinen Anteil des Gewebes, den Langerhans-Inseln, lokalisiert war (*Abb. 2.32-4*). Des Weiteren war wieder eine Färbung von Herzmyokards und Skelettmuskulatur zu detektieren (*Abb. 2.32-6/7*), die auch schon 14,5 Tage p.c. zu beobachten waren. Allerdings erschienen die Signale der Muskulatur hier zum Teil nicht mehr so prominent (*vgl. Abb. 2.31-A und Abb. 2.32-A*).

2.2.4.7 Neugeborene Maus (P 1,5)

Als letztes wurde eine neugeborene Maus hinsichtlich der Verteilung von Testican-2 untersucht. Da die vollständige Maus für die Einbettung zu groß war, wurde vor dem Einbettungsvorgang der Kopf abgetrennt, und danach Rumpf und Kopf separat eingebettet, geschnitten und gefärbt (*Abb. 2.33-A/B*).

Auch wenn die neugeborene Maus lebensfähig ist, so sind trotzdem noch nicht alle Organe bzw. Körperteile vollständig entwickelt, allen voran das Gehirn. Das Cerebellum zum Beispiel ist erst einige Tage nach der Geburt komplett ausgebildet. Die Maus ist bei der Geburt noch nackt und die Augen(lider) öffnen sich erst 12-14 Tage nach Geburt. Da sich der prinzipielle Aufbau der Maus seit 16,5 Tage kaum geändert hat und einige Organe nur noch weiteren Differenzierungen unterlagen, ergaben sich für die Lokalisation der Signale bei der neugeborenen Maus wenige Änderungen im Vergleich zu dem zuvor untersuchten Entwicklungsstadium, nur war die genaue Zuordnung der Testican-2-Signale wegen der weiteren Differenzierung mancher Organe jetzt einfacher und genauer möglich.

So konnten z.B. die Signale innerhalb des Gehirns nun exakter bestimmten Zellschichten und Strukturen zugeordnet werden. Im Bulbus olfactorius war das Signal von Testican-2 hauptsächlich in den äußeren Zell-Schichten, insbesondere in der Mitralzellschicht und in den Blutgefäßen zu beobachten (*Abb. 2.33-1*). Aber auch in den anderen Gehirnregionen waren positive Färbungen detektierbar (*Abb. 2.33-A*).

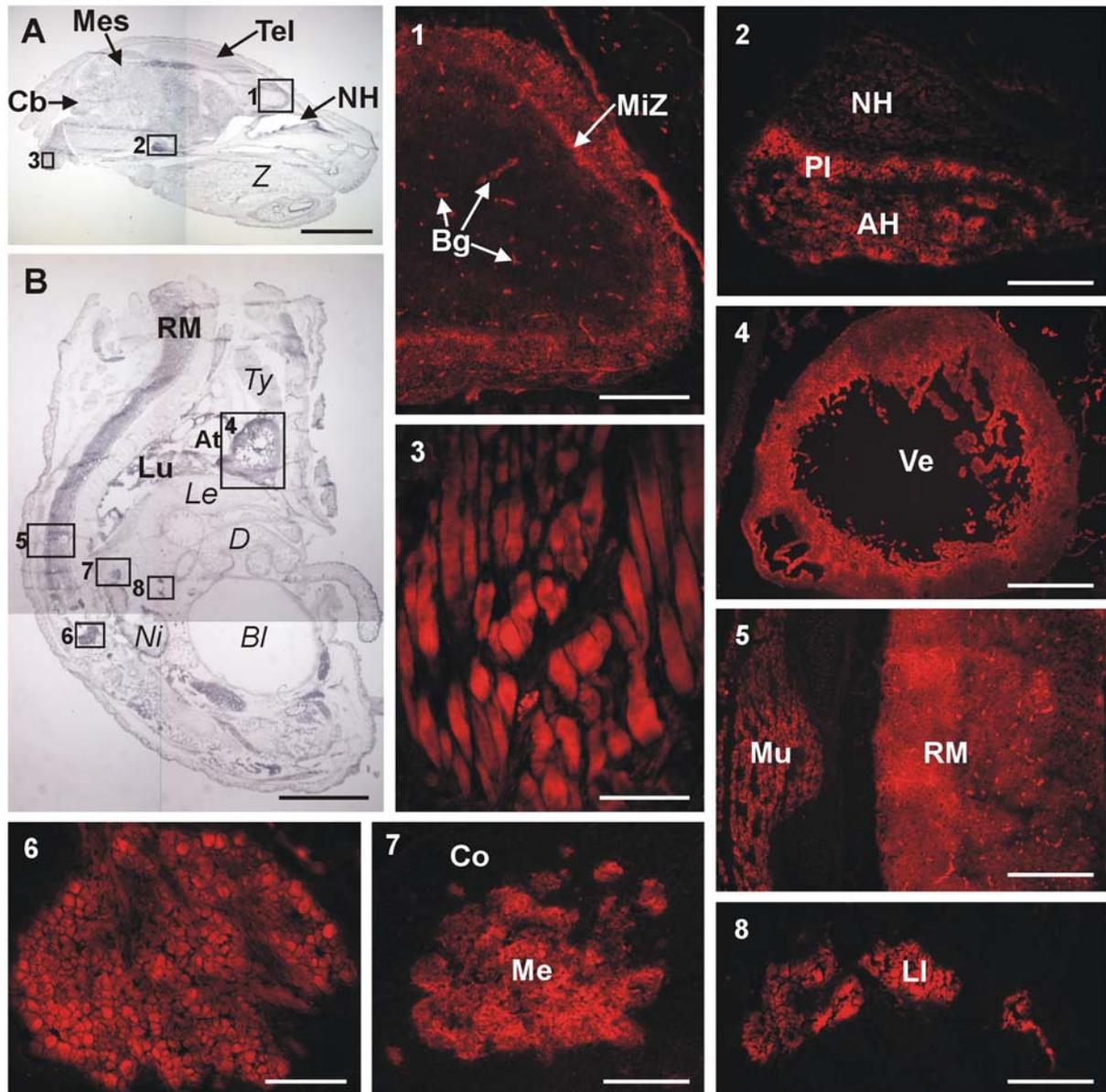


Abb. 2.33: Lokalisation von Testican-2 bei einer neugeborenen Maus 1,5 Tage nach der Geburt.

A: median-sagittale DAB-Übersichtsfärbung des Kopfes; Cb=Cerebellum (Metenzephalon), NH=Nasenhöhle, Mes=Mesenzephalon, Tel=Telenzephalon; Bar=2 mm.

B: para-sagittale DAB-Übersichtsfärbung des Rumpfes; At=Atrium, Bl=Blase, D=Darmanschnitte, Le=Leber, Lu=Lunge, Ni=Niere, RM=Rückenmark, Ty=Thymus; Bar=2 mm

1: Bulbus olfactorius; Bg=Blutgefäße, MiZ=Mitralzellschicht; Bar=200 µm

2: Hypophyse; AH=Adenohypophyse, NH=Neurohypophyse, PI=Pars intermedia; Bar=100 µm

3: Muskeln; Bar=50 µm

4: Herz-Ventrikel (Ve); Bar=400 µm

5: Ausschnitt aus dem Rücken; Mu=Muskeln, RM=Rückenmark; Bar=200 µm

6: Spinalganglion; Bar=100 µm

7: Nebenniere; Co=Cortex, Me=Medulla; Bar=100 µm

8: Anlager der Langerhans-Inseln (LI) im Pankreas; Bar=100 µm

Die genauere Lokalisation von Testican-2 innerhalb der Hypophyse war nun ebenfalls deutlicher zu erkennen: Während die Neurohypophyse nur schwach gefärbt war, zeigten sich in der Adenohypophyse und der Pars intermedia starke Signale für Testican-2, wobei die Färbung der Pars intermedia wie bei der adulten Hypophyse (*siehe Abb. 2.17-A/B*) intensiver

war (Abb. 2.33-2). Des Weiteren waren wieder Signale in neuralem Gewebe wie Rückenmark und Spinalganglien und muskulärem Gewebe wie Herz, Hals- und Rückenmuskulatur zu beobachten (Abb. 2.33-3 bis 6). Auch in der Medulla der Nebenniere und dem endokrinen Anteil des Pankreas, den Langerhans-Inseln, konnte wieder ein Testican-2-positives Signal detektiert werden. Zusätzlich war in der neugeborenen Maus auch ein Signal der Lunge zu beobachten, das wegen des geringen Morphologie-Erhalts der Lungen-Kryoschnitte wie bei dem erwachsenen Tier leider nicht näher charakterisiert werden konnte. (Die Verwendung von Paraffin-Schnitten war, wie schon erwähnt, hier nicht möglich.)

2.2.4.8 Zusammenfassung

Abb. 2.34 ermöglicht eine Übersicht über die Lokalisation von Testican-2 während der embryonalen Mausentwicklung. In *Teil I* sind zeitlicher und räumlicher Verlauf der Expression von Testican-2 und relevante Entwicklungsstufen schematisch dargestellt. Der jeweils verzeichnete Beginn der verschiedenen Entwicklungsprozesse ist dabei nur als ungefähre Richtwert anzusehen, da es zwischen verschiedenen Mausstämmen und sogar innerhalb eines Wurfes zu zeitlichen Unterschieden kommen kann und daher auch die Literaturdaten diesbezüglich teilweise widersprüchlich sind. In *Teil II* sind die immunhistochemischen Daten von Testican-2 während der embryonalen Mausentwicklung zusammengestellt. Dabei wird jeweils einem mit dem anti-Testican-2-Antikörper inkubierten Schnitt ein mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung angefarbter Schnitt gegenübergestellt.

Es ist eine Verteilung der Testican-2-Expression auf immer mehr sich entwickelnde Geweben zu erkennen: Aus den nur auf Basalmembranen beschränkten Signalen der frühen Entwicklungsstadien 6,5 bis 8,5 Tage p.c. wurde mit weiterer Entwicklung eine Zell-assoziierte Expression in verschiedenen Geweben. Zunächst war Testican-2 ab E 9,5 zusätzlich zu der Basalmembran-Färbung noch sehr stark in der Herzanlage zu detektieren. Während das starke Signal im Herz auch in den folgenden Entwicklungsstadien zu sehen war, konnte in der Basalmembran im Weiteren kein Signal mehr detektiert werden. Ab E 10,5 war Testican-2 dann in dem neuralen System (Rückenmark, Ganglien, Gehirn und später Hypophyse) inklusive dessen Blutgefäßen zu erkennen. Mit fortschreitender Entwicklung konnte es dann auch in anderen Geweben und Organen detektiert werden, wie den Muskeln (ab E 14,5), den endokrinen Drüsen (Nebenniere und Pankreas ab 16,5) und zuletzt auch der Lunge (P1,5).

Am häufigsten war Testican-2 in ektodermalen und insbesondere neuroektodermalen Derivaten zu beobachten, die nahezu alle Testican-2-positiv waren. Auch in der Haut, die sich ebenfalls aus dem Neuroektoderm entwickelt, konnten besonders in der früheren embryonalen Entwicklung Signale detektiert werden (*siehe Abb. 2.31-1*), die später nur noch punktiert und vereinzelt auftraten (*siehe Abb. 2.32-2*). Da die Lokalisation der Signale nicht genau bestimmt werden konnte, wurde auf diese nicht weiter eingegangen. In Geweben mesodermaler Herkunft wie Muskeln und Herzmyokard und einem Teil der Blutgefäße konnte Testican-2

ebenfalls lokalisiert werden. In endodermalen Geweben war Testican-2 kaum zu detektieren, Ausnahmen bilden die Lunge und bestimmte Strukturen im Pankreas.

Teil I

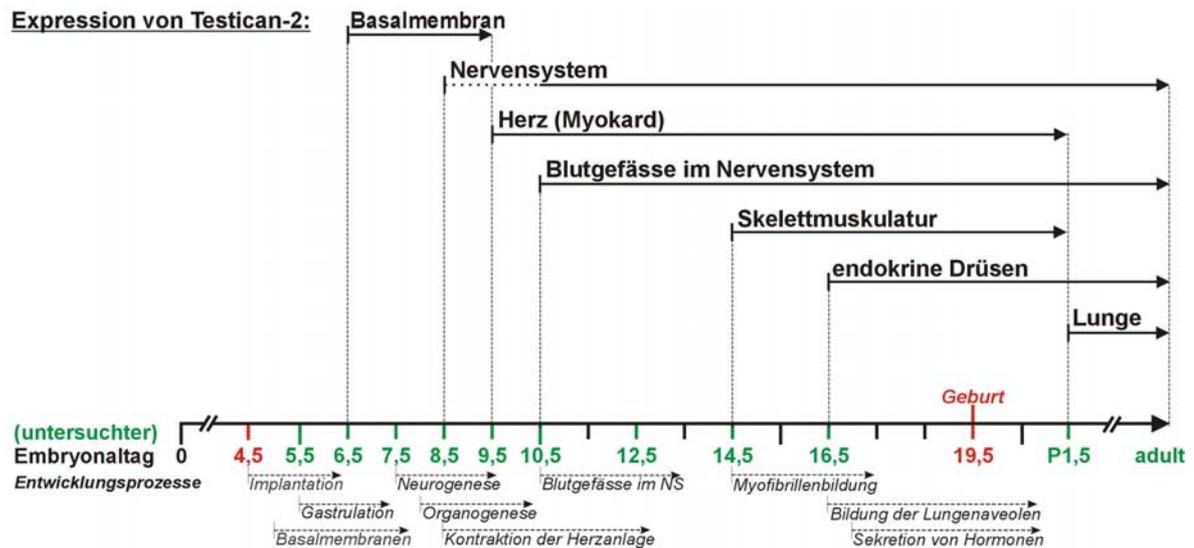


Abb. 2.34: Übersicht der Lokalisation von Testican-2 in der Entwicklung

Teil I: Schematische Übersicht.

Der Pfeil unter dem beobachteten Ort der Expression von Testican-2 gibt Beginn und Ende der Signaldetektion während der zeitlichen Mausentwicklung an. Im gepunkteten Bereich konnte nur eine Basalmembranfärbung beobachtet werden. Rechts in der Abbildung sind die Ergebnisse der Expressionsanalysen bei der adulten Maus ergänzt.

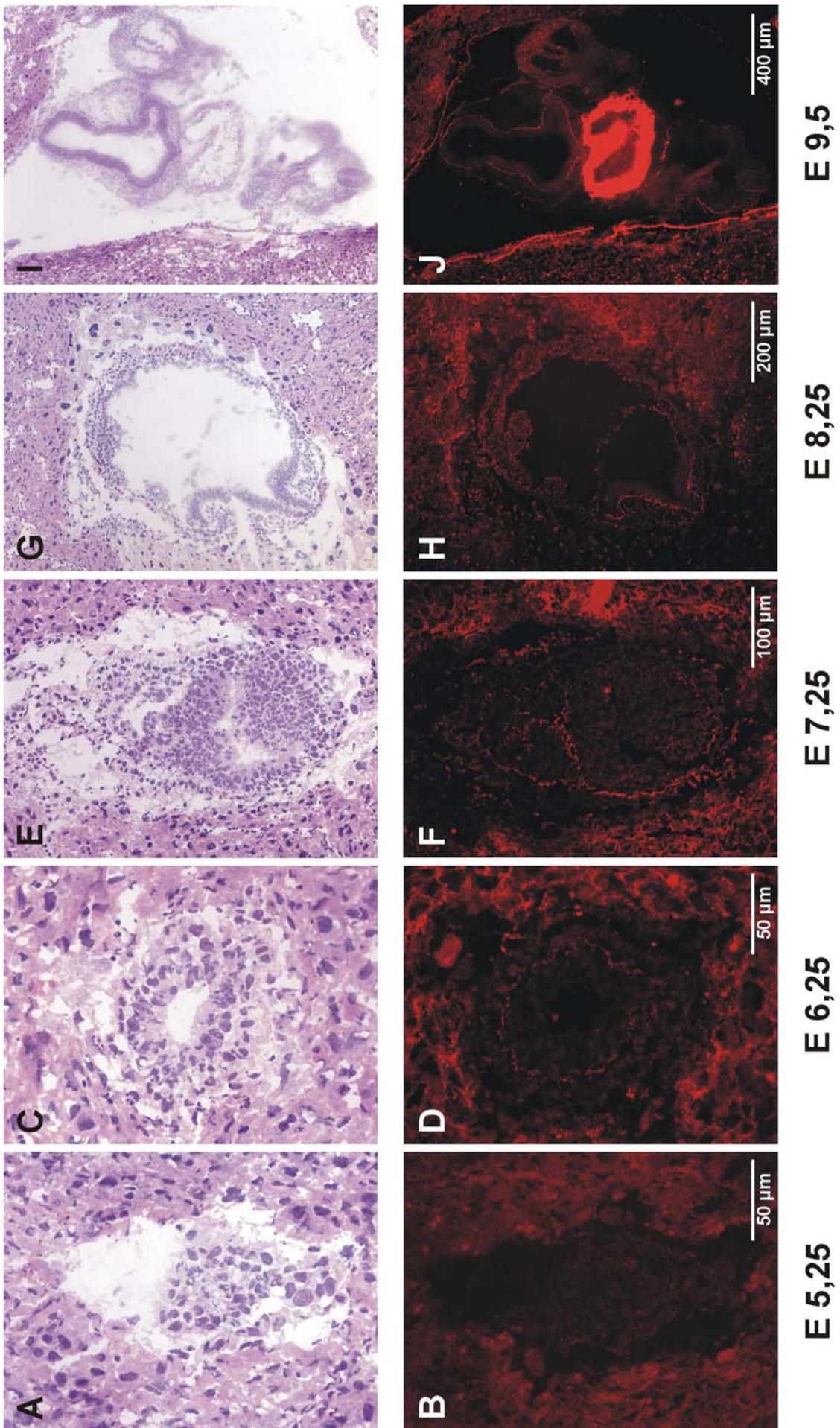
Wichtige Zeitpunkte während der Entwicklung sind mit rot, die untersuchten Embryonalstage mit grüner und die verschiedenen Entwicklungsprozesse mit kursiver Schrift gekennzeichnet; dabei ist der Beginn des Prozesses mit einem senkrechten Strich gekennzeichnet, die Länge des gestrichelten Pfeils über den Entwicklungsstadien aber nicht proportional zur deren Dauer.

Teil II: Histologische Übersicht (siehe folgende Seiten).

A, C, E, G, I, K, M, O, Q, S: Hämatoxylin-Eosin-Färbung

B, D, F, H, J, L, N, P, R, T: mit dem anti-Testican-2-Antikörper inkubierter Schnitt, visualisiert mit einem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper (B, D, F, H, J) oder einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper und anschließender Inkubation mit DAB-Farbstoff (L, N, P, R, T).

Teil II (1)



Teil II (2)



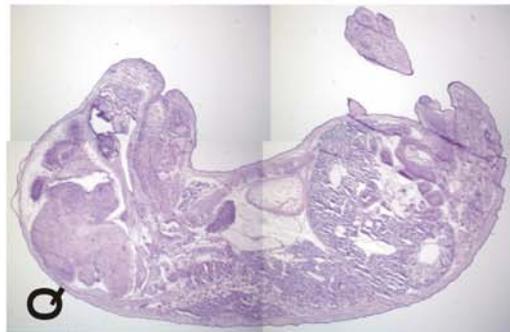
K



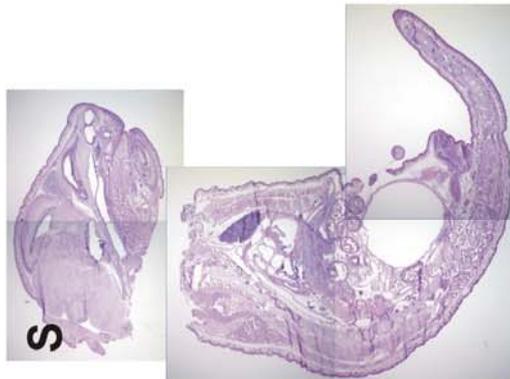
M



O



Q



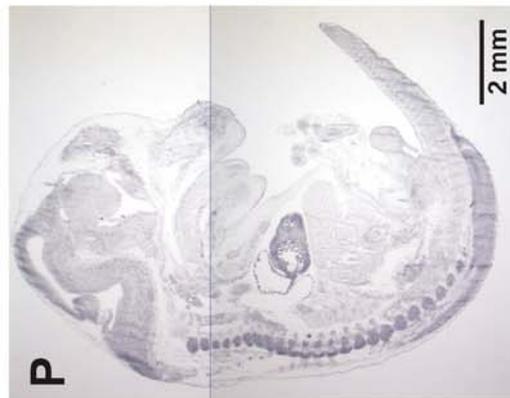
S



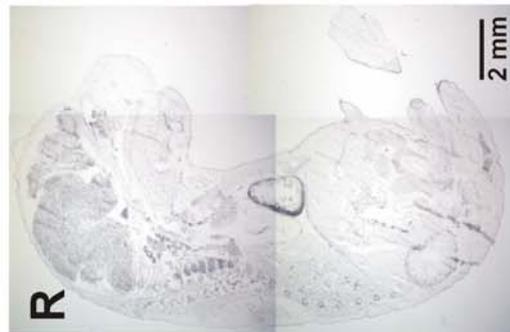
L



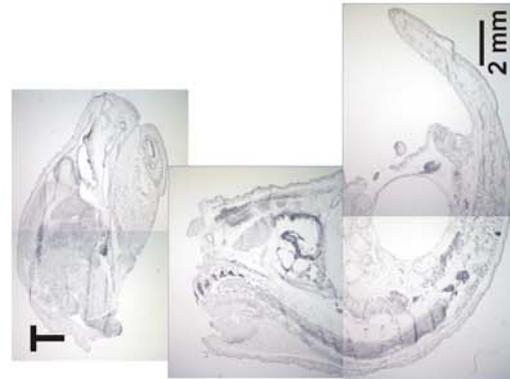
N



P



R



T

1 mm

2 mm

2 mm

2 mm

2 mm

E 10,5

E 12,5

E 14,5

E 16,5

P 1,5

2.3 Zellassays und Bindungsstudien mit Testican-2

Proteoglykane sind extrazelluläre, Membran-assoziierte oder Transmembran-Proteine, die neben strukturellen Aufgaben auch Einfluss auf die Bindung von Zellen nehmen und dabei sowohl hemmend wirken als auch die Bindung fördern können. Ob Zellen auch an Testican-2 binden und über welche Bindungspartner bzw. Rezeptoren eine mögliche Zellbindung stattfindet, wurde im Folgenden untersucht.

2.3.1 Zelladhäsionsassays

Zur Analyse, ob Zellen an Testican-2 als Substrat binden können, wurden humane Keratinozyten (HaCaT-Zellen) und humane Fibroblasten (WI26-Zellen) verwendet. Wie zuvor gezeigt werden konnte, exprimiert keine der beiden Zelllinien endogen Testican-2 (*siehe Abb. 2.13*). Für die Untersuchung der Zellbindung wurden, wie unter 4.2.5.1 beschrieben, Einzelzell-Suspensionen in Wells einer mit unterschiedlichen Mengen an Testican-2 beschichteten 96-Well-Platte inkubiert, nicht adhärierte Zellen gewaschen und die gebundenen Zellen mit Kristalviolett-Lösung sichtbar gemacht. Das Kristalviolett wurde durch Inkubation mit einer Triton-Lösung wieder aus den Zellen herausgelöst und die Anzahl adhärierter Zellen durch Messung der Extinktion der farbigen Triton-Lösung bei 450 nm mit einem ELISA-Reader bestimmt. Als Positivkontrolle fand humanes Fibronectin (Fibronectin) bzw. bovines Collagen Typ I (Col I) Verwendung. Wie laut Literatur bekannt ist, binden beide Zelllinien aufgrund der an ihrer Zelloberfläche befindlichen Integrine an diese Proteine [HaCaT: Koivisto et al., 1999; Scharffetter-Kochanek et al., 1992 und WI26 bzw. WI38: Akiyama et al., 1989; Heino et al., 1989], wenn auch unter den hier gewählten Bedingungen unterschiedlich stark (*siehe Abb. 2.35*).

Um eventuelle Unterschiede der zwei verschiedenen Formen von Testican-2 zu bestimmen, wurden sowohl die GAG-freie (Testican-2 (67 kDa)) als auch die GAG-haltige Form von Testican-2 (Testican-2 (80 kDa)) untersucht.

In *Abb. 2.35* ist deutlich eine konzentrationsabhängige Adhäsion beider Zelllinien an Testican-2 zu erkennen. Beim Testican-2-Coreprotein konnte mit steigender Konzentration eine zunehmende Bindung der Zellen detektiert werden, die bei einem Proteingehalt von etwa 10-15 µg/ml ihre Sättigung erreichte. Kurven mit ähnlichem Verlauf konnten auch für die beiden Kontrollen Fibronectin und Collagen Typ I ermittelt werden, wobei die Werte von Testican-2 vergleichsweise niedriger waren. Für die GAG-haltige Form von Testican-2 ergab sich allerdings sowohl bei den WI26- als auch bei den HaCaT-Zellen ein anderer und ungewöhnlicher Kurvenverlauf. Bei kleineren Konzentrationen stieg die Bindung erst bis zu einem Maximum an und fiel dann bei weiter zunehmender Konzentration wieder ab, bis keine Bindung mehr zu bestimmen war.

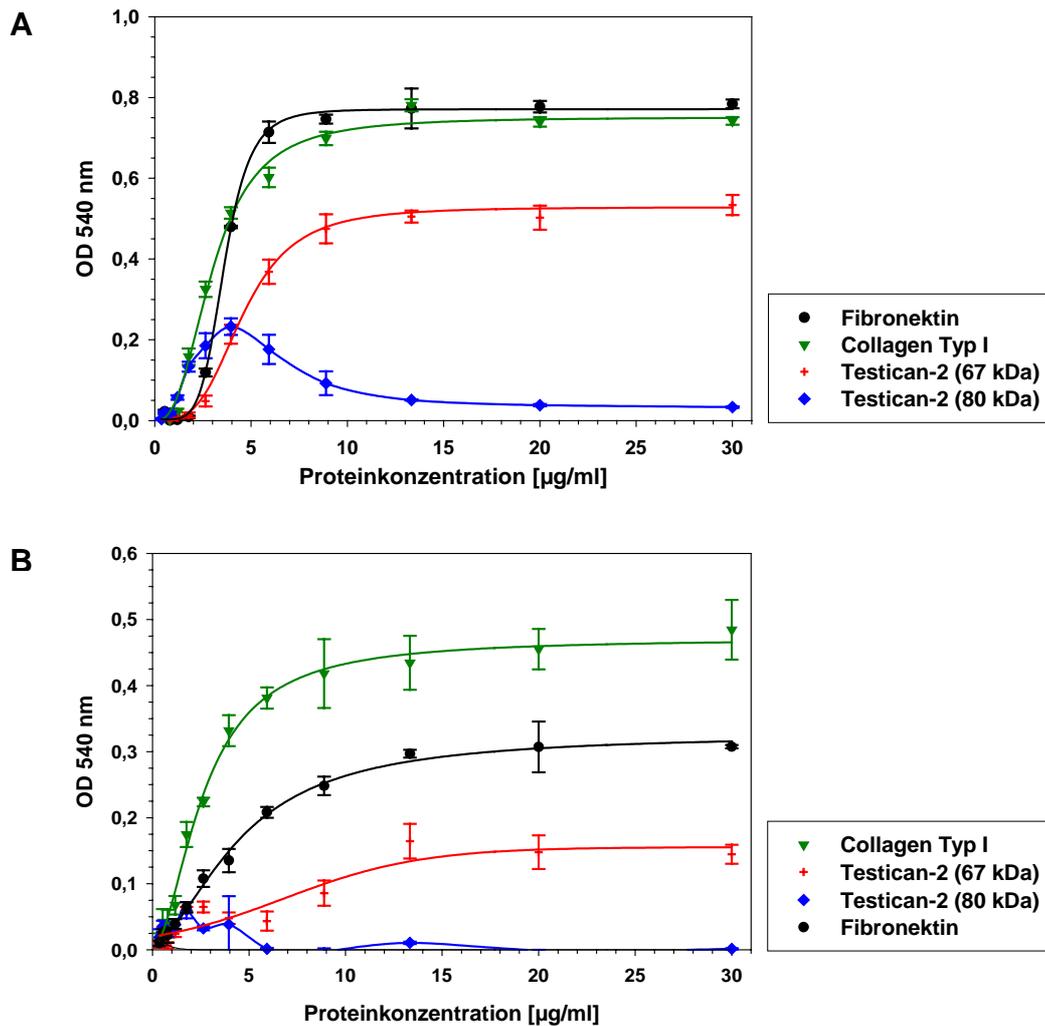


Abb. 2.35: Bindung von Fibroblasten (WI26) und Keratinocyten (HaCaT) an Testican-2

96-Well-Platten wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Collagen Typ I und/oder humanes (h) Fibronectin und den unterschiedlichen Formen von rekombinantem Testican-2 über Nacht bei 4 °C beschichtet und nach dem Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit einer Suspension von **A:** Fibroblasten (WI26-Zellen) oder

B: Keratinozyten (HaCaT-Zellen)

für 30-40 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Waschen wurden die adhärenierten Zellen fixiert, mit Kristalviolett angefärbt und mit einer Triton-Lösung solubilisiert. Die Menge an herausgelöstem Farbstoff war proportional zur Anzahl an gebundenen Zellen und wurde mittels Extinktion bei einer Wellenlänge von 540 nm bestimmt und dann gegen die Proteinkonzentration aufgetragen.

Bei der Betrachtung von Aussehen bzw. Ausbreitung der an die verschiedenen Testican-2-Formen gebundenen Zellen war ebenfalls ein Unterschied zu erkennen, wie in *Abb. 2.36* am Beispiel der Fibroblasten zu sehen ist.

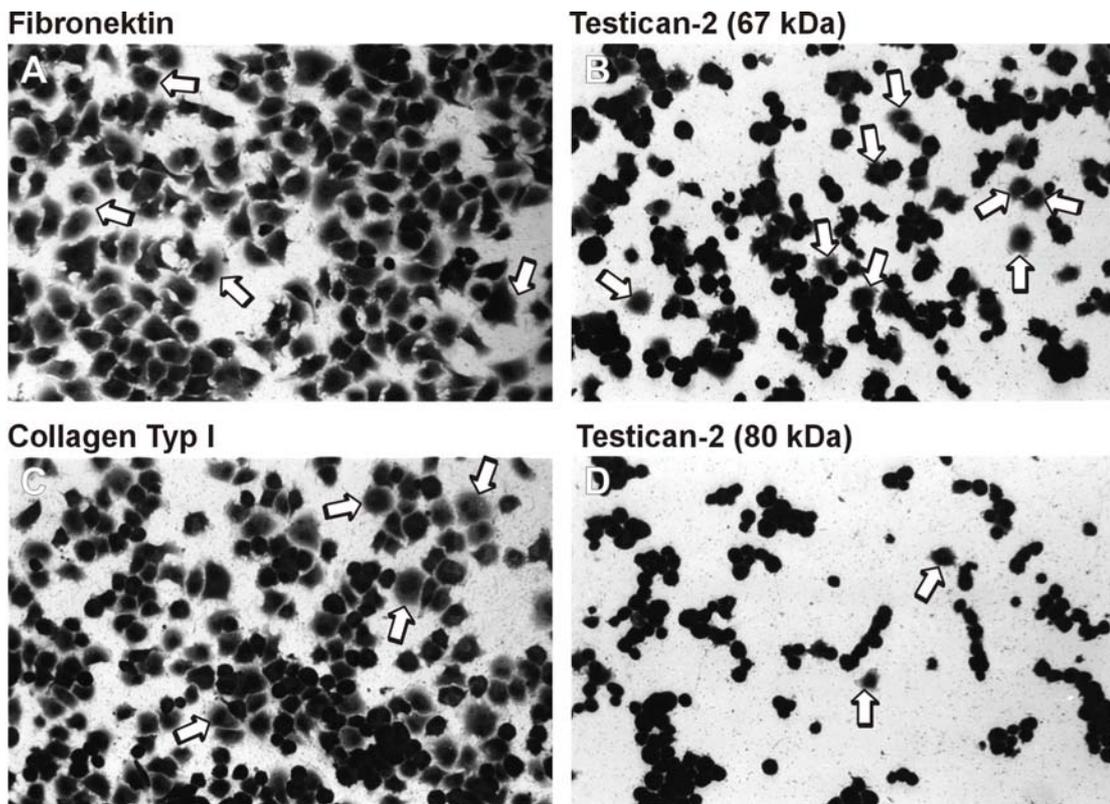


Abb. 2.36: Zellfotos des Zelladhäsionsassay von Fibroblasten (WI26) an hFibronectin (A), Collagen Typ I (C) und den beiden Formen von Testican-2 (B, D) aus Abb. 2.33-A

Die Pfeile deuten auf ausgebreitete Zellen hin. (Hinweis: Die Anzahl an Pfeilen ist nicht proportional zur Anzahl ausgebreiteter Zellen, bei den Positivkontrollen (Fibronectin und Collagen Typ I) wurden als Beispiel jeweils nur vier Zellen gekennzeichnet.)

Bei der Bindung der Fibroblasten an Fibronectin und Collagen Typ I war eine starke Ausbreitung der Zellen zu beobachten (Abb. 2.36-A/C). Zum Teil konnte dieses Phänomen auch bei an das Testican-2-Coreprotein adhären Zellen bestimmt werden (siehe Pfeile in Abb. 2.36-B), während die Zellen bei der Bindung an die GAG-Form von Testican-2 einfach nur ohne Ausbreitung anzuhaften schienen, da nur sehr vereinzelt ausgebreitete Zellen detektiert werden konnten (Abb. 2.36-D, Pfeile). Um zu klären, inwieweit das beobachtete unterschiedliche Bindungsverhalten der Testican-2-Formen mit der Anwesenheit der GAG-Ketten zusammenhing, wurde die Bindung nach Abspaltung der GAG-Ketten untersucht. Dazu wurden zwei Doppelreihen einer ELISA-Platte mit der GAG-haltigen Form von Testican-2 beschichtet und der eine Teil des Proteins analog 2.2.1.3 mit Heparinase I/III und Chondroitinase ABC verdaut, während der andere Teil nur mit Puffer behandelt wurde. Danach erfolgte mit Fibroblasten der zuvor schon beschriebene Zelladhäsionsassay (4.2.5.1). Während ohne vorherige Inkubation mit den Lyasen bei steigender Konzentration von Testican-2 wieder keine Adhäsion mehr detektiert werden konnte, ergab sich nach Abspaltung der Zuckerketten mit zunehmender Testican-2-Konzentration eine stärker werdende Bindung, die bei etwa 10 µg/ml ihre Sättigung erreichte (Abb. 2.37). Eine ähnliche Kurve konnte zuvor auch schon bei der Bindung der Fibroblasten an das Coreprotein von Testican-2 detektiert werden (siehe Abb. 2.35-A). Dies bestätigte, dass die GAG-Ketten von Testican-2 die

Zellbindung behindern. (Die Bindung erscheint hier nicht so hoch, da aufgrund der Lyasenbehandlung weniger Protein und Zellen verwendet wurden.)

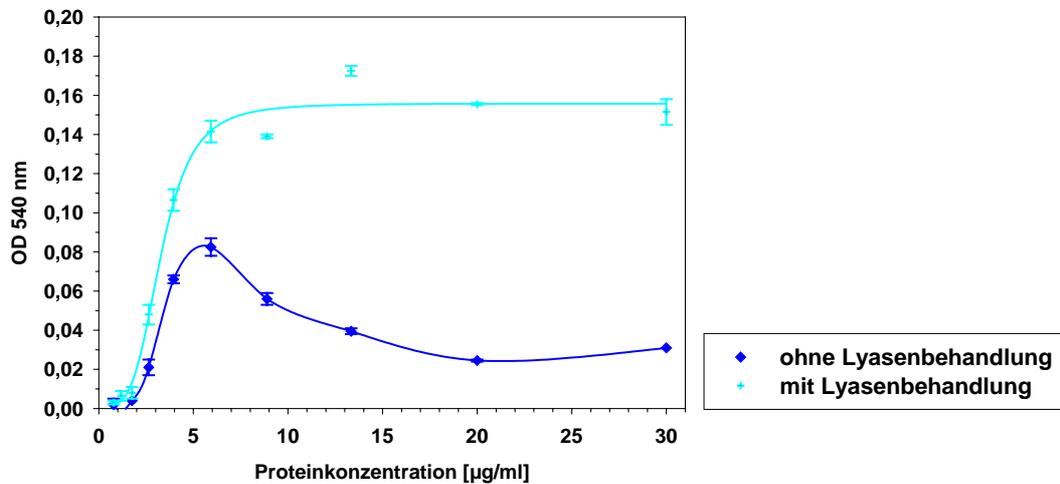


Abb. 2.37: Zelladhäsionsassay von Fibroblasten auf Testican-2(fl-80 kDa) mit und ohne Abspaltung der GAG-Ketten

Eine 96-Well-Platte wurde mit 2 Verdünnungsreihen von rekombinantem Testican-2(fl-80 kDa) über Nacht bei 4 °C beschichtet und ein Teil des gebundenen Proteins erst mit Heparinase I+III (2 h) und dann mit Chondroitinase ABC (1 h) inkubiert. Der andere Teil wurde nur mit Puffer versetzt. Nach dem Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurde die Platte mit einer Suspension von Fibroblasten (WI26-Zellen) für 30 min bei 37 °C inkubiert und nach dem Waschen die adhärenierten Zellen fixiert, mit Kristalviolett angefärbt und mit einer Triton-Lösung solubilisiert. Die Menge an herausgelöstem Farbstoff war proportional zur Anzahl an gebundenen Zellen und wurde mittels Extinktion bei einer Wellenlänge von 540 nm bestimmt und dann gegen die Proteinkonzentration aufgetragen.

Danach wurde der Einfluss verschiedener zweiwertiger Ionen auf die Bindung von Fibroblasten an Testican-2 bestimmt, wobei zum Vergleich Collagen Typ I, das dominante Collagen der interzellulären Matrix, verwendet wurde [Pilcher et al., 1997]. Wie zuvor gezeigt, binden Fibroblasten stark an dieses Protein (*siehe Abb. 2-35-A bzw. Abb. 2.36-C*) und die Adhäsion an Collagen Typ I ist Ionen-abhängig [z.B. Elices et al., 1991; Thamilselvan et al., 2003]. Die Ergebnisse dieses Versuches könnten auch einen Hinweis auf einen möglichen Bindungspartner bzw. Rezeptor von Testican-2 auf der Zelloberfläche geben. So bilden Integrine eine weit verbreitete Gruppe von Rezeptoren, die für die Ligandenbindung divalente Kationen benötigen.

Zu diesem Zweck wurde der Zellsuspension vor der Inkubation auf einer beschichteten Platte soviel Ionen-Lösung zugesetzt, das man auf eine Endkonzentration von 2 mM pro Ion kam, dies entspricht bei Calcium und Magnesium in etwa den physiologischen Konzentrationen. Dazu ist zu erwähnen, dass das Medium, in dem die Bindungsassays durchgeführt wurden, bereits 1,8 mM Ca^{2+} - und 0,8 mM Mg^{2+} -Ionen enthielt. Während die Erhöhung der Calcium-Konzentration auf 2 mM keinen Einfluss auf die Adhäsion der Fibroblasten an Testican-2 aufwies und 2 mM Magnesium die Zellbindung nur geringfügig erhöhte, konnte die Bindung an Testican-2 durch Zugabe von 2 mM Mangan verdoppelt werden (*Abb. 2.38*).

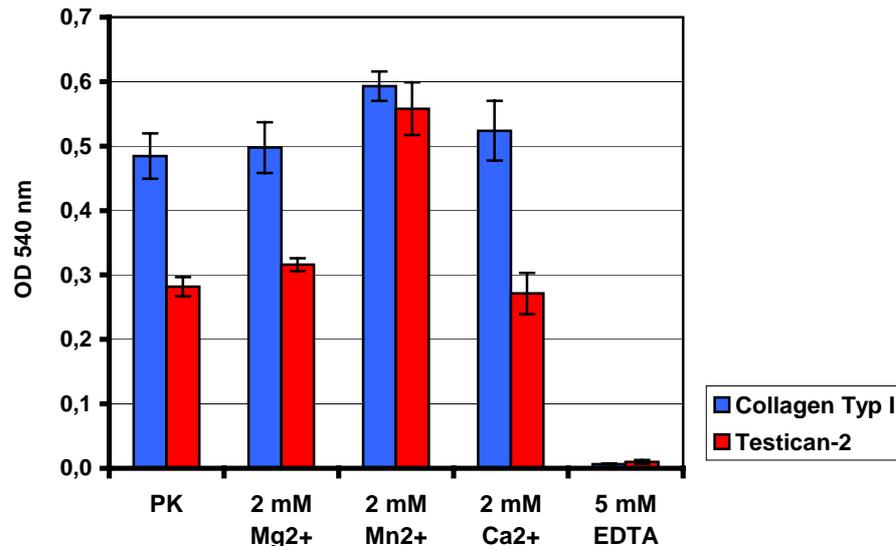


Abb. 2.38: Abhängigkeit der Zellbindung an Testican-2 von zweiwertigen Ionen

Je 10 µg Collagen Typ I und 30 µg Testican-2 (67 kDa) wurden pro Well an eine 96-Well-Platte gebunden und freie Bindungsstellen mit BSA blockiert. Eine WI26-Zellsuspension in serumfreiem Medium wurde mit Kationen-Lösungen {Magnesium (Mg²⁺), Calcium (Ca²⁺) und Mangan (Mn²⁺)} bis zu einer Endkonzentration von 2 mM versetzt. Als Negativkontrolle wurde einigen Aliquots Zellsuspension 5 mM EDTA zugefügt. Die Zellen wurde auf den Substraten für 30 min bei 37 °C inkubiert, gewaschen, angefärbt und die Extinktion bei 540 nm ermittelt.

Ein ähnlicher Ionen-Einfluss konnte auch bei der Zellbindung an Collagen beobachtet werden, nur in abgeschwächter Form. Dahingegen ist nach Zugabe von EDTA und damit nach Entzug aller zweiwertigen Ionen, in beiden Fällen keine Bindung mehr zu detektieren. Der Einfluss von EDTA wies auf eine Abhängigkeit des potentiellen Testican-2-Bindungspartners von zweiwertigen Ionen hin. Da die Erhöhung des Bindungssignals nach Zugabe von Mn²⁺ häufig bei durch Integrine vermittelter Zellbindung zu beobachten war [Elices et al., 1991; Luque et al., 1994], könnte es sich bei dem Bindungspartner von Testican-2 um ein Integrin handeln.

2.3.2 Inhibitionsassay

Integrine bilden eine große Gruppe von Zelladhäsionsrezeptoren und spielen eine wichtige Rolle in vielen biologischen Prozessen. Sie sind aus jeweils einer α - und einer β -Untereinheit aufgebaut, die beide Transmembran-Proteine darstellen und zusammen für die Ligandenbindung verantwortlich sind. Durch Kombination der verschiedenen vorkommenden Untereinheiten werden eine Vielzahl von Integrinen gebildet, die in unterschiedliche Subfamilien unterteilt werden könnten und unterschiedliche Bindungspartner haben [Hynes, 2002]. Um herauszufinden, ob Testican-2 tatsächlich über Integrine an Zellen bindet, wurde versucht, die Zelladhäsion mit Hilfe geeigneter anti-Integrin-Antikörper zu inhibieren. Auf der Zelloberfläche von HaCaT-Zellen können laut Literatur folgende Integrine gefunden werden: $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ [Scharffetter-Kochanek et al., 1992] sowie $\alpha 5\beta 1$, $\alpha V\beta 1$, $\alpha V\beta 6$ [Koivisto et al., 1999] und $\alpha 6\beta 4$ [Hintermann et al., 2001], aber auch die $\alpha 1$ -Untereinheit ist nachweisbar [Becker et al., 2002]. Die WI26-Zellen präsentieren u.a. $\alpha 3\beta 1$ -Integrine auf ihrer Zellober-

fläche [Vignola et al., 2000]; die den WI26-Zellen nahe verwandten WI38-Zellen weisen $\alpha 2\beta 1$ - und $\alpha 5\beta 1$ -Integrine auf [Carter et al., 1990; Heino et al., 1989], sowie $\alpha 1\beta 1$ - und $\alpha 3\beta 1$ -Integrin [Heino et al., 1989], $\alpha 6\beta 1$ -Integrine [Frau Prof. Aumailley, persönliche Mitteilung] und $\alpha v\beta 3$ -Integrin [Ignotz et al., 1989].

Integrine mit einer $\beta 1$ -Untereinheit sind innerhalb der Integrin-Familie am häufigsten zu finden, da sie auch die meisten unterschiedlichen Kombinationen eingehen können [s. Abb. 1.2 aus Hynes, 2002]. Mitglieder dieser $\beta 1$ -Subfamilie binden an ECM-Komponenten wie Collagene, Laminin und Fibronectin [Hemler, 1990] und werden in humanen Geweben häufig exprimiert. Auch die meisten Integrine der untersuchten Zelllinien weisen diese Untereinheit auf [HaCaT: s.o.; WI38: Heino et al., 1989]. Deswegen wurden die Inhibitionsversuche mit einem Antikörper gegen die $\beta 1$ -Untereinheit begonnen. Dazu wurde eine Zellsuspension vor Inkubation auf einer mit Protein beschichteten Platte mit verschiedenen Konzentrationen an anti- $\beta 1$ -Integrin-Antikörper versetzt und dann der Bindungsassay wie zuvor beschrieben durchgeführt. Im Gegensatz zu den Adhäsionsassays wurde in diesem Fall die Platte immer mit der gleichen Menge an Protein beschichtet. Die gewählte Konzentration entspricht dem Sättigungsbeginn bei den Adhäsionsassays und wurde aus der Sättigungskurve (siehe Abb. 2.35) bestimmt.

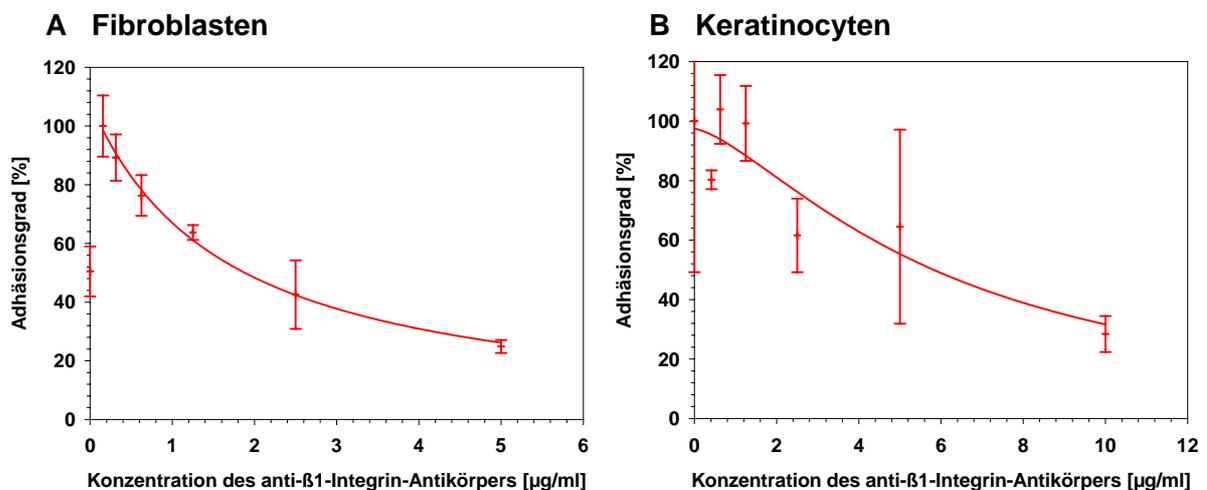


Abb. 2.39: Inhibition der Zellbindung an Testican-2 (67 kDa) mit einem anti- $\beta 1$ -Integrin-Antikörper von

A: Fibroblasten (WI26-Zellen)

B: Keratinozyten (HaCaT-Zellen)

Eine 96-Well-Platte wurde mit je 20 $\mu\text{g/ml}$ Testican-2(67 kDa) beschichtet. Die Zellsuspension wurde vor der Inkubation auf der Platte mit verschiedenen Konzentrationen von anti- $\beta 1$ -Integrin-Antikörper versetzt, auf der Platte inkubiert, angefärbt und die Extinktion bei 540 nm vermessen. Die Anzahl adhärierter Zellen ist hier als Adhäsionsgrad [%] dargestellt. Der Adhäsionsgrad ergibt sich als Extinktion nach Zugabe verschiedener Mengen an anti- $\beta 1$ -Integrin-Antikörper (die proportional zur Anzahl der jeweilig adhärierenden Zellen ist) geteilt durch die maximale Extinktion. Bei den Keratinocyten wurde für die Berechnung des Adhäsionsgrades die bei der Negativkontrolle (0 $\mu\text{g/ml}$) ermittelte Extinktion eingesetzt (**B**). Da dieser Wert bei den WI26-Zellen (**A**) einen Ausreißer darstellt, wurde hier als Grundlage für die Rechnung die Extinktion der geringsten Konzentration an inhibierenden Antikörper (0,16 $\mu\text{g/ml}$) verwendet.

Bei beiden Zelllinien konnte man beobachten, dass die Bindung an Testican-2 durch Zugabe des anti- β 1-Integrin-Antikörpers deutlich zu inhibieren war. Die Inhibition nahm mit steigender Menge an Antikörper zu und erreichte bei einer Antikörper-Konzentration von 5 μ g/ml (Fibroblasten) bzw. 10 μ g/ml (Keratinocyten) einen Wert von 70 % und damit einen Adhäsionsgrad von nur noch 30 % (Abb. 2.39). Um die Inhibition des Antikörpers in Prozent ausdrücken zu können, wurde die der Anzahl an adhärerten Zellen proportionale Extinktion in den „Adhäsionsgrad“ umgerechnet. Der Adhäsionsgrad ergibt sich als Extinktion nach Zugabe verschiedener Mengen an anti- β 1-Integrin-Antikörper geteilt durch die maximale Extinktion. Eigentlich sollte die maximale Extinktion und damit die größte Menge adhärerender Zellen bei der Negativkontrolle (0 μ m/ml) zu messen sein (HaCaT-Zellen, siehe Abb. 2.39-B). Da dieser Wert bei den WI26-Zellen einen Ausreißer darstellt (Abb. 2.39-A), wurde hier die Extinktion der geringsten Konzentration an inhibierenden Antikörper (bei 0,16 μ g/ml) für die Rechnung verwendet.

Integrine bestehen, wie schon erwähnt, immer aus einer α - und einer β -Untereinheit, die beide an der Ligandenbindung beteiligt sind. Um auch die α -Untereinheit des Integrins zu bestimmen, an das Testican-2 möglicherweise bindet, wurden erste Inhibitionsversuche mit einem anti- α 1-Integrin-Antikörper und einem anti- α 6-Integrin-Antikörper durchgeführt (*nicht gezeigt*). Bei der Inhibition von α 6-Integrin wurde Laminin als Positivkontrolle verwendet, da diese Untereinheit in Laminin-bindenden Integrinen zu finden ist (α 6 β 1 und α 6 β 4) [Hirosaki et al., 2002]. Die Bindung der α 1-Untereinheit wurde zur Kontrolle parallel auf Collagen Typ I inhibiert, da α 1 β 1-Integrin an dieses Protein bindet [Wayner und Carter, 1987; Rich et al., 1999].

Bei der Inhibition der Zellbindung von WI26-Zellen mit dem anti- α 6-Integrin-Antikörper konnte für die Positivkontrolle (EHS-Laminin) eine eindeutige Blockierung der Zellbindung festgestellt werden. Auf die Bindung der Fibroblasten an Testican-2 hatte der anti- α 6-Integrin-Antikörper keinen Einfluss. Der anti- α 1-Integrin-Antikörper zeigte weder bei Testican-2, noch bei der Positivkontrolle Col I einen Inhibition der Zelladhäsion. Dieser Antikörper schien also entgegen der Herstellerangabe allgemein keine blockierende Wirkung zu haben.

2.3.3 Bindungsstudien mit rekombinanten Integrinen

Mit Hilfe der Inhibitionsversuche konnte die β -Untereinheit des Integrin-Bindungspartners von Testican-2 bestimmt werden, nicht aber die α -Untereinheit. Eine Möglichkeit, die hier erworbenen Daten zu verifizieren und zusätzlich die α -Untereinheit zu ermitteln, bot die Untersuchung der direkten Bindung von Testican-2 an die Integrine. Diese Versuche wurde von Herrn Dr. Johannes Eble (Institut für Physiologische Chemie, Universität Münster) mit verschiedenen, rekombinant exprimierten, löslichen Integrin-Konstrukten durchgeführt, die nur aus den extrazellulären Domänen bestanden (vgl. Abb. 1.3). Die Bindungsstudien erfolgten auf Mikrotiterplatten (96-Well) mit der 67 kDa-Form von rekombinantem Testican-2 mittel eines „ELISA-Style-Assay“, d.h. Testican-2 wurde an eine Mikrotiterplatte

gebunden, freie Bindungsstellen blockiert und nach Inkubation mit den löslichen Integrin-Fragmenten gebundenes Protein mit Hilfe eines anti-Integrin-Antikörpers nachgewiesen und bei 405 nm photometrisch vermessen. Zunächst wurde die Bindung von $\alpha 1\beta 1$ -, $\alpha 2\beta 1$ -, $\alpha 3\beta 1$ - und $\alpha 5\beta 1$ -Integrin an Testican-2 untersucht. Als Negativkontrolle wurde das Blockierungsreagenz (BSA) und als Positivkontrolle ein extrazelluläres Typ IV-Collagen-Fragment (CB3) verwendet, das aus der Col1-Domäne besteht und stark an verschiedene Integrine bindet [Vandenberg et al., 1991]. Die Bindungsstudien wurden jeweils unter drei verschiedenen Bedingungen durchgeführt: mit Zugabe von Mangan, das die Integrin-Bindung unterstützt, mit zusätzlicher Zugabe eines die Integrin-Bindung noch weiter verstärkenden Antikörpers (9EG7) und in Anwesenheit von EDTA. EDTA sollte die Bindung gänzlich inhibieren und diente als Kontrolle für die Spezifität einer möglichen Integrin-Bindung.

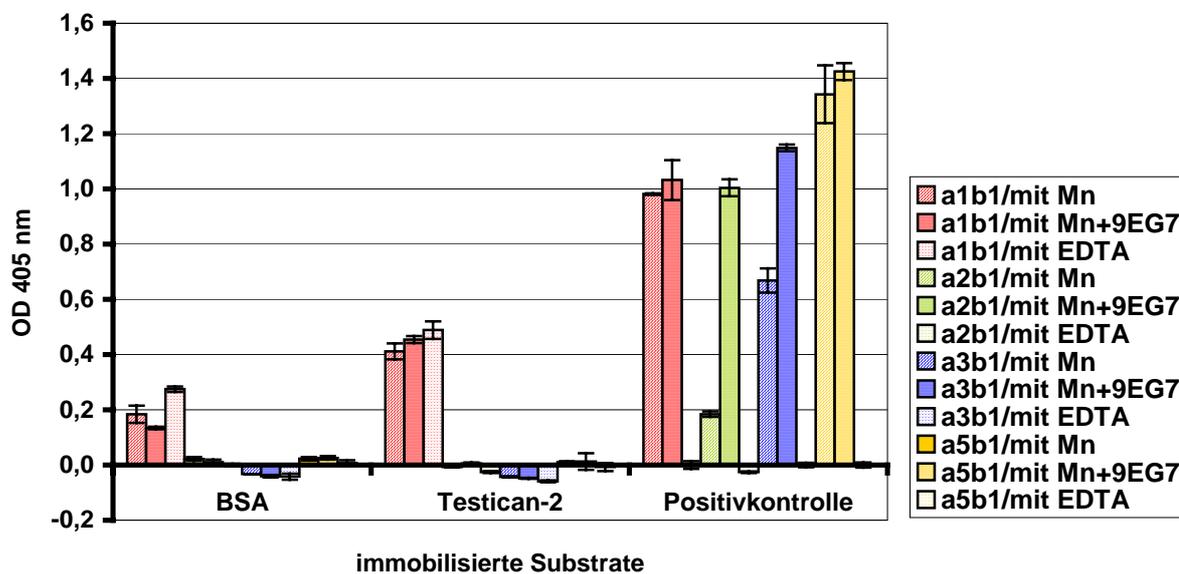


Abb. 2.40: Untersuchung der Bindung von verschiedenen löslichen Integrinen an Testican-2(67 kDa)

Testican-2 wurde zusammen mit einer Negativkontrolle (BSA) und einer Positivkontrolle an eine 96-Well-Platte gebunden, geblockt und mit $\alpha 1\beta 1$ -, $\alpha 2\beta 1$ -, $\alpha 3\beta 1$ - und $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Lösungen in Anwesenheit von Mangan (Mn), Mangan in Kombination mit einem die Bindung verstärkenden Antikörper (9EG7) bzw. EDTA inkubiert und das gebundene Integrin bei 405 nm detektiert. Als Positivkontrolle wurden ein Collagen Typ IV-Fragment ($\alpha 1\beta 1$), Collagen Typ I ($\alpha 2\beta 1$), Laminin-1 ($\alpha 3\beta 1$) und Fibronectin ($\alpha 5\beta 1$) verwendet. Legende: a= α , b= β

[Dieser Versuch wurde von Herrn Dr. Johannes Eble an der Universität Münster durchgeführt.]

Wie in Abb. 2.40 zu erkennen ist, zeigte das $\alpha 1\beta 1$ -Integrin-Konstrukt eine deutliche Bindung an rekombinantes Testican-2, wohingegen bei $\alpha 2\beta 1$ -, $\alpha 3\beta 1$ - und $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Konstrukten überhaupt keine Bindung zu sehen war. Bei näherer Betrachtung der $\alpha 1\beta 1$ -Bindung fiel auf, dass der 9EG7-Antikörper zwar die Bindung, wie erwartet, etwas verstärkte, EDTA aber nicht die erwartete inhibierende Wirkung zeigte, sondern die Bindung sogar noch etwas zu verstärken schien. Aber auch bei der BSA-Kontrolle ergaben sich erhöhte Werte. Während die anderen Integrin-Konstrukte ($\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ und $\alpha 5\beta 1$) keine Bindung an BSA zeigten, konnte bei $\alpha 1\beta 1$ -Integrin eine leichte Bindung an BSA detektiert werden. Dabei war die Extinktion

in Anwesenheit von EDTA am höchsten, wie es auch bei Testican-2 beobachtet werden konnte.

Zur Bestätigung der Spezifität der Bindung von $\alpha 1\beta 1$ -Integrin an Testican-2 gab es zwei mögliche Wege: zum einen könnte man die Bindung des Integrins an denaturiertes im Vergleich zu nativem Testican-2 testen und zum anderen eine Titrationskurve der Bindung der beiden Proteine durchführen. Der Vergleich der Bindung von denaturiertem und nativem Testican-2 sollte eine Auskunft darüber geben, ob die Tertiärstruktur von Testican-2 für die Integrin-Bindung notwendig ist. Im Allgemeinen ist für die spezifische Bindung eines Proteins dessen dreidimensionale Struktur wichtig. Verliert es diese z.B. durch Denaturierung, sollte die Bindung nicht mehr stattfinden. Ist diese dennoch zu detektieren, handelt es sich vermutlich um eine unspezifische Bindung. Mit Hilfe einer Titrationskurve könnte man die Entwicklung der durch EDTA und Mangan bedingten Bindungen verfolgen und sehen, wo eine Sättigung eintritt.

Mit dem erstgenannten Experiment wurde begonnen. Ein Vorversuch ergab, dass die Tertiärstruktur von Testican-2 durch Reduktion der 12 Disulfidbrücken mit Dithiothreitol (DTT) und anschließender Alkylierung mit Jodacetamid (JAA) ausreichend zerstört werden konnte (Abb. 2.41-A). Die folgende Bindungsstudie wurde wieder unter den zuvor beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

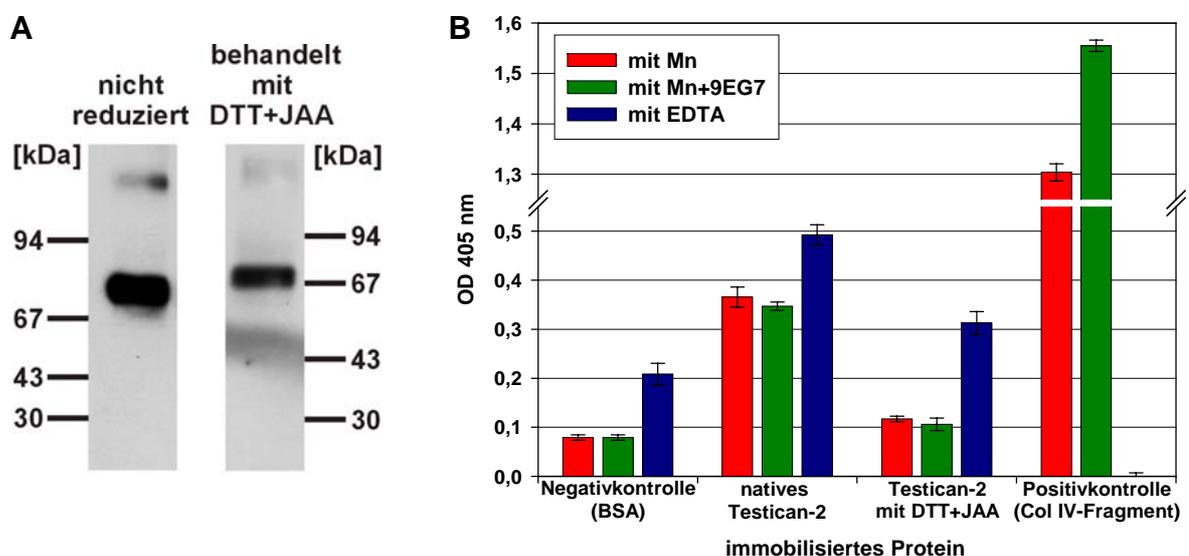


Abb. 2.41: Untersuchung der Bindung von $\alpha 1\beta 1$ -Integrin an Testican-2 ohne und mit Denaturierung

A: Western-Blot-Analyse der 67 kDa-Fraktion von Testican-2 nach Denaturierung bzw. Reduktion mit Dithiothreitol (DTT) und Alkylierung mit Jodacetamid (JAA)

B: Bindungsassay von nativem und denaturiertem (s.o.) rekombinantem Testican-2 an $\alpha 1\beta 1$ -Integrin in Anwesenheit von Mangan (Mn), Mangan in Kombination mit einem die Bindung verstärkenden Antikörper (9EG7) oder EDTA

Als Negativkontrolle wurde BSA und als Positivkontrolle ein Collagen Typ IV-Fragment (CB3) verwendet.

[Der Versuch zu **B** wurde von Herrn Dr. Johannes Eble an der Universität Münster durchgeführt.]

In *Abb. 2.41-B* ist dargestellt, dass nach Denaturierung von Testican-2 die Stärke der Bindung von $\alpha 1\beta 1$ -Integrin an Testican-2 nahezu auf die Werte der Negativkontrolle (BSA) zurückging. Die Tertiärstruktur von Testican-2 ist demzufolge für die Bindung an $\alpha 1\beta 1$ -Integrin unbedingt notwendig und es handelt sich also wahrscheinlich um eine spezifische Bindung. Allerdings war auch hier wieder ein erhöhter Extinktionswert nach Zugabe von EDTA zu detektieren.

Die Titrationskurve ergab ebenfalls eine deutliche, wenn auch nicht sehr starke, spezifische Bindung von $\alpha 1\beta 1$ -Integrin an Testican-2 (*Abb. 2.42*). Die blaue Kurve stellt die korrigierte Bindungskurve von Testican-2 an $\alpha 1\beta 1$ -Integrin in Anwesenheit von Mangan dar. Sie ergibt sich aus den absoluten Extinktionswerten der Bindung von Testican-2 an $\alpha 1\beta 1$ -Integrin abzüglich der Werte für die Bindung der Negativkontrolle BSA an das Integrin unter diesen Bedingungen. Die grüne Kurve stellt die Differenz der absoluten Testican-2- und der BSA-Bindung an das Integrin-Konstrukt nach Zugabe von EDTA dar. Die rote Kurve wiederum ergibt sich aus der Differenz der blauen und grünen Kurve und zeigt die „reale“ Mangan-abhängige Bindung.

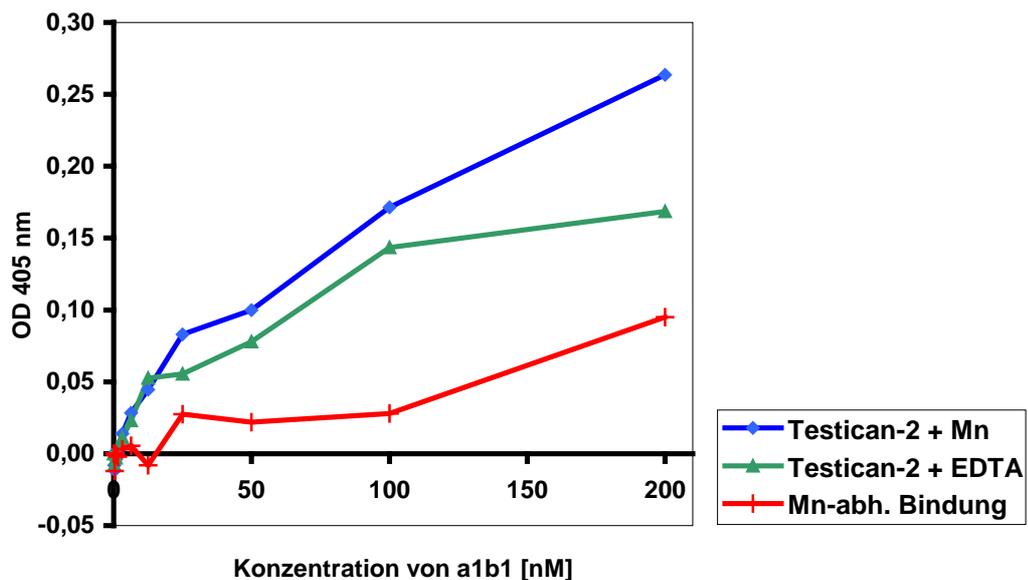


Abb. 2.42: Titrationskurve der Bindung von Testican-2 an $\alpha 1\beta 1$ -Integrin

Eine Verdünnungsreihe von $\alpha 1\beta 1$ -Integrin wurde als Substrat an eine 96-Well-Platte gebunden, Testican-2 (67 kDa) und BSA als Negativkontrolle in Anwesenheit von Mangan bzw. EDTA auf der Platte inkubiert und gebundenes Protein bei 405 nm vermessen. Für die dargestellten Werte wurden die Ergebnisse der Negativkontrolle von den für die Bindung von Testican-2 gemessenen Werten subtrahiert. Die blaue Kurve stellt die Bindungskurve des Integrins an Testican-2 in Anwesenheit von Mangan dar. Die grüne Kurve stellt die Differenz der beiden absoluten Testican-2- und EDTA-abhängigen Kurven nach Zugabe von EDTA da. Die rote Kurve wiederum ergibt sich aus der Differenz der blauen und grünen Kurve und zeigt die „reale“ Bindung.

[Dieser Versuch wurde von Herrn Dr. Johannes Eble an der Universität Münster durchgeführt.]

Während die EDTA-abhängige Bindungskurve bei einer $\alpha 1\beta 1$ -Integrinkonzentration von 200 nM abflacht und einer Sättigung entgegen strebt (Abb. 2.42, grüne Kurve), steigt die durch Mangan beeinflusste Bindungskurve weiter an (Abb. 2.42, blaue Kurve). Die resultierende „reale“ Bindung von Testican-2 an $\alpha 1\beta 1$ -Integrin (Abb. 2.42, rote Kurve) wächst folglich in diesem Bereich stärker an. Es gibt also eine reale spezifische Bindung von $\alpha 1\beta 1$ -Integrin an Testican-2, die allerdings nicht sehr stark ist. Der K_D -Wert der roten Kurve muss oberhalb von 200 nM liegen, da bis zu dieser Konzentration keine Sättigung zu beobachten war, und konnte daher unter diesen Bedingungen nicht genau bestimmt werden. Auch eine Wiederholung dieses Versuches mit einer höheren Konzentration an $\alpha 1\beta 1$ -Integrin ermöglichte keine Bestimmung des K_D -Wertes, da wieder keine Sättigung erreichbar war (nicht gezeigt).

Zur weiteren Verifizierung der Daten wurde nun auch auf Proteinebene versucht, die Bindung von Testican-2 an $\alpha 1\beta 1$ -Integrin mit geeigneten Antikörpern zu inhibieren (Abb. 2.43). Dabei wurden neben der Kontrolle ohne Antikörper der Einfluss des die Bindung fördernden Antikörpers 9EG7 und der Einfluss zweier die $\alpha 1$ -Untereinheit sowie von vier die $\beta 1$ -Untereinheit inhibierenden Antikörpern untersucht. Als Kontrolle wurde die Bindung in Anwesenheit von EDTA getestet und der Einfluss der erwähnten Antikörper auf die Integrin-Bindung an ein Collagen-Typ IV Fragment ermittelt.

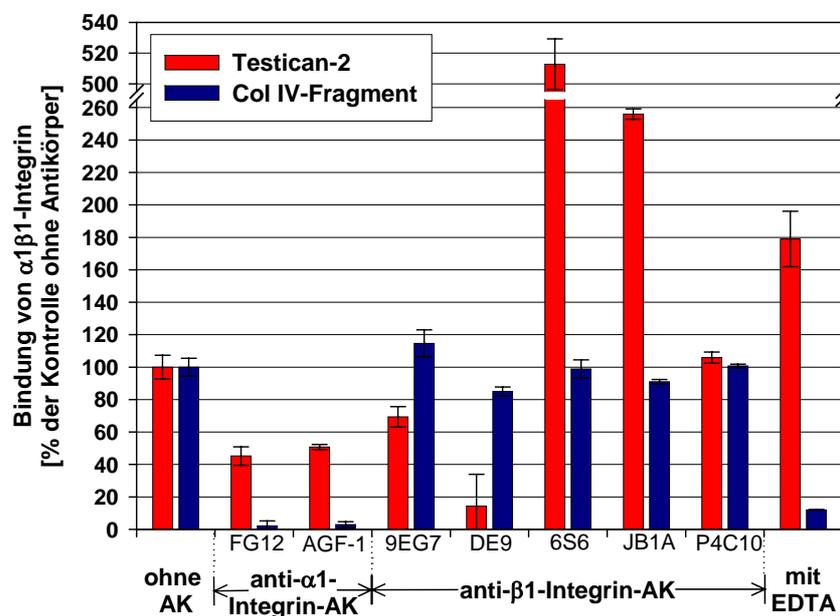


Abb. 2.43: Inhibition der Bindung von Testican-2 an $\alpha 1\beta 1$ -Integrin

Eine 96-Well-Platte wurde mit Testican-2 (67 kDa) und zur Kontrolle mit einem Collagen Typ IV-Fragment beschichtet und blockiert. Die $\alpha 1\beta 1$ -Integrinlösung wurde vor der Verwendung mit verschiedenen Antikörpern versetzt, auf der Platte inkubiert, angefärbt und die Extinktion bei 405 nm vermessen. Dabei wurden ein die Bindung verstärkender Antikörper (9EG7), zwei anti- $\alpha 1$ -Integrin-(FG12, AGF-1) und vier anti- $\beta 1$ -Integrin-Antikörper (DE9, 6S6, JB1A, P4C10) verwendet. Für die Positivkontrolle wurde kein Antikörper und für die Negativkontrolle EDTA zugesetzt.

[Dieser Versuch wurde von Herrn Dr. Johannes Eble an der Universität Münster durchgeführt.]

Die beiden anti- $\alpha 1$ -Integrin-Antikörper zeigten eine Inhibition der Bindung von etwa 50 % und bestätigten die $\alpha 1$ -Integrin-Untereinheit als Testican-2-Bindungspartner (s. Abb. 2.43). Der auch schon für die Zellassays verwendete anti- $\beta 1$ -Integrin-Antikörper (DE9) bewirkte mit etwa 85 % die stärkste Hemmung. Die anderen anti- $\beta 1$ -Integrin-Antikörper zeigten entweder kaum einen Effekt (P4C10) oder förderten die Testican-2-Bindung sogar noch (JB1A, 6S6). Das Bindungssignal von $\alpha 1\beta 1$ -Integrin an Testican-2 war wie zuvor in Gegenwart von EDTA höher und von 9EG7 geringer als ohne Zusätze (umgekehrter Effekt im Vergleich zur CB3-Bindung).

Zur Prüfung der physiologischen Signifikanz einer Bindung von $\alpha 1\beta 1$ -Integrin an Testican-2 wurde die Adhäsion von RuGli-Zellen an Testican-2 getestet (s. Abb. 2.44).

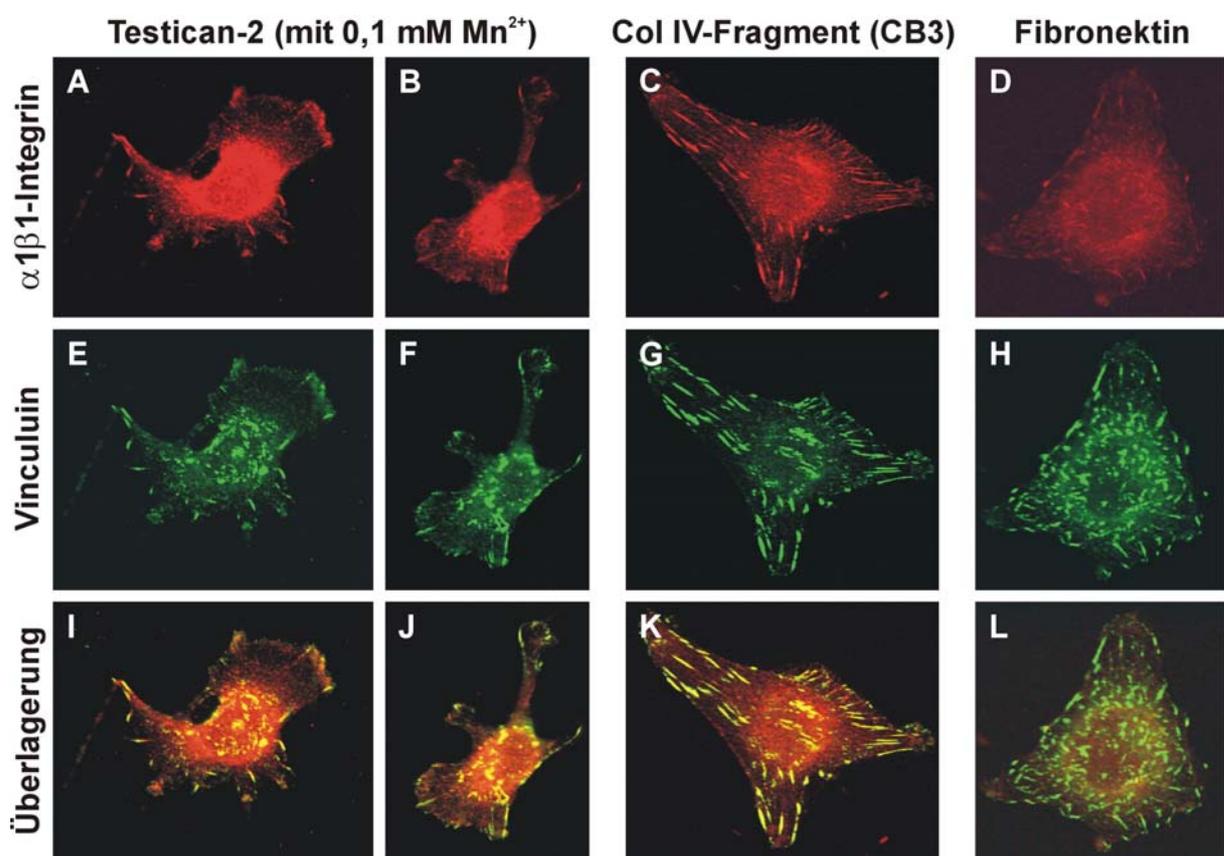


Abb. 2.44: Lokalisierung von $\alpha 1\beta 1$ -Integrin in RuGli-Zellen, die auf verschiedenen Substraten ausplatziert wurden

A/B, E/F, I/J: RuGli-Zellen auf Testican-2 (67 kDa) mit 0,1 mM Mn^{2+} (Konzentration an Testican-2 (67 kDa): 40 $\mu g/ml$)

C, G, K: RuGli-Zellen auf einem Collagen Typ IV-Fragment (CB3)

D, H, L: RuGli-Zellen auf Fibronectin

A-D: anti-Vinculin-Antikörper (Maus) + anti-Maus-Zweitantikörper (Alexa488-grün), **E-H:** anti- $\alpha 1\beta 1$ -Antikörper (Kaninchen) + anti-Kaninchen-Zweitantikörper (Alexa568-rot), **I-L:** Überlagerung der beiden Antikörper

[Dieser Versuch wurde von Herrn Dr. Johannes Eble an der Universität Münster durchgeführt.]

RuGli-Zellen sind Ratten-Gliom-Zellen, die sich durch eine große Menge an $\alpha 1\beta 1$ -Integrinen auf ihrer Zelloberfläche auszeichnen [Vandenberg et al., 1991; Perret et al., 2003]. Daneben

weisen sie noch $\alpha 2\beta 1$ - [Vandenberg et al., 1991], $\alpha 3\beta 1$ - [Gehlsen et al., 1988], $\alpha 5\beta 1$ -, $\alpha 7\beta 1$ - und $\alpha V\beta 3$ -Integrin [Grenz et al., 1993] auf. Da $\alpha 1\beta 1$ - und $\alpha 2\beta 1$ -Integrin Collagen-Rezeptoren darstellen [Hynes, 2002], binden RuGli-Zellen stark an Collagene und auch das als Positivkontrolle verwendete Collagen IV-Fragment (CB3) [Vandenberg et al., 1991], wobei bei der Collagen-Bindung hauptsächlich $\alpha 1\beta 1$ -Integrin nachgewiesen werden konnte [Grenz et al., 1993]. Die Zellen zeigten auch eine schwache Adhäsion an Fibronectin, die über $\alpha 3\beta 1$ - [Gehlsen et al., 1989] oder $\alpha 5\beta 1$ -Integrin [Grenz et al., 1993] erfolgt.

Bei der Adhäsion von Zellen an ein Substrat werden fokale Kontakte ausgebildet, an denen Zellen ihren nächsten Kontakt mit dem Substrat eingehen. Sie stellen die primäre stabilisierende Kraft der kultivierten Zelle dar und bilden den Ort für die Initialisierung von Actinhaltigen Stressfibrillen [Carter et al., 1990]. Vor allem Transmembran-Rezeptoren der Integrin-Familie, aber auch andere Adaptorproteine bilden dabei die physikalische Brücke zwischen dem extrazellulären Substrat und dem Aktin-Cytoskelett [Wehrle-Haller und Imhof, 2002]. Zur Markierung fokaler Kontakte kann ein Antikörper gegen Vinculin verwendet werden. Bei Vinculin handelt es sich um ein Cytoskelett-gebundenes Protein, das im Bereich der fokalen Kontakte prominent zu finden ist [Zamir und Geiger, 2001].

Die RuGli-Zellen adhärirten in Gegenwart von 0,1 mM Mn^{2+} -Ionen an Testican-2 (*Abb. 2.44*). Dabei war zu erkennen, dass das $\alpha 1\beta 1$ -Integrin bei dieser Adhäsion in Vinculin-positiven fokalen Kontakten lokalisiert war (*Abb. 2.44-I/J*) - ähnlich, aber nicht so stark wie bei der Positivkontrolle CB3 (*Abb. 2.44-K*). Die Zellen adhärirten auch an Fibronectin, breiteten sich aber nicht so sehr aus und in den Vinculin-positiven Zellkontakten konnte kein $\alpha 1\beta 1$ -Integrin detektiert werden (*Abb. 2.44-L*). Da, wie zuvor nachgewiesen, Testican-2 weder an $\alpha 2\beta 1$ -, $\alpha 3\beta 1$ - noch an $\alpha 5\beta 1$ -Integrin bindet (*s. Abb. 2.40*), erfolgte die Bindung der RuGli-Zellen an Testican-2 vermutlich über $\alpha 1\beta 1$ -Integrin, auch wenn eine Bindung über $\alpha V\beta 3$ bzw. $\alpha 7\beta 1$ nicht ausgeschlossen werden kann, insbesondere, da nach neuesten Untersuchungen (Februar 2004) von Dr. Johannes Eble eine Bindung von Testican-2 auch an $\alpha 7\beta 1$ gezeigt werden konnte.

Testican-2 ist somit ein Ligand für $\alpha 1\beta 1$ -Integrin, wenn auch mit geringer Affinität, und Zellen können tatsächlich über $\alpha 1\beta 1$ -Integrin an Testican-2 adhärirten.

3 Diskussion

3.1 Charakterisierung und Reinigung des Testican-2-Antikörpers

Die Charakterisierung des Testican-2-Antiserums ergab innerhalb der Testican-Familie eine hohe Spezifität für Testican-2 (*Abb. 2.1*). Da aber bei Western-Blot-Analysen von Gewebeextrakten keine für Proteoglykane typische, polydisperse Bande zu beobachten war, wie sie bei rekombinantem Testican-2 detektiert werden konnte, sondern nur distinkte, möglicherweise von unspezifischen Antikörpern verursachte Banden verschiedener Größe (*Abb. 2.2*), wurde das Antiserum einer Affinitätschromatographie mit einer Antigensäule unterzogen.

Der gereinigte anti-Testican-2-Antikörper zeigte sowohl unter nativen (Slot-Blot) als auch denaturierenden und reduzierenden Bedingungen (Western-Blot) eine hohe Spezifität gegenüber rekombinantem Testican-2 und es konnte keinerlei Kreuzreaktivität gegenüber den beiden andern Testicanen und weiteren Mitgliedern der BM-40-Familie nachgewiesen werden (*Abb. 2.3*). Auch bei der Western-Blot-Analyse verschiedener Gewebeextrakte waren im Wesentlichen plausible Signale zu detektieren. Aufgrund des Bandenmusters von rekombinantem Testican-2 war im Gewebe eine distinkte Bande mit apparentem Molekulargewicht von etwas unter 65 kDa für die GAG-freie Form bzw. eine polydisperse Bande oberhalb von 80 kDa für die GAG-haltige Form von Testican-2 zu erwarten. In Extrakten distinkter Gehirnbereiche, die analog zu den Ergebnissen der *in situ*-Hybridisierung [Vannahme et al., 1999] alle Signale für Testican-2 zeigten (*Abb. 2.4-A*), sowie von Hypophyse, konnte sowohl das potentielle Coreprotein-Signal als auch eine polydisperse Bande nachgewiesen werden. Darüber hinaus waren in Gehirnextrakt aber noch zwei weitere distinkte Banden zu erkennen (45 kDa, 130 kDa). Bei dem kleineren dieser beiden Signale könnte es sich um ein proteolytisches Fragment von Testican-2 handeln, da bei dem nahe verwandten Testican-1 Fragmente vergleichbarer Größe (35-38 kDa) in humanem Blutplasma nachgewiesen werden konnten. Diese sind durch proteolytische Spaltung innerhalb der TY-Domäne entstanden und repräsentieren den C-Terminus von Testican-1 inklusive GAG-Ketten [BaSalamah et al., 2001]. Weil die TY-Domäne sowie die potentiellen Spaltstellen zwischen Testican-1 und Testican-2 hoch konserviert sind, wäre auch bei Testican-2 die Entstehung proteolytischer Spaltprodukte denkbar. Das Auftreten einer distinkten Bande mit hohem apparentem Molekulargewicht war zwar bei einem Proteoglykan unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen unerwartet, das Signal könnte aber spezifisch sein, da die in Blutplasma beschriebene Form von Testican-1 vor der proteolytischen Spaltung ebenfalls eine distinkte Bande bei 130 kDa aufwies. Diese wurde als Coreprotein mit einem hohen GAG-Anteil postuliert und die bei Proteoglykanen eher ungewöhnliche Schärfe der Bande mit einer erhöhten Stabilität dieser speziellen Testican-1-Form im Kreislauf erklärt [BaSalamah et al.,

2001]. Gegen diese Annahme sprach im Fall von Testican-2 allerdings das Elutionsverhalten besagter Bande bei Anreicherung von nativem Testican-2 aus Gehirnextrakt mittels DEAE, da sie im Gegensatz zu der 45 kDa- und der polydispersen Bande bei einer niedrigen Salzkonzentration eluiert wurde und demzufolge nur eine geringe negative Ladung bzw. wenige GAG-Ketten aufweisen konnte. Dies warf zum ersten Mal die Frage nach der Spezifität des affinitätsgereinigten Antikörpers auf.

Die Western-Blot-Analyse von Extrakten nicht neuraler Gewebe zeigte ein deutlich anderes Bandenmuster als die Analyse von Nervengewebe-Extrakten (*Abb. 2.4-B*). Während bei Herz-, Muskel- und Nierenextrakt keine Signale nachzuweisen waren, konnte in Extrakten von Haut, Testis, Thymus, Ovarien, Lunge und Milz eine distinkte Bande auf Höhe des Coreproteins von rekombinantem Testican-2 (65 kDa) detektiert werden. Eine polydisperse Bande war nicht zu beobachten. Dieses Ergebnis könnte damit erklärt werden, dass es sich bei Testican-2 um ein sogenanntes „part-time“ Proteoglykan handelt, das nur zeitweise GAG-Ketten trägt und unterschiedliche Rollen von Testican-2 in und außerhalb des Nervensystems vermuten lassen. Allerdings zeigte das detektierte Expressionsmuster des Testican-2-Proteins in der adulten Maus Unterschiede zu den Ergebnissen von mRNA-Analysen [Vannahme et al., 1999]: Die Testican-2-mRNA war außer in Gehirn nur in Lunge und Testis der adulten Maus nachzuweisen. In Thymus und Milz konnte hingegen keine mRNA von Testican-2 detektiert und das Auftreten einer potentiellen Testican-2-Proteinbande daher nicht erklärt werden.

Da Testican-2 N-terminal eine Signalpeptidsequenz aufweist, aber kein für ein Transmembran-Protein typischer zweiter hydrophober Bereich beobachtet werden kann [Vannahme et al., 1999], handelt es sich bei Testican-2 analog zu den anderen BM-40-Familienmitgliedern sehr wahrscheinlich um ein sekretiertes Protein (1.1.3). Die Richtigkeit dieser Hypothese konnte durch Untersuchungen verschiedener Zelllinien hinsichtlich endogener Expression von Testican-2 bestätigt und das Protein im Überstand von zwei der untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden: einer Myoblasten-Zelllinie (C2F3) und einer Hybrid-Zelllinie aus Neuroblastomzellen und Gliomzellen (NG108). Deren Bandenmuster ähnelte mit einer polydispersen Bande zwischen 90 und ca. 200 kDa dem des rekombinanten Testican-2. Zusätzlich waren zwei kleinere breite Banden nachzuweisen, während die 65-kDa-Bande fehlte. Die kleineren Banden konnten später in allen Zelllinien mit endogener Expression von Testican-2 detektiert (*Abb. 2.13*) und ihre Spezifität mittels Inhibition des Antikörpers durch Vorinkubation mit rekombinantem Testican-2 gezeigt werden (*Abb. 2.6-B*). Doch während Testican-2 nur in dem Überstand von zwei Zelllinien nachzuweisen war, konnte bei der parallel durchgeführten Western-Blot-Analyse von Zellextrakten bei allen untersuchten Zelllinien eine Bande von 65 kDa detektiert werden (*Abb. 2.6-C*). Es könnte sich bei dieser Bande zwar um eine intrazelluläre, GAG-freie Form von Testican-2 handeln, aber es ist eher unwahrscheinlich, dass alle Zelllinien intrazellulär Testican-2 produzieren, aber nur zwei Zelllinien es auch sekretieren. Außerdem ließen sich die Zellextrakt-Signale bei einem

weiteren Versuch nicht inhibieren (*nicht gezeigt*). Bedenkt man ferner die zuvor dargestellte Diskrepanz zwischen RNA- und Protein-Daten bei der Gewebeverteilung, handelte es sich bei den Signalen sehr wahrscheinlich um eine unspezifische Kreuzreaktion des Antikörpers trotz Affinitätsreinigung.

Um den Antikörper weiter verwenden zu können, musste die Kreuzreaktivität entfernt werden. Da das die Kreuzreaktion hervorrufende Protein zwar nicht näher charakterisiert, aber in verschiedenen Zell- und Gewebeextrakten detektiert werden konnte und EBNA-Zellen in allen Untersuchungen keine Expression von Testican-2 zeigten, wurde Proteinextrakt dieser Zellen an eine Säule gekoppelt und diese zur Abreicherung der kreuzreaktiven Antikörper verwendet. Die Überprüfung der einzelnen Reinigungsschritte der mehrstufigen Affinitätsreinigung (*Schema: Abb. 2.7*) mittels Western-Blot-Analyse zeigte klar den Erfolg dieses Vorgehens (*Abb. 2.8*): Während die polydisperse, für Proteoglykane typische Bande nach Abreicherung kreuzreagierender Antikörper unverändert z.B. in rekombinantem Testican-2 und Zellüberstand von NG108-Zellen nachgewiesen werden konnte, erwiesen sich die Banden bei 45 kDa und 130 kDa in Gehirnextrakt als ebenso unspezifisch wie die Bande bei 65 kDa, die in fast allen Zell- und Gewebeextrakten wie z.B. Thymusextrakt auftrat und fälschlicherweise für das Coreprotein des endogenen Testican-2 gehalten wurde. Dieses Ergebnis stimmte auch mit den zuvor erhaltenen mRNA-Daten überein, bei denen Testican-2 nicht in adultem Thymusgewebe zu detektieren war [Vannahme et al., 1999], und die Annahme, es könnte sich um ein „part-time“ Proteoglykan handeln, war für diesen Moment widerlegt. Außerdem schien die tatsächliche Größe des endogenen Coreproteins von Testican-2 im Gel bei einem apparente Molekulargewicht von 60 kDa zu liegen, wie die Western-Blot-Analyse von Extrakt mit einem *Tag*-freien Testican-2-Konstruktes transfizierter N2A-Zellen ergab. Bei Analyse von nativem Protein (Slot-Blot, Titerbestimmung) zeigte der neu gereinigte anti-Testican-2-Antikörper eine hohe Spezifität für sein Antigen, jedoch trat unter denaturierenden und reduzierten Bedingungen (Western-Blot-Analyse) eine Kreuzreaktivität gegenüber Testican-1 auf (*Abb. 2.10, Tab. 2.2*). Der Antikörper sollte im Folgenden für Western-Blot- und immunhistochemische Analysen verwendet werden. Bei Western-Blot-Analysen konnte die Kreuzreaktion durch Vorinkubation mit rekombinantem Testican-1 erfolgreich inhibiert werden. Im Fall von immunhistochemischen Färbungen könnte diese Methode aber zu einer unerwünschten Hintergrundfärbung führen und es war unklar, inwieweit die Fixierung des Gewebes überhaupt einen denaturierenden Einfluss haben könnte bzw. ob eine Inhibition daher überhaupt nötig war. Daher wurden die bei der Immunhistochemie herrschenden Bedingungen durch Inkubation von rekombinant Testican-1 und -2 mit Paraformaldehyd-lösung simuliert. Da der Antikörper dabei eine hohe Spezifität gegenüber Testican-2 zeigte, konnte er ohne weitere Reinigungsschritte für immunhistochemische Untersuchungen eingesetzt werden.

3.2 Expression von Testican-2 während der embryonalen Entwicklung und in der adulten Maus

Viele Heparansulfat-Proteoglykane spielen besonders während der embryonalen Entwicklung von Vertebraten eine entscheidende Rolle, sind aber auch bei der erwachsenen Maus in viele unterschiedliche biologische Prozesse eingebunden. In der extrazellulären Matrix oder an Membranen assoziiert nehmen sie z.B. über Zelladhäsion Einfluss auf Migration, Morphogenese und Differenzierung von Zellen oder sind in durch Wachstumsfaktoren induzierte Signaltransduktionen involviert [zur Übersicht siehe: Bernfield et al., 1999; Nakato und Kimata, 2002]. Um einen näheren Einblick in mögliche Rollen von Testican-2 während der embryonalen Entwicklung und im adulten Stadium zu erhalten, wurde die Lokalisation von Testican-2 zu verschiedenen Zeitpunkten der embryonalen Mausentwicklung sowie bei einer adulten Maus untersucht (*Übersicht: Abb. 2.34*).

Basalmembran

Testican-2 konnte schon ab 6,5 Tage post coitum (p.c.) kurz nach Beginn der Gastrulation schwach detektiert werden und unterscheidet sich damit deutlich von Testican-1 und Testican-3, die beide erst ab Embryonaltag (E) 10,5 zu beobachten waren [Charbonnier et al., 2000; Hechler, 2003]. Die bis E 9,5 detektierbare Färbung konnte durch Kolo-kalisation mit dem Basalmembran-Marker Laminin-1 der Basalmembran zwischen den Keimblättern zugeordnet werden (*Abb. 2.26, 2.27*). Die exakte Rolle der Basalmembran während der embryonalen Entwicklung ist zwar bisher nicht genau bekannt, aber Nullmutationen wichtiger Basalmembran-Komponenten wie z.B. der γ 1-Untereinheit von Laminin-1 führen zur embryonalen Letalität während der Gastrulation. Bei Deletion der γ 1-Kette von Laminin scheint diese Letalität durch fehlende Differenzierung des Endoderms bedingt zu sein [Smyth et al., 1999]. Da Testican-2 in der Basalmembran zwischen den Keimblättern zu detektieren war, könnte es z.B. auch an Differenzierung und Migration der embryonalen Zellen der Keimblätter beteiligt sein.

Muskuläre Gewebe

Von E 9,5 bis kurz nach der Geburt konnte eine sehr starke Testican-2-Expression von nahezu gleicher Stärke im Herz-Myokard detektiert werden (*Abb. 2.27-2.33*). Ab E 14,5 waren außerdem starke und ubiquitäre Signale in der Skelettmuskulatur nachzuweisen, wobei Skelettmuskeln mit Testican-2-Expression nicht auf bestimmte strukturelle Ursprünge beschränkt zu sein schienen, da Testican-2 sowohl in der von Somiten verschiedener Lage abgeleiteten epaxialen (z.B. Rückenmuskulatur) und hyperaxialen Muskulatur (z.B. Gliedmaßen), aber z.B. auch in der aus Kopfmesenchym entwickelten Zungenmuskulatur zu beobachten war. Die Expression im Skelettmuskel war im Gegensatz zu der im Herzen während der weiteren Entwicklung weniger weit verteilt und prominent (*Abb. 2.31-2.33*), aber analog zur Herzfär-

bung bei der adulten Maus kaum mehr detektierbar. Die Signale in beiden Muskelarten erschienen Zell-assoziiert und *in vitro* war eine endogene Expression und Sekretion von Testican-2 durch Myoblasten nachzuweisen (*Abb. 2.13*).

Testican-2 unterscheidet sich in Stärke und Verteilung der Expression in Skelettmuskulatur von den anderen beiden Testicanen. Testican-3 war gar nicht in Skelettmuskeln detektierbar, zeigte aber eine Expression im Herzen, die jedoch im Gegensatz zu Testican-2 eher Basalmembran-assoziiert erschien [Hechler, 2003]. Für Testican-1 wurde in der Literatur zwar ab E 12 eine cytoplasmatische Expression in den Muskelanlagen beschrieben und die mRNA von Testican-1 konnte *in vivo* und *in vitro* in embryonalen Myoblasten detektiert werden [Genini et al., 1996; Cifuentes-Dias et al., 2000], aber die detektierten Signale waren vergleichsweise schwach. Während die Expression von Testican-2 im Muskel zu jedem Zeitpunkt Zell-assoziiert erschien, konzentrierte sich Testican-1 mit fortschreitender Entwicklung in der Muskelzell-Peripherie. Durch Kolo-kalisation mit Acetylcholin-Rezeptoren konnte das Signal der neuromuskulären Endplatte zugeordnet werden und es wäre daher möglich, dass Testican-1 eine Rolle bei Bildung neuromuskulärer Endplatten spielt [Cifuentes-Dias et al., 2000]. Testican-2 hingegen könnte im Zusammenhang mit der Differenzierung von Myoblasten bzw. ihrer Verschmelzung zu Myofibrillen stehen, da die Ausbildung des Myotoms schon ab E 7,5 stattfindet, Testican-2 aber erst ab E 14,5 und damit nach Beginn der Differenzierung der Myoblasten (E 13) bzw. während der Bildung von Myofibrillen exprimiert wurde und darüber hinaus in Skelettmuskeln von adulten Mäusen nicht mehr detektierbar war. Analoges könnte man in Bezug auf den Einfluss von Testican-2 im Herz-Myokard vermuten, da Testican-2 auch dort in etwa erst zum Zeitpunkt der Myofibrillenbildung (ab E 8,5) detektiert werden konnte. Da Testican-2 *in vivo* als Heparansulfat-Proteoglykan vorliegt und die Differenzierung von Muskelzellen durch spezielle Heparansulfat-bindende Mitogene wie FGF-2 und TGF β kontrolliert wird, die z.B. inhibierenden Einfluss auf den myogenen Determinationsfaktor Myogenin zeigen [Brunetti und Goldfine, 1990; Heino und Massague, 1990], könnte ein möglicher Einfluss von Testican-2 über die GAG-Ketten erfolgen. Störung der korrekten Ausbildung der Heparansulfat-Ketten in kultivierten Myoblasten äußert sich in Inhibition der Zellfusion [Olwin and Rapraeger, 1992; Melo et al., 1996; Osses and Brandan, 2002] sowie einer FGF-2-abhängigen Unterdrückung der Myoblasten-Differenzierung [Larraín et al., 1998]. Dass Testican-2 auf diesem Weg Einfluss auf die Myogenese nimmt, ist allerdings rein spekulativ, da bisher keine Bindung des Proteoglykans an Wachstumsfaktoren gezeigt werden konnte.

Nervensystem

Schon während der frühen embryonalen Entwicklung war die Basalmembran-Färbung etwas stärker im Bereich der sich entwickelnden Neuralrinne zu beobachten (*Abb. 2.27*). Ab E 10,5 konnte dann eine Zell-assoziierte Färbung aller sich entwickelnden neuralen Gewebe sowohl des peripheren als auch des zentralen Nervensystem detektiert werden (*Abb. 2.29-2.33*). Die

Expression von Testican-2 korreliert dabei in neuralem Gewebe in vielen Bereichen mit der Lokalisation von Testican-1, das im Nervensystem ebenfalls ab E 10,5 zu detektieren ist. Da für Testican-1 aufgrund der beobachteten Lokalisation eine Beteiligung an wichtigen Vorgängen während der Neurogenese wie Zell-Proliferation, Migration, axonales Wachstum und Synaptogenese postuliert wurde [Charbonnier et al., 2000], könnte auch Testican-2 eine Funktion bei der Neurogenese haben. In Verbindung mit in unserem Arbeitskreis durchgeführten *in vitro*-Studien, in denen eine Inhibition des Neuritenwachstum von primären Cerebellumzellen nach Zugabe von Testican-2 beobachtet wurde [Lindgren, 1999], könnte man vermuten, dass Testican-2 *in vivo* unter anderem einen direkten oder indirekten Einfluss auf das Auswachsen von Neuriten hat. Trotz der *in vitro* beobachteten Hemmung des Neuritenwachstums müsste Testican-2 dabei *in vivo* nicht zwangsläufig inhibierend wirken, sondern könnte, wie z.B. bei Phosphacan beobachtet, in Abhängigkeit von dem Neurontyp, mit dem es im Gewebe in Kontakt tritt, einen unterschiedlichen Einfluss aufweisen. Phosphacan inhibiert einerseits das Neuritenwachstum von Spinalganglien-Neuronen, fördert aber andererseits das Auswachsen der Neuriten von Hippocampuszellen [Garwood et al., 1999]. Des Weiteren könnte Testican-2 eine Rolle bei Migration und Proliferation spielen, da es in Gehirn und Rückenmark von Beginn dieser Vorgänge (E 10) nahezu ubiquitär exprimiert wird.

Da Testican-2 analog zu Testican-1 und -3 nicht auf die embryonale Entwicklung begrenzt war und sowohl die mRNA als auch das Protein von Testican-2 während der weiteren Entwicklung des Gehirns (Abb. 2.25) und im Nervensystem der adulten Maus detektiert werden konnte, könnte es auch in diesen Stadien eine Funktion haben. In Gehirn war Testican-2 analog zu den Daten der *in situ* Hybridisierung [Vannahme et al., 1999] in größeren Neuronen nahezu aller Bereiche detektierbar (Abb. 2.14), wobei es keine signifikanten Unterschiede an Menge und Form von Testican-2 in den verschiedenen Gehirnregionen zu geben schien (Abb. 2.19). Die Expression von Testican-2 in Gehirnneuronen war allerdings zellulär und es konnte anhand der Färbung keine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich tatsächlich um extrazelluläre oder vielleicht auch intrazelluläre Signale handelte (Abb. 2.14). Die *in vitro* beobachtete endogene Expression und Sekretion von Testican-2 durch verschiedene neuronale Zellen wies auf einen extrazellulären Anteil an Testican-2 *in vivo* hin, der Ursache für die schwache und diffuse Färbung der gesamten Gehirnmatrix sein könnte. Bei der immunhistochemischen Färbung primärer Hippocampuszellen konnten außerdem unter verschiedenen Bedingungen sowohl intra- und als auch extrazelluläre Signale detektiert werden (Abb. 2.15). Die nach Permeabilisierung der Zellmembran beobachtete intrazelluläre Färbung wurde vermutlich durch synthetisiertes Testican-2 z.B. lokalisiert im Golgi-Apparat oder Granula und Vesikeln hervorgerufen. Die Färbung der Hippocampuszellen ohne vorherige Permeabilisierung deutete darauf hin, dass sekretiertes Testican-2 zumindest zum Teil auch Zellmembran-assoziiert vorliegt und wegen einer fehlenden Transmembranregion z.B. über einen noch unbekanntem Bindungspartner an die Oberfläche der Zellmembran gebunden oder in das viele Arten von Neuronen umgebende perineuronale Netz integriert sein könnte.

Damit korrelierte die Beobachtung von Testican-2-Formen unterschiedlicher Löslichkeit in Gehirn (*Abb. 2.20*). Mittels fraktioneller Gehirnextrakte konnte sowohl ein kleinerer, löslicher Anteil an Testican-2 (TBS-Puffer) extrahiert werden, der dem extrazellulären Testican-2 entsprechen könnte, und darüber hinaus ein gebundener Anteil von Testican-2. Ein Teil der gebundenen Form war mit einem chelatisierenden Puffer (TBS/EDTA-Puffer) zu extrahieren, was auf eine Abhängigkeit der Bindung an einen möglichen Bindungspartner von zweiwertigen Ionen hindeutete. Der Rest war stärker verankert und erst unter partiell (4 M Harnstoff) oder vollständig denaturierenden (Guanidinhydrochlorid) Bedingungen zu extrahieren.

Testican-2 konnte auch im peripheren Nervensystem detektiert werden (*Abb. 2.16*), wo es z.B. in Fasern eines peripheren Nervs erkennbar war. Ob die Testican-2-Signale nur in den Axonen selbst oder auch in den diese umgebenden Schwann-Zellen lokalisiert waren, konnte zwar anhand der vorliegenden Daten nicht genau bestimmt werden, war aber nach Vergleich mit der histochemischen Färbung eines Parallelschnittes und aufgrund der beobachteten Lokalisation von Testican-1 in Schwann-Zellen des Ischias-Nervs [Cifuentes-Dias et al., 2000] zu vermuten. Schwann-Zellen gehören zu den Gliazellen, umhüllen und myelinisieren im peripheren Nervensystem die Axone und sind an deren Stoffaustausch beteiligt. Da bisher keine Sekretion von Testican-2 durch Gliazellen nachzuweisen war (*Abb. 2.13*), könnte es sich bei der Färbung z.B. um von Neuronen sekretiertes und mit den Schwann-Zellen assoziierten Testican-2 handeln.

Im Nervensystem zeigte sich außerdem ab E 10,5, parallel zur Einwanderung von Endothelzellen und Ausbildung von Blutgefäßen, bis zum Erwachsenen-Stadium eine starke Expression von Testican-2 in Blutgefäßen und vor allem in Kapillaren (*Abb. 2.14, 2.29-2.32*), die bis auf Signale in dem an das Herz angrenzenden Teil der Vena cava superior (während der Entwicklung) und in Testis (adulte Maus) streng auf das Nervensystem beschränkt war. Wie auch bei der adulten Maus schien Testican-2 während der embryonalen Entwicklung mit den Endothelzellen der Kapillarwände assoziiert zu sein. Endothelzellen von Gefäßen und insbesondere Kapillaren des zentralen Nervensystems sind eine wichtige Komponente der Blut-Hirn-Schranke, die eine nur für bestimmte Stoffe durchgängige Permeabilitätsschranke darstellt und ein stabiles, von Schwankungen der Blutzusammensetzung unabhängiges Milieu im Nervensystem gewährleistet. Die Barriere ist einerseits struktureller Natur und wird aus der Zellmembran der Endothelzellen bzw. der angrenzenden Basallamina gebildet, in der z.B. auch das Heparansulfat-Proteoglykan Agrin lokalisiert ist [Barber und Lieth, 1997], wird aber darüber hinaus auch durch eine enzymatische Barriere unterstützt, da Endothelzellen die Fähigkeit aufweisen, aufgenommene Substanzen metabolisieren zu können [Junqueira und Carneiro, 1996]. Die der Basalmembran anliegenden Gliaendfüßchen tragen vermutlich ebenfalls zu Funktion und Bestehen der Blut-Hirn-Schranke bei [Cancilla und DeBault, 1983].

Wegen Stärke und Begrenzung der Testican-2-Signale auf die Blutgefäße des Nervengewebes und Korrelation des Zeitpunktes der ersten beobachteten Testican-2 Expression mit Beginn

der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke bei Mäusen (beides ab E 10,5, parallel zur Einwanderung der Endothelzellen und Bildung der Blutgefäße in neurale Gewebe) [Bauer et al., 1992], könnte Testican-2, wie für das Proteoglykan Agrin postuliert [Barber und Lieth, 1997], eine Rolle bei Bildung und Funktion der Blut-Hirn-Schranke spielen.

Endokrine Organe

Des Weiteren war ab E 16,5 eine deutliche Expression von Testican-2 in Hypophyse, Nebenniere und Pankreas nachzuweisen, wobei schwache Signale in der Hypophyse schon an E 14,5 detektierbar waren. Dabei zeigte sich eine Begrenzung der Expression auf bestimmte Strukturen innerhalb der Organe, die mit fortschreitender Entwicklung immer stärker und deutlicher zu erkennen war (*Abb. 2.17, 2.32-2.33*).

Testican-2 schien in der Nebenniere von Beginn an auf die Medulla beschränkt zu sein. Dies wurde bei Betrachtung der Lokalisation von Testican-2 in adulter Nebenniere noch deutlicher, wo eine klare Abgrenzung der Testican-2-positiven Medulla, in der sowohl die Adrenalin- als auch die Noradrenalin-bildenden Zellen gefärbt waren, vom Testican-2-negativen Cortex zu beobachten war. Die *in vitro* nachgewiesene endogene Expression von Testican-2 durch PC12-Zellen (*Abb. 2.13*), die einem Katecholamin-produzierenden chromaffinen Tumor der Nebennieren-Medulla (Phäochromozytoma) entstammen [Greene und Tischler, 1976], deutete darauf hin, dass Testican-2 von den Markzellen selbst auch sekretiert wird.

Innerhalb des Pankreas waren während der Entwicklung nur vereinzelte Strukturen gefärbt, welche vermutlich die sich entwickelnden Langerhans-Inseln darstellten, da bei adultem Pankreas eine strenge Begrenzung der Testican-2-Expression auf diesen endokrinen Teil des Pankreas zu beobachten war. Hier zeigte sich eine ubiquitäre Verteilung von Testican-2, unabhängig vom Zelltyp (α - und β -Zellen) und den von ihnen sekretierten Hormonen. Der exokrine Anteil des Pankreas dagegen war Testican-2-negativ. Wie schon im Ergebnisteil erwähnt (2.2.2.2), wurden zur genaueren Bestimmung der Zelltypen von Nebenniere und Pankreas zwar in Rahmen dieser Arbeit keine genaueren Charakterisierungen durchgeführt, aber Vergleiche mit geeigneten Abbildungen in der Literatur ließen darauf schließen, dass innerhalb dieser Strukturen alle Zelltypen gefärbt waren.

Wie schon bei der Maus an E 16,5 ansatzweise und bei der neugeborenen Maus klar zu erkennen war, zeigten innerhalb der Hypophyse alle Strukturen eine Testican-2-Expression. Diese war aber in dem Hormon-produzierenden Teil der Hypophyse (Adenohypophyse) und insbesondere der Pars intermedia deutlich stärker als in der hauptsächlich aus Nervenfasern bestehenden Neurohypophyse, die vorwiegend die vom Hypothalamus produzierten Hormone speichert und sekretiert, und in der analog zum Gehirn eine vergleichsweise schwache Färbung dieser Nervenfasern zu beobachten war.

Bei der adulten Maus war außerdem eine Expression von Testican-2 in Testis zu detektieren. Während die Färbung von Hypophyse, Nebenniere und Langerhans-Inseln zellulär erschien, konnte Testican-2 in Testis hauptsächlich Basalmembran-assoziiert in der Lamina limitans

detektiert werden, wie durch Kolo-kalisation mit dem Basalmembran-Protein Nidogen-1 nachzuweisen war (*Abb. 2.18*). Eine Aussage, ob Testican-2 tatsächlich integraler Bestandteil der Basalmembran ist, könnte allerdings nur mittels Elektronenmikroskopie getroffen werden. Außerdem konnte eine deutliche Expression von Testican-2 in Blutgefäßen und schwache Signale innerhalb der Hodenkanälchen beobachtet werden, die nicht genauer zu lokalisieren war, aber mit Spermien bzw. deren Vorstufen oder auch Sertoli-Zellen assoziiert sein könnten. Letztere sekretieren u.a. Hormone, sind aber auch für die Expression einiger ECM- bzw. Basalmembran-Proteine, wie Laminin und Typ IV Collagen verantwortlich [Skinner et al., 1985; Dym, 1994]. Der Ursprung von Testican-2 in Testis konnte wegen der geringen Auflösung der Kryoschnitte nicht ermittelt werden. Da aber neben den Sertoli-Zellen auch Leydig-Zellen zwischen den Hodenkanälchen und peritubuläre Zellen in der Lamina limitans (die z.B. das als Basalmembran-Marker verwendete Nidogen-1 sekretieren [Konrad et al., 2000],) Sekretion von ECM-Komponenten zeigen, wäre in Abhängigkeit von der Lokalisation von Testican-2 in Testis eine Expression des Proteins durch mehrere Zelltypen möglich.

Beim Vergleich der immunhistochemischen Färbungen mit Western-Blot-Analysen ergab sich allerdings eine Diskrepanz in der Expression von Testican-2: Während Testican-2 bei Western-Blot-Analysen in Extrakten z.B. von Nebenniere und Hypophyse nachzuweisen war (*Abb. 2.19*), zeigten Extrakte von Testis und Pankreas keine Signale. Eine mögliche Erklärung für das Fehlen dieser Signale liegt im Verhältnis von Gewebestrukturen mit Testican-2-Expression zum gesamten extrahierten Gewebe. Während in Hypophyse und Nebenniere große Strukturen Testican-2-Signale zeigten, macht die Lamina limitans von Testis und die Langerhans-Inseln des Pankreas nur einen Bruchteil des jeweiligen Gewebes aus. Daher lag die Testican-2-Konzentration in diesen Gewebeextrakten vermutlich unter der Nachweisgrenze des Antikörpers.

Die starke Expression von Testican-2 in den endokrinen Organen wirft die Frage nach der Aufgabe bzw. Rolle von Testican-2 in diesen Drüsen auf. Auf der einen Seite waren die Testican-2-Signale auf bestimmte Strukturen innerhalb endokriner Drüsen wie z.B. der Medulla der Nebennieren begrenzt und Testican-2 wurde daher nicht generell in endokrinem Gewebe exprimiert. Auf der anderen Seite zeigte sich innerhalb dieser Strukturen eine fast ubiquitäre Verteilung und Testican-2 schien nicht auf bestimmte Zelltypen beschränkt und folglich nicht mit einzelnen Hormonen kolo-kalisiert zu sein. Man könnte spekulieren, dass Testican-2 einen Einfluss auf Bildung oder Sekretion einiger Hormone haben könnte. So wäre es z.B. möglich, dass die unterschiedlich starke Färbung von Testican-2 innerhalb der Adenohypophyse auf eine Korrelation von Testican-2 mit einigen, in der Hypophyse gebildeten Hormonen hinweisen könnte. Während der Hauptteil der Adenohypophyse verschiedene Hormone wie z.B. die Gonadotropine FSH und LH sowie das Cortikotropin ACTH produziert, wird von der Pars intermedia überwiegend Melanotropin (MSH) gebildet, das Einfluss auf die Verteilung von Melaningranula in den Melanozyten und beim Menschen vermutlich auch vielseitigen Einfluss auf das Wachstum hat [Junqueira und Carneiro, 1996],

sowie β -Endorphin, das als partieller Antagonist von MSH und ACTH Einfluss auf das ZNS nimmt und wie MSH und ACTH aus demselben Vorläufer (Proopiomelanocortin) [Nakanishi et al., 1979] gebildet wird. Proopiomelanocortin ist in der Pars intermedia ab E 14,5 schwach und ab E 15,5 immer stärker nachzuweisen [Japon et al., 1994] und es wäre zu prüfen, ob Testican-2 mit Bildung oder Prozessierung dieses Prohormons in Zusammenhang stehen könnte. Da die Färbung in den endokrinen Organen analog zum Nervensystem zellulär war und im Nervensystem ein intrazellulärer Pool nachgewiesen werden konnte, wäre auch bei den endokrinen Organen ein intrazellulärer Anteil möglich. Es gibt immer mehr Hinweise auf intrazelluläre Proteoglykane lokalisiert in cytoplasmatischen Granula z.B. von neuroendokrinen und endokrinen Zellen mit biologischen Funktionen wie Unterstützung der Speicherung anderer Granula-Komponenten und deren Schutz vor Abbau [zur Übersicht siehe Kolset et al., 2004]. Da Testican-2 in der TY-Domäne einen Bereich mit potentieller Proteaseinhibitor-Aktivität aufweist [Lenarcic und Bevec, 1998], die bei Testican-1 nachweislich aktiv ist [Bocock et al., 2003], wäre es denkbar, dass Testican-2 in Granula zum Schutz synthetisierter Hormone vor Abbau dienen könnte.

Obwohl Testican-2 in Geweben ektodermaler und insbesondere neuroektodermaler Herkunft (Gehirn, endokrine Drüsen) besonders häufig exprimiert wurde, konnte es auch in mesodermalen (Muskel, Uterus) und endodermalen Gewebe (Lunge und Pankreas) detektiert werden. Dabei war interessant, dass aus Lungengewebe im Gegensatz zu den Geweben ektodermaler Herkunft keine lösliche Fraktion von Testican-2 extrahiert werden konnte (TBS- bzw. Tris-Puffer) und erst mit dem teilweise denaturierenden Puffer (TBS/4 M Harnstoff) ein Herauslösen von Testican-2 aus dem Gewebe möglich war. Testican-2 schien in diesem Gewebe folglich nur in gebundener Form vorzuliegen.

3.3 Posttranslationale Modifikationen von Testican-2

Bei der Western-Blot-Analyse von Gewebeextrakten bzw. Zellüberständen waren in Abhängigkeit vom Gewebetyp polydisperse Banden unterschiedlicher Größe zu beobachten (*Abb. 2.13, 2.19*), die einen Hinweis auf Variationen der posttranslationalen Modifikationen bzw. Zuckerketten bei Testican-2 in verschiedenen Geweben geben könnten. Unterschiede in der Feinstruktur der Zuckerketten sind unter anderem durch Gewebe-Spezifität einiger für die Glykosylierung benötigten Enzyme bedingt (1.2.2). Diese können wie z.B. bei Betaglycan, das die Wirkung des Wachstumsfaktors TGF β in einem Zelltyp verstärkt und einem anderen aufgrund eines größeren GAG-Anteil inhibiert [Eickelberg et al., 2002], verschiedene Rollen des Proteoglykans in den jeweiligen Zellen bewirken. Somit könnten die beobachteten Differenzen auf unterschiedliche Funktionen von Testican-2 in den verschiedenen Geweben hindeuten.

In Zellüberständen waren neben der polydispersen Bande zusätzlich mehrere distinkte Banden unterhalb von 45 kDa zu beobachten. Da ihre Spezifität durch Inhibition bestätigt werden konnte (*Abb. 2.6*) und sie auch im Überstand transfizierter N2A-Zellen zu beobachten waren, handelte es sich vermutlich um proteolytische Testican-2-Fragmente, die parallel zur Expression von Testican-2 gebildet wurden (*Abb. 2.13*). Ob der Abbau intra- oder extrazellulär erfolgte, konnte nicht bestimmt werden, aber im Fall einer intrazellulären Proteolyse sollten die Fragmente auch in Gewebeextrakten nachzuweisen sein (*Abb. 2.19*). Bei einer extrazellulären Proteolyse könnte das Fehlen von Fragmenten in Gewebeextrakten durch sterische Hinderung oder einen anders gearteten Schutz des Proteoglykans im Gewebe erklärt werden (die Fragmentierung während Erstellung der Extrakte wurde durch Verwendung von Proteaseinhibitoren verhindert), während Testican-2 im Zellkultur-Überstand für Proteasen frei zugänglich wäre. Die Beobachtung, dass bei proteolytischer Spaltung von Testican-1 in Blutplasma Fragmente vergleichbarer Größe entstanden waren [BaSalamah et al., 2001] und die potentiellen Spaltstellen innerhalb der TY-Domäne bei allen Testicanen hoch konserviert sind [Lenarcic und Bevec, 1998], macht eine proteolytische Spaltung von Testican-2 in Lösung wahrscheinlich. Dies konnte durch MALDI-TOF-Analyse von rekombinantem Testican-2 bestätigt werden, bei der auch ein Signal mit einer molekularen Masse von etwa 35 kDa zu ermitteln war (*Abb. 2.24-A*).

Die vorherrschenden posttranslationalen Modifikationen von Proteoglykanen sind die GAG-Ketten, bei vielen Proteoglykanen sind aber auch N- und O-gebundene Glykane nachweisbar [Prydz und Dalen, 2000]. Die Aminosäure-Sequenz von Testican-2 weist zwei potentielle GAG-Bindungsstellen (C-Terminus) auf und mit Hilfe der Computer-Programme *NetNGlyc* und *NetOGlyc* konnte auch eine potentielle N-Glykan- (EC-Domäne) und vier mögliche O-Glykan-Bindungsstellen (FS-Domäne) identifiziert werden.

Bei der GAG-Ketten-Analyse von rekombinant exprimiertem Testican-2 aus verschiedenen Zelllinien führte sowohl die Inkubation mit Heparinase I und III als auch mit Chondroitinase ABC zu einer Verschiebung der polydispersen Bande hin zu kleineren Molekularmassen und damit zur Abspaltung der GAG-Ketten, wobei der stärkste Effekt bei kombinierter Anwendung der Lyasen beobachtet werden konnte (*Abb. 2.20*). Dies lässt darauf schließen, dass an das Coreprotein von rekombinantem Testican-2 analog zu endogenem [Bonnet et al., 1992] sowie rekombinantem Testican-1 (*unveröffentlichte, in unserer Arbeitsgruppe gewonnene Daten*) und unabhängig vom exprimierenden Zelltyp sowohl Heparansulfat- als auch Chondroitinsulfat-Ketten gebunden sind. Das Vorhandensein von Dermatan-sulfat-Ketten konnte durch einen unabhängigen Versuch ausgeschlossen werden. Im Gegensatz dazu konnten die GAG-Ketten von endogenem Testican-2 unterschiedlicher Gewebe durch alleinige Inkubation mit Heparinase I und III vollständig abgespalten werden und Testican-2 scheint demzufolge sowohl in endokrinen Organen (Hypophyse, Nebenniere) als auch in Gehirn (Postnataltag 6 und adult) als Heparansulfat-Proteoglykan vorzuliegen (*Abb. 2.22*).

Es stellt sich nun die Frage, woher die Unterschiede der GAG-Ketten bei rekombinantem und endogenem Testican-2 herrühren könnten. Die Unterschiede waren unabhängig vom Zelltyp, da endogenes Testican-2 in Gehirn hauptsächlich neuronalen Ursprungs war und nur Heparansulfat-Ketten aufwies, während an das von der neuronalen Zelllinie N2A rekombinant exprimierte Testican-2 Chondroitin- und Heparansulfat-Ketten gebunden waren. Auch Unterschiede aufgrund der Spezies konnten ausgeschlossen werden, da zwei der Zelllinien (N2A, LMTK) analog zum untersuchten Gewebe murinen Ursprungs waren. Ein Einfluss der allgemeinen Zellkulturbedingungen auf die GAG-Biosynthese war ebenfalls unwahrscheinlich, da eine GAG-Ketten-Analyse von endogen exprimiertem Testican-2 aus PC12-Zellen analog zu Nebennierenextrakt nur zum Nachweis von Heparansulfat-Ketten führte (*nicht gezeigt*). Allerdings wäre in diesem Fall noch zu prüfen, wie die GAG-Ketten einer rekombinant exprimiertem Testican-2-Form dieser Zellen aussähen.

Eine mögliche Erklärung für die beobachtete Diskrepanz zwischen endogen und rekombinant exprimiertem Testican-2 könnte eine Störung der GAG-Biosynthese durch die Überexpression von rekombinantem Testican-2 in transfizierten Zellen sein. Bei den potentiellen GAG-Bindungsstellen handelt es sich um Sequenzen, die sowohl die Synthese von Chondroitinsulfat- als auch Heparansulfat-Ketten ermöglichen. Es sind zwar bisher keine Konsensus-Sequenzen, die die spezifische Anheftung nur einer der beiden Glyko-Ketten ermöglichen, bekannt, aber bei Betrachtung der Aminosäuresequenz von Testican-2 fällt in Nachbarschaft zu den beiden potentiell GAG-bindenden Serin-Resten eine Anhäufung saurer Aminosäuren sowie ein Tryptophan-Rest auf (*Anhang*). Diese führten bei Mutationsversuchen mit Betaglycan zur verstärkten Synthese von Heparansulfat zu Lasten von Chondroitinsulfat [Zhang und Esko, 1994]. Diese Sequenzelemente könnten darauf hinweisen, dass bei Synthese physiologischer Mengen an Testican-2 die Bildung von Heparansulfat-Ketten bevorzugt stattfindet und Testican-2 dann als Heparansulfat-Proteoglykan vorliegt. In transfizierten

Zellen wird jedoch künstlich eine sehr große Menge des jeweiligen Proteins exprimiert. Die Konzentration des für die Heparansulfat-Synthese spezifischen Enzyms könnte daher zu gering sein, um an alle Testican-2-Coreproteine ausschließlich Heparansulfat-Ketten zu binden, und dadurch das Gleichgewicht zugunsten der Synthese von Chondroitinsulfat verschieben. Solche Unterschiede bei der GAG-Ketten-Modifikation konnten auch bei Biglycan nachgewiesen werden, das wie Testican-2 von verschiedene Zelllinien rekombinant als Heparansulfat-/Chondroitinsulfat-Mischform exprimiert wurde, endogen jedoch nur Chondroitinsulfat-Ketten aufwies [Kresse et al., 2001]. Im Fall von rekombinatem Testican-2 wäre noch zu klären, ob es sich um eine Hybridform mit jeweils einer Chondroitinsulfat- und Heparansulfat-Kette (zwei potentielle Bindungsstellen) oder um ein Gemisch aus Heparansulfat- und Chondroitinsulfat-Proteoglykanen handelt.

Die Sequenzelemente, die möglicherweise bei endogenem Testican-2 die bevorzugte Anheftung von Heparansulfat-Ketten bewirken, könnten darüber hinaus auch den Unterschied zwischen den GAG-Ketten-Modifikationen von endogenen Testican-2 und Testican-1 erklären, da sie bei Testican-1 durch Insertion weiterer Aminosäuren C-terminal verschoben sind (saure Sequenz) bzw. nicht auftreten (Tryptophan) und daher bei Testican-1 aus der Sequenz die beobachtete Mischform abzuleiten ist (*Anhang*).

Da die Untersuchung der GAG-freien Form von Testican-2 mittels Massenspektroskopie eine molekulare Masse von 57 kDa ergab (*Abb. 2.24*), die kalkulierte molekulare Masse von Testican-2 aber nur 49,8 kDa betrug, musste es weitere posttranslationale Modifikationen geben. Wie schon erwähnt, konnten in der Sequenz von Testican-2 sowohl potentielle N- als auch O-Glykan-Bindungsstellen identifiziert werden und die Nutzung der möglichen N-Glykosylierungsstelle konnten sowohl bei rekombinatem als auch bei endogenem Testican-2 durch Inkubation mit PNGaseF nachgewiesen werden (*Abb. 2.23*). Da bei rekombinatem Testican-2 nach Abspaltung der N-Glykane eine Molekularmasse von 53 kDa erreicht wurde und der Anteil an N-Glykanen somit nur bei etwa 4 kDa lag, musste es weitere posttranslationale Modifikationen von etwa 3 kDa geben, die z.B. aus O-gebundenen Glykanen bestehen könnten.

3.4 Zellassays und Bindungsstudien mit Testican-2

Viele Proteoglykane und andere ECM-Proteine zeichnen sich neben strukturellen Aufgaben auch durch Einfluss auf die Bindung von Zellen aus. Für Testican-2 gab es in Bezug auf Zelladhäsion noch keine Daten, aber den Familienmitgliedern BM-40 [Sage et al., 1984; Lane und Sage, 1990] und SC1 [Girard und Springer, 1996] werden aufgrund von *in vitro*-Assays antiadhäsive Eigenschaften zugeschrieben. Der Zusammenhang zwischen Zellbindungsverhalten und Funktion eines Proteins *in vivo* wird bei SC1 z.B. während der Gehirnentwicklung deutlich: SC1 beendet, assoziiert an radiale Gliazellen in der oberen Schicht der Corticalplatte, durch seine antiadhäsive Wirkung die Migration von Neuronen und ist dadurch für deren Einlagerung in die entsprechende Cortex-Schicht von Bedeutung [Gongidi et al., 2004]. Die Frage nach einer möglichen Adhäsion von Zellen an Testican-2 ist insbesondere deswegen interessant, da es direkt oder indirekt an die Zellmembran gebunden zu sein scheint und deshalb eventuell eine Rolle bei Zell-Matrix- oder Zell-Zell-Interaktionen spielen könnte.

Für die Zellbindungsstudien wurden als Modelle humane Fibroblasten (WI26) und humane Keratinozyten (HaCaT) eingesetzt. Da die Anwesenheit von endogenem Protein die Ergebnisse der Zellbindungsstudien verfälschen könnten, wurde bei Auswahl der Zellen darauf geachtet, dass diese keine Sekretion von Testican-2 zeigen (*Abb. 2.13*).

Es konnte eine Adhäsion von Zellen beider Zelllinien an Testican-2 nachgewiesen werden, wobei die GAG-haltige und die GAG-freie Form von Testican-2 unterschiedliches Bindungsverhalten zeigten (*Abb. 2.35*). Während bei beiden Zelllinien die Zell-Adhäsion an das Coreprotein mit steigender Konzentration bis zu einer Sättigung bei etwa 15 µg/ml zunahm und ein Ausbreiten der Zellen auf Testican-2 und damit Ausbildung fokaler Kontakte beobachtet werden konnte (*Abb. 2.36*), zeigte die GAG-haltige Form eine ungewöhnliche Bindungskurve mit einem Maximum bei etwa 3-4 µg/ml und danach kontinuierliche Abnahme der Adhäsion, bis bei höheren Konzentrationen keine Zellbindung mehr nachzuweisen war (*Abb. 2.35*). Im Bereich des Maximums waren auch, im Gegensatz zur GAG-freien Form, kaum ausgebreitete Zellen zu erkennen, also schienen die Zellen in diesem Fall nicht zur Ausbildung fokaler Kontakte angeregt zu werden (*Abb. 2.36*).

Die Vermutung, dass es sich bei diesem Effekt um eine durch die GAG-Ketten bedingte, sterische Hinderung der Zellbindung handeln könnte, konnte durch einen Folgeversuch bestätigt werden, bei dem nach Abspaltung der GAG-Ketten durch Lyasenbehandlung, analog zum Coreprotein, eine Sättigungskurve zu ermitteln war (*Abb. 2.37*). Die vor Abspaltung der GAG-Ketten bei geringer Konzentration beobachtete Zelladhäsion an Testican-2 weist darauf hin, dass die mögliche Zell-Bindungssequenz auf dem Coreprotein nicht grundsätzlich von den GAG-Ketten abgeschirmt wird. Erst wenn immer mehr Testican-2-Moleküle an die Platte binden, behindern vermutlich die GAG-Ketten benachbarter Moleküle sterisch die Bindung von Zellen an die Bindungssequenz. Hinzu kommt, dass durch die Vielzahl von GAG-Ketten

auf der Oberfläche der ELISA-Platte ein negatives Potential entsteht, das die Bindung durch ebenfalls negativ geladene Zelloberflächen-Rezeptoren wie z.B. Integrine behindern könnte. Entfernt man diese sterische bzw. elektrostatische Barriere durch Abspaltung der Zuckerketten, ist das Coreprotein wieder zugänglich und die Bindung findet auch bei hohen Konzentrationen statt.

Dieses Phänomen ist besonders in Verbindung mit der beobachteten Änderung der GAG-Ketten im Gehirn während der Mausentwicklung interessant (*Abb. 2.25*). In frühen Entwicklungsstadien (ab E 16,5) wird sowohl eine GAG-haltige Form von Testican-2 mit großem apparenten Molekulargewicht als auch ein potentiell Coreprotein exprimiert. Wegen der beobachteten, durch die GAG-Ketten verursachten, sterischen Hinderung der Zellbindung an rekombinantes Testican-2 ist vermutlich auch *in vivo* die Bindung von Zellen an die native Proteoglykan-Form erschwert oder gar nicht erst möglich, während Zellen an das Coreprotein binden können. Mit fortschreitendem Alter der Maus verschwindet die GAG-freie Form von Testican-2 und die polydisperse Bande erscheint im Western-Blot kleiner, also werden vermutlich die GAG-Ketten kürzer oder weniger, was zu einer Änderung des Bindungsverhaltens führen könnte. Wegen der kürzeren GAG-Ketten könnte die sterische Hinderung geringer sein und zumindest eine schwache Zellbindung zulassen. Die GAG-Ketten von Testican-2 könnten somit als eine Art Schalter funktionieren, der in unterschiedlichen Entwicklungsstadien verschiedene Funktionen von Testican-2 bewirkt.

Analog zu dem bei SC-1 beobachteten und zu Beginn des Kapitels beschriebenen Einflusses auf die Migration von Nervenzellen [Gongidi et al., 2004], könnte Testican-2 z.B. je nach Verteilungsmuster von Coreprotein und GAG-haltiger Form, das hier nicht näher bestimmt werden konnte, während der frühen Mausentwicklung (E 16,5 bis P 6) ebenfalls für die Wegfindung von Nervenzellen eine Bedeutung haben. Solange Nervenzellen auf das Coreprotein treffen, wäre wegen der schwachen Bindung eine Migration begünstigt, kommen sie in ein Gebiet, das reich an der GAG-haltigen Form ist, würde die Migration gestoppt und die Zelle könnten möglicherweise in den dort vorliegenden Zellverband eingebunden werden.

Ein entwicklungspezifische Änderung posttranslationaler Modifikationen mit Einfluss auf dessen Funktion *in vivo* konnte auch bei dem neuronalen Zelladhäsionsmolekül NCAM beobachtet werden, dass neben N-Glykanen auch Polysialinsäuren aufweist. Der Gehalt an Sialinsäure ist bei NCAM entwicklungspezifisch reguliert: Im embryonalen neuronalen Gewebe kommt eine hochsialierte Form von NCAM vor, während die NCAM-Form in adultem Gewebe allgemein einen geringeren Anteil an Sialinsäure enthält [Hoffman et al., 1982; Rougon et al., 1982]. Obwohl die Sialinsäuren nicht direkt an der Bindung beteiligt sind, ist eine Erniedrigung des Säuregehaltes mit einer Erhöhung der Bindungsrate korreliert [Sadoul et al., 1983; Hoffman und Edelman, 1983]. Das Auftreten hochsialierter NCAM-Formen in einigen spezifischen adulten Gehirnregionen wird mit einer erhöhten Plastizität in Verbindung gebracht [Theodosis et al., 1991] und es konnte *in vivo* durch gezielte Deletion eines für die Sialinsäure-Bindung an NCAM verantwortlichen Enzyms ein direkter Einfluss der Sialinsäure

auf die synaptische Plastizität gezeigt werden [Eckhardt et al., 2000]. Außerdem war im Fall von NCAM ein Einfluss der Sialinsäure auf die Signaltransduktion nachweisbar: Die Bindung von BDNF (*brain-derived neurotropic factor*) an dessen Rezeptor und die daraus resultierende Signaltransduktion wird durch die Sialinsäure von NCAM gefördert bzw. bei deren Fehlen reduziert [Muller et al., 2000]. Die GAG-Ketten einiger Proteoglykane zeigen eine ähnliche Rolle bei der Rekrutierung von Liganden für bestimmte Signaltransduktions-Systeme und den zugehörigen Rezeptoren [Perrimon und Bernfield, 2000].

Beim Vergleich der Adhäsion beider untersuchter Zelllinien an Testican-2 konnte bei den Fibroblasten ein höheres Bindungssignal als bei den Keratinozyten detektiert werden, die auch im Vergleich weniger ausgebreitete Zellen aufwiesen (*nicht gezeigt*). Das könnte darauf hinweisen, dass die Fibroblasten eine größere Anzahl potentieller Bindungspartner bzw. Rezeptoren von Testican-2 aufweisen bzw. an den Adhäsionspunkten konzentrieren.

Untersuchungen in Bezug auf die Ionenabhängigkeit der Fibroblasten-Adhäsion an Testican-2 ergaben einen Einfluss zweiwertiger Ionen auf die Zellbindung (*Abb. 2.38*). Dabei zeigte Magnesium eine geringe Verstärkung und Mangan sogar eine Verdopplung der Zelladhäsion an Testican-2, die nach Chelatisierung und damit Entzug aller freien, zweiwertigen Ionen gar nicht mehr zu detektieren war. Der Einfluss von Calcium konnte aufgrund der Calciumkonzentration in dem für die Untersuchungen verwendeten Medium nicht eindeutig bestimmt werden. Die beobachtete Ionenabhängigkeit bot einen Hinweis auf einen möglichen Rezeptor von Testican-2 auf der Zelloberfläche. Zwar zeigen verschiedene Adhäsionsmoleküle eine Ionenabhängigkeit, aber die hier detektierte Verstärkung der Zellbindung durch Mangan kann vor allem bei vielen Integrinen beobachtet werden [z.B. Sonnenberg et al., 1988; Gailit und Ruoslahti, 1988; Elices et al., 1991; Dransfield et al., 1992]. Daher lag die Vermutung nahe, dass es sich bei dem potentiellen Bindungspartner von Testican-2 um ein Integrin handelte.

Innerhalb der Integrin-Familie bilden Rezeptoren mit einer $\beta 1$ -Untereinheit die größte Subfamilie [Bouvard et al., 2001]. $\beta 1$ -Integrine sind auch auf der Oberfläche der untersuchten Zellen in großem Maße vorhanden (2.3.2) und Inhibitionsstudien mit einem anti- $\beta 1$ -Integrin-Antikörper zeigten sowohl bei den Keratinozyten als auch bei den Fibroblasten eine Verringerung der Zelladhäsion an Testican-2 von etwa 70 % (*Abb. 2.39*). Dies machte ein Integrin mit einer $\beta 1$ -Untereinheit als potentiellen Bindungspartner von Testican-2 sehr wahrscheinlich. Wie durch weitere Inhibitionsversuche mit im Institut vorhandenen Antikörpern ermittelt werden konnte, handelte es sich dabei nicht um ein Integrin mit einer $\alpha 6$ -Untereinheit. Da der für die Inhibition von $\alpha 1$ -Integrin verwendete Antikörper allgemein keinen Blockierungseffekt zeigte, konnte in Bezug auf diese Untereinheit zunächst keine Aussage getroffen werden (*nicht gezeigt*).

Bindungsstudien mit löslichen Integrinen ermöglichten dann sowohl die Bestätigung von $\beta 1$ -Integrin als potentiellen Bindungspartner von Testican-2 als auch die Bestimmung der entsprechenden α -Untereinheit: Während bei $\alpha 2\beta 1$ -, $\alpha 3\beta 1$ - und $\alpha 5\beta 1$ -Integrin keine Bindung

von Testican-2 detektiert werden konnte, zeigte Testican-2 in Anwesenheit von Mangan eine deutliche Bindung an $\alpha 1\beta 1$ (Abb. 2.40). Doch während bei dem als Positivkontrolle verwendeten Collagen Typ IV-Fragment diese Bindung durch Entzug zweiwertiger Ionen inhibiert werden konnte, führte die EDTA-Zugabe bei Testican-2 sogar noch zu einer leichten Verstärkung der Bindung an $\alpha 1\beta 1$ -Integrin. Dies stand im Gegensatz zu der Beobachtung, dass Zellen an Testican-2 *in vitro* in Abwesenheit zweiwertiger Ionen nicht binden können (Abb. 2.38). Da die Erhöhung des Bindungssignals nach EDTA-Zugabe auch bei der Negativkontrolle BSA zu beobachten war, könnte es sich um einen unspezifischen Effekt handeln, der z.B. mit einer im Vergleich zum nativen Protein leicht unterschiedlichen Konformation des rekombinant exprimierten $\alpha 1\beta 1$ -Integrinkonstruktes zusammenhängen könnte. Möglicherweise hatte EDTA aber auch auf Zellebene nicht direkt die Bindung der Zellen über Integrine an Testican-2 inhibiert, sondern die Zelle durch Störung ihres Ionenhaushalts auf andere Weise beeinflusst. Gegen die Annahme spricht aber die beim Zellbindungsassay beobachtete und bei Integrinen häufig auftretende Bindungsverstärkung nach Zugabe von Mangan. Es besteht darüber hinaus auch die Möglichkeit, dass Testican-2 auf eine Ionen-unabhängige Weise z.B. außerhalb der konventionellen Bindungstasche bindet.

Da die Extinktionswerte der Bindung von Testican-2 an $\alpha 1\beta 1$ -Integrin weit über den Werten der Negativkontrolle (BSA) lagen, und auch wenn der Einfluss von EDTA an dieser Stelle nicht geklärt werden konnte, handelte es sich dennoch sehr wahrscheinlich um eine spezifische Bindung, wie durch Folgeversuche gezeigt werden konnte. So konnte die Bindung an $\alpha 1\beta 1$ -Integrin durch Denaturierung von Testican-2 auf das Niveau der Negativkontrolle reduziert werden (Abb. 2.41) und die Mangan-abhängige Bindung von Testican-2 an $\alpha 1\beta 1$ -Integrin lag deutlich über der möglicherweise unspezifischen EDTA-abhängigen Bindung (Abb. 2.42). Außerdem konnte die Bindung von Testican-2 an $\alpha 1\beta 1$ -Integrin auch bei Protein-Interaktionsstudien durch einen anti- $\beta 1$ -Integrin-Antikörper (DE9) fast vollständig (85 %) und durch zwei anti- $\alpha 1$ -Integrin-Antikörper (FG12, AGF-1) zu 50 % inhibiert werden (s. Abb. 2.43). Dass zwei weitere anti- $\beta 1$ -Integrin-Antikörper (JB1A, 6S6) statt einer Inhibition eine deutliche Erhöhung des Bindungssignals verursachten, könnte mit einer durch Bindung dieser Antikörper bedingten Konformationsänderung der $\beta 1$ -Untereinheit zusammenhängen, wie sie zuvor bereits bei dem 9EG7-Antikörper beobachtet werden konnte [Driessens et al., 1995]. Der 9EG7-Antikörper ist ebenfalls ein anti- $\beta 1$ -Antikörper, der einerseits die durch $\alpha 6\beta 1$ -Integrin vermittelte Zelladhäsion inhibiert [Lenter et al., 1993], aber andererseits auch bei anderen $\beta 1$ -Integrinen durch Bindung an die $\beta 1$ -Untereinheit in Anwesenheit von Mangan deren Funktion verstärken [Driessens et al., 1995] kann. Es gibt auch weitere Antikörper, die vermutlich durch Stabilisierung der aktiven Konformation des Integrins deren Funktion stimulieren [Bazzoni et al., 1995].

Die Bindung von Testican-2 an $\alpha 1\beta 1$ -Integrin *in vitro* schien auch eine physiologische Relevanz zu haben. So zeigten RuGli-Glioma-Zellen, die sich durch eine große Anzahl von $\beta 1$ -Integrinen an ihre Zelloberfläche auszeichnen [Vandenberg et al., 1991; Perret et al., 2003]

und daher häufig als Modellsystem zur Untersuchung einer $\beta 1$ -Integrin-vermittelten Zellbindung Verwendung finden, eine Zellspreitung auf Testican-2, verbunden mit Konzentration von $\alpha 1\beta 1$ -Integrin an fokalen Kontakten (Abb. 2.44). Zwar war dieser Effekt nicht so deutlich sichtbar wie bei der Positivkontrolle Collagen und nur in Anwesenheit von 0,1 mM Mangan zu beobachten, aber eine Kolo-kalisation von $\alpha 1\beta 1$ -Integrin und Vinculin, das hier als Marker für fokale Kontakte diente, war klar zu erkennen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Bindung von Testican-2 an $\alpha 1\beta 1$ -Integrin mit unterschiedlichen Methoden gezeigt werden konnte, auch wenn die Ursache für den ungewöhnlichen Einfluss von EDTA auf die Bindung hier nicht zu klären war, und es sich um eine eher schwache Bindung handelt. Zusammen mit den zuvor diskutierten Ergebnissen lässt sich damit *in vivo* folgendes Bild von Testican-2 postulieren:

Da sekretiertes Testican-2 *in vitro* zumindest zum Teil an die Zelloberfläche von Neuronen assoziiert vorliegt und $\alpha 1\beta 1$ -Integrin ebenfalls auf diesen Zellen nachzuweisen ist [Choi et al., 1994], könnte eine Bindung von Testican-2 an die Zelloberfläche unter anderem über $\alpha 1\beta 1$ -Integrin erfolgen. Eine solche Bindung wäre auch *in vivo* möglich, weil die Testican-2-Signale in den Neuronen des Gehirns ebenfalls zellulär erschienen und in Gehirn eine weit verbreitete Expression sowohl der $\alpha 1$ -Untereinheit als auch der $\beta 1$ -Untereinheit von Integrin zu beobachten ist [Chan et al., 2003]. Dabei könnte $\alpha 1\beta 1$ -Integrin nur für die Lokalisation von Testican-2 an der Zellmembran von Neuronen wichtig sein, wo es z.B. mit weiteren ECM-Komponenten in Kontakt treten könnte. Es wäre aber auch denkbar, dass andere Zellen wie z.B. Gliazellen, für die eine Bindung an Testican-2 über $\alpha 1\beta 1$ -Integrin nachzuweisen war, die aber selbst kein Testican-2 exprimieren, ebenfalls über $\alpha 1\beta 1$ -Integrin an das Proteoglykan binden und Testican-2 so eine Zell-Zell-Bindung zwischen Neuronen und Gliazellen vermittelt. Die geringe Stärke der beobachteten Bindung von Testican-2 an $\alpha 1\beta 1$ -Integrin könnte dazu führen, dass Neuronen nur an die Glia-Zellen binden, die sich durch eine große Anzahl an $\alpha 1\beta 1$ -Integrinen auszeichnen, und eventuell auch einen Einfluss auf die Migration von Neuronen haben: Neurone könnten kurzfristig über Testican-2 an Gliazellen binden, die Bindung aber sofort lösen, wenn die Zelle einen stärkeren Bindungspartner findet. Es wäre auch möglich, dass Testican-2 über Integrine ein Signal von der ECM in das Innere der Zelle vermittelt und damit an der Signaltransduktion beteiligt ist, bei der die Integrine eine wichtige Rolle spielen (1.3). Diese Modelle lassen sich auf andere Gewebe bzw. Zellen übertragen, in denen sowohl $\alpha 1\beta 1$ -Integrin als auch eine starke Expression von Testican-2 nachzuweisen sind wie z.B. PC12-Zellen bzw. Nebennierenmedulla, die Adenohypophyse [Horacek et al., 1994] und peritubulären Zellen in Testis [Giebel et al., 1997].

3.5 Fazit und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Expressionsmuster von Testican-2 in der embryonalen Entwicklung und der adulten Maus ermittelt und weitgehend die posttranslationalen Modifikationen geklärt werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine Zellbindung an Testican-2 stattfindet und $\alpha 1\beta 1$ -Integrin als Bindungspartner bzw. Rezeptor von Testican-2 auf der Zelloberfläche ermittelt. Aufgrund dieser Daten können verschiedene, mögliche Funktionen von Testican-2 *in vivo* postuliert werden, die durch eine Reihe weiterer Untersuchungen zu verifizieren wären.

Über die genaue Rolle von Testican-2 bei der embryonalen Entwicklung kann aufgrund der vorliegenden Daten zwar keine genaue Aussage getroffen werden, aber da es schon ab E 6,5 auftritt und ab diesem Zeitpunkt in einer immer größer werdenden Anzahl von Geweben, insbesondere zum Zeitpunkt derer Entwicklung, detektiert werden konnte, wäre ein Einfluss auf bestimmte Entwicklungsvorgänge sehr wahrscheinlich. Dabei ist zu untersuchen, inwieweit die Funktion von Testican-2 während der embryonalen Entwicklung bzw. bei der adulten Maus mit der Bindung an $\alpha 1\beta 1$ -Integrin zusammenhängt, da sowohl die $\beta 1$ - als auch die $\alpha 1$ -Untereinheit während der Embryogenese weit verbreitet auftreten und $\alpha 1$ -Integrin auf verschiedene Entwicklungsprozesse wie z.B. die Bildung des Nervensystems [Gardner et al., 1996] und Proliferation des Herz-Myokards [Ross und Borg, 2001] Einfluss nimmt. Einen ersten Hinweis könnte die Untersuchung einer möglichen Kolo-kalisation von Testican-2 und $\alpha 1\beta 1$ -Integrin während der embryonalen Entwicklung und bei der adulten Maus liefern. Außerdem wäre die Analyse des Expressionsmusters von Testican-2 in Null-Mutanten der $\alpha 1$ -Untereinheit interessant, um zu untersuchen, ob Testican-2 in Abwesenheit von $\alpha 1$ -Integrin wegen des Fehlens des potentiellen Bindungspartners eine andere Lokalisation aufweist. Darüber hinaus könnte der potentielle Einfluss von Testican-2 auf die Migration von Neuronen, auch in Hinblick auf die Beteiligung von $\alpha 1\beta 1$ -Integrin an diesem Vorgang, mit geeigneten *in vitro*-Assays untersucht werden.

Ein weiteres $\beta 1$ -Integrin, das insbesondere in gestreifter Muskulatur wie Skelettmuskel und Herzmyokard zu finden ist und dessen Deletion zu Muskeldystrophie führt [Mayer et al., 1997], ist $\alpha 7\beta 1$ -Integrin. Erste, in Kooperation mit Dr. Eble an der Universität Münster durchgeführte Untersuchungen weisen auch auf eine Bindung von Testican-2 an $\alpha 7\beta 1$ -Integrin hin. Da Testican-2 während der embryonalen Entwicklung ein starkes Signal in Muskelgewebe zeigt, könnte Testican-2 *in vivo* über $\alpha 7\beta 1$ -Integrin an Muskelzellen binden und z.B. zu der für die Proliferation entscheidende Signalgebung beitragen. Es wäre zu untersuchen, ob Muskelzellen tatsächlich an Testican-2 binden, und ob dabei unterschiedliche Bindungsstärken gegenüber verschiedener $\beta 1$ -Splicevarianten zu beobachten sind, weil die während der embryonalen Entwicklung in Herz und Muskel detektierbare $\beta 1A$ -Isoform analog zur Testican-2-Expression postnatal herunterreguliert wird [Brancaccio et al., 1998].

Im Zusammenhang mit der embryonalen Entwicklung ist auch die Tatsache interessant, dass es sich bei Testican-2 im Gegensatz zu den andern beiden Familienmitgliedern *in vivo* um ein reines Heparansulfat-Proteoglykan handelt. Denn es treten immer mehr Beweise auf, dass z.B. in der frühen, durch Proliferation neuronaler Vorläuferzellen charakterisierten Gehirnentwicklung, in der verschiedene Familien von Signalmolekülen wie FGF und WNT eine wichtige Rolle spielen, die Anwesenheit von Heparansulfat-Ketten bzw. Heparansulfat-Proteoglykanen für die Funktion dieser Moleküle erforderlich ist [Ford-Perris et al., 2003]. Außerdem zeigen Nullmutationen verschiedener, an der Heparansulfat-Synthese beteiligter Enzyme die Bedeutung der Heparansulfat-Ketten insbesondere während der embryonalen Entwicklung (1.2.2). Es wäre daher zu klären, ob Testican-2 auch z.B. an Wachstumsfaktoren bindet. Um bei einer möglichen Bindung auch den potentiellen Einfluss der GAG-Ketten klären zu können, müsste zunächst endogenes Testican-2 aus Gewebe oder Zellüberstand aufgereinigt werden, da rekombinantes Testican-2 als Chondroitinsulfat/Heparansulfat-Mischform vorliegt. Mit diesem könnten dann *in vitro*-Bindungsstudien durchgeführt und durch parallele Analysen mit einer Testican-2-Form mit unvollständigen GAG-Ketten, die endogen z.B. durch Störung der Heparansulfat-Kettenbildung durch Zugabe von Natriumchlorat zu Zellen gewonnen werden kann, eine mögliche Bindung über die Heparansulfat-Ketten bestätigt werden.

Außerdem könnte Testican-2 aufgrund der starken Expression in endokrinen Organen möglicherweise mit Bildung und Sekretion von Hormonen im Zusammenhang stehen. Dazu wäre von Interesse, mittels Elektronenmikroskopie die subzelluläre Lokalisation von Testican-2 zu klären. Ferner könnte eine mögliche Bindung von Testican-2 an Hormone untersucht werden. Da Testican-2 z.B. die Hormone vor Abbau schützen könnte, wäre zu klären, ob dessen Thyropin-Sequenz wie bei Testican-1 [Bocock et al., 2003] als Proteaseinhibitor wirken kann. Eine weitere Möglichkeit, die Frage nach der Funktion von Testican-2 *in vivo* zu klären, ist die Deletion des Proteoglykans, die zur Zeit in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wird. Falls die homozygote Nullmutante jedoch keinen Phänotyp zeigen sollte, bedeutet das nicht zwangsläufig, dass Testican-2 nicht trotzdem wichtige Rolle in der Entwicklung und bei der adulten Maus spielt. Denn es besteht dann die Möglichkeit, dass Testican-1 oder Testican-3 z.B. in Nervengewebe vermehrt exprimiert werden und die Funktion von Testican-2 kompensieren. Auch genauere Untersuchungen der Testican-2-Nullmutanten könnten noch weitere Funktionen von Testican-2 aufdecken. So könnte Anhand dieser Nullmutanten z.B. eine mögliche Funktion von Testican-2 in Bezug auf die Blut-Hirn-Schranke verifiziert werden, indem die Durchlässigkeit dieser Barriere im Vergleich zum Wildtyp mit Hilfe von Injektion geeigneter, markierter Substanzen analysiert wird.

Abschließend kann gesagt werden, dass, obwohl in dieser Arbeit die genaue Rolle von Testican-2 nicht zu klären war, trotzdem viele neue Erkenntnisse über dieses bisher wenig untersuchte Proteoglykan ermittelt werden konnten, die uns dem Verständnis der Funktion von Testican-2 näherbringen und den Grundstein für weitere aufschlussreiche Untersuchungen legen.

4 Material und Methoden

4.1 Material

Alle verwendeten Chemikalien hatten die Qualität p.a. (pro analysis) und wurden, wenn nicht anders beschrieben, von den Firmen Fluka bzw. Sigma (Taufkirchen), Gibco™ bzw. Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Serva (Heidelberg) bezogen. Sämtliche Lösungen wurden mit entionisiertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Millipore) angesetzt. Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich die Angaben auf Raumtemperatur.

4.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

4.1.1.1 Chemikalien

Ammoniumchlorid, Cat. No. A4514	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat (APS), 10-%-Lösung in H ₂ O	Sigma, Taufkirchen
BCA Protein Assay Reagent, Pierce Chemical Co.	Rockford, IL, USA
β-D-Glukose, Cat. No. G5250	Sigma, Taufkirchen
Bisbenzimid, Cat. No. 33258	Hoechst, Frankfurt
Bis-Acrylamid Protogel [30 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)]	National Diagnostics, Atlanta, GA, USA
Complete® (Proteaseinhibitor-Mix) Tabletten, EDTA-frei, Cat. No 10098600	Roche, Mannheim
DPX Einschlussmittel für Histologie, Cat. No. 44581	Fluka, Taufkirchen
DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan), Cat. No. D2522	Sigma, Taufkirchen
DAB (Diaminobenzidin), Cat. No. D5637	Sigma, Taufkirchen
FuGene 6 (Transfektions-Reagenz), Cat. No. 1814443	Roche, Mannheim
Glukoseoxidase Typ VII, Cat. No. G2133	Sigma, Taufkirchen
Kristalviolett	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Heirler Cenovis, Radolfzell
Mowiol 4-88	Hoechst, Frankfurt
NP-40	Sigma, Taufkirchen
Ponceau-S (0,2 % in 3 % TCA)	Sigma, Taufkirchen
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin)	Sigma, Taufkirchen
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Tween 20	Sigma, Taufkirchen

4.1.1.2 Puffer

PB: 0,1 M Phosphatpuffer nach Sørensen mit pH 7,4

40,5 ml 0,2 M Na₂HPO₄
 9,5 ml 0,2 M NaH₂PO₄
 450 ml H₂O

PBS: 8,4 mM Na₂HPO₄

1,5 mM NaH₂PO₄
 137 mM NaCl
 2,7 mM KCl
 Einstellung des pH-Wertes von 7,4 mit HCl

TBS: 50 mM Tris/HCl, pH 7,4

150 mM NaCl
 Einstellung des pH-Wertes von 7,4 mit HCl

4x SDS-Probenpuffer: 4 ml 20% SDS
 0,5 ml 1 M Tris pH 6.8
 4 ml Glycerol
 0,1 ml 4% Bromphenolblau

Alle weiteren Puffer werden bei den entsprechenden Methoden beschrieben.

4.1.1.3 Verbrauchsmaterial

Chromatographie-Säulen: Poly-Prep[®], Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

ELISA-Mikrotiter-Platten: F96 Maxisorp Nunc-Immuno Plates und Lids for 96 U und
 F Microwell Plates SH, Nunc, Inc., Naperville, IL, USA
 Cell Culture, Costar[®], Corning Incorporated, Corning, NY,
 USA

Histo-Objektträger und mikroskopische Deckgläser: Shandon, Faust, Köln, Deutschland

Nitrocellulose-Membran: Protran NC, Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland

Röntgenfilm: Fuji Medical X-Ray Film RX, Fuji, Tokio, Japan.

Säulen-Materialien, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden: DEAE-Sepharose[®] Fast Flow
 CNBr-activated Sepharose 4B

4.1.1.4 Zellkulturmedien und Zubehör

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM),	Cat. No. 41965-039, Gibco [™] , Karlsruhe
Non essential Amino Acids (NEA),	Cat. No. 11140-035, Gibco [™] , Karlsruhe
L-Glutamine (200 mM),	Cat. No. 25030-024, Gibco [™] , Karlsruhe
Penicillin/Steptomycin,	Cat. No. 15140-122, Gibco [™] , Karlsruhe
Fetal Bovine Serum (FCS),	Cat. No. S0115, Biochrom KG, Berlin

HAT Media Supplement (50x) HybriMax[®], Cat. No. H0262, Sigma, Taufkirchen
 Geneticin G-418 sulphate, Cat. No. 11811-064 Gibco[™], Karlsruhe

4.1.1.5 pcDNA3-Expressionsvektor

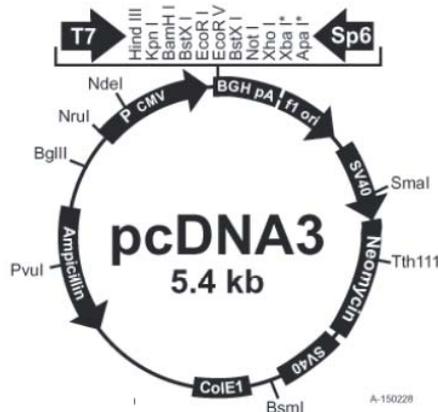


Abb. 4.1: Vektorkarte pcDNA3 (Invitrogen, Karlsruhe)

Bei dem pcDNA3 Vektor handelt es sich um einen eukaryontischen Expressionsvektor. Neben einem Resistenzgen für Ampicillin bzw. Neomycin besitzt er einen Promotor aus dem Zytomegalievirus (CMV) und einen SV40 Promotor sowie ein SV40 Polyadenylierungssignal und einen bakteriellen Replikationsursprung (ori).

4.1.2 Geräte

Brutschrank, Heraeus Instruments, Deutschland

Chromatographie-Anlage, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden (High-Load) :

- Säule: XK 26/40 (Länge 40 cm, Durchmesser 2,6 cm) für DEAE-Sepharose[®] Fast Flow
- UV-Zelle: Pharmacia LKB, Uvicord S II
- Fraktionierer: Pharmacia LKB, SuperFrac
- Schreiber: Pharmacia LKB, Rec 102
- Programmierer: Pharmacia LKB, Programmer GP-10 Plus
- Pumpe: Pump P-50
- Leitfähigkeitsmesszelle: Conductivity Monitor

Dounce Homogenisator, Bellco, USA

Elektrophorese-Apparaturen, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA

- Spannungsquelle: PS 500 XT DC Power Supply
- Gradientenmischer: SG 25 und 50
- Elektrophoresesysteme: SE Series Mighty Small
SE 400 Series Studier Standard
- Elektrotransfer auf Membranen: TE 22 Mighty Small Transphor Tank Transfer Unit
TE 42 Transphor Tank Transfer Unit

ELISA-Reader, Typ 352, Labsystems Multiskan MS, Labsystems Oy, Helsinki, Finnland

Kryostat VM 3050, Leica, Nussloch, Deutschland

Mikroskope, Zeiss, Jena: Axiolab

Axiophot mit Filtersätzen zur Grünanregung (Filtersatz 00)

Photometer: UV/VIS Spektrometer Lambda 40, Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland

Polytron Homogenisierer: Polytron PT 3000, Kinematica AG, Littau/Lucerne, Schweiz
Sterilbank, LaminAir[®] HB 2448, Heraeus Instruments, Deutschland

Wasseraufbereitungsanlage: Milli-Q PF Plus System, Millipore Corp., Bedford, MA, USA

Zentrifugen: Sigma 3K12, Sigma Laborzentrifugen, Osterode

Hermle Laborzentrifuge Z 233M-2, Hermle Labor-Technik, Wehingen

4.1.3 Antikörper

Primärantikörper

Polyklonaler Antikörper gegen murines rekombinantes Testican-2 (Coreprotein und GAG-haltige Form-1:1) aus Kaninchen, Pineda Antikörper-Service, Berlin.

Monoklonaler Antikörper gegen murines Nidogen-1 aus der Ratte, [Fox et al., 1991].

Polyklonaler Antikörper gegen murines EHS-Laminin aus Kaninchen, Prof. Paulsson, Institut für Biochemie II, Universität zu Köln.

Polyklonaler Antikörper gegen humanes $\alpha 1\beta 1$ -Integrin aus Kaninchen, Dr. Eble, Institut für Physiologische Chemie, Universität Münster.

Monoklonale Antikörper gegen humanes $\beta 1$ -Integrin aus Maus:

Klon 6S6, Cat. No. MAB2253, Chemicon, Temecula, USA,

Klon 9EG7, Dr. Eble, Institut für Biochemie, Universität Münster [Lenter et al., 1993],

Klon DE9, Cat. No. 05-232, Biomol, Hamburg,

Klon JB1A, Cat. No. MAB1965, Chemicon, Temecula, USA,

Klon P4C10, Cat. No. MAB1987, Chemicon, Temecula, USA.

Monoklonale Antikörper gegen humanes $\alpha 1$ -Integrin aus Maus:

Klon AGF-1, Dr. Gardner, Biogene, Cambridge, MA, USA,

Klon FB12, Cat. No. MAB1973, Chemicon, Temecula, USA.

Monoklonaler Antikörper gegen humanes $\alpha 6$ -Integrin aus Ratte:

Klon NKI-GoH3, Cat. No. MAB 1378, Chemicon, Temecula, USA.

Sekundärantikörper

Anti-Kaninchen-IgG, HRP(Horseradish Peroxidase)-gekoppelt aus Schwein, Code No. PH 0399, Dako, Glostrup, Dänemark

Anti-Kaninchen-IgG, Cy3-gekoppelt aus Ziege, Dianova, Hamburg, Deutschland

Anti-Ratte-IgG, Alexa488-gekoppelt aus Ziege, Molecular Probes, Leiden, Niederlande

4.1.4 Zelllinien

EBNA-293-Zellen: humane embryonale Nierenzelllinie (HEK 293), in deren Genom das EBNA-1 Gen integriert wurde und die eine G-418-Resistenz tragen

WI26-Zellen: humane Lungenfibroblasten

HaCaT-Zellen: humane Keratinozyten

PC12-Zellen: adrenale Phäochromocytomzellen aus Ratte

N2A-Zellen: murine Neuroblastomzellen

N18TG2-Zellen: murine Neuroblastomzellen

NG108-Zellen: fusionierte N18TG2 und C6-Zellen

C6-Zellen: Ratten-Gliomzellen

C2F3-Zellen: murine Myoblastenzellen

HT1080-Zellen: humane Fibrosarkomzellen

PAM212: murine Keratinozyten

4.1.5 Enzyme

Heparinase I (1,67 mIU/ μ l), Sigma, Steinheim, Cat. No. H2519

Heparinase III (0,33 mIU/ μ l), Sigma, Steinheim, Cat. No. H8891

Chondroitinase ABC (10 mIU/ μ l), Seikagaku, Tokyo, Japan, Cat. No. 100332-1

Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F) (1 IU/ μ l), Roche, Mannheim, Cat. No. 1365193

Die Lagerung von Heparinase I/III und Chondroitinase ABC erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, PNGase F wurde bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

4.1.6 Proteine

Protein-Molekulargewichtsstandards

HMW („High Molecular Weight“-)Marker (Fluka, Taufkirchen)

LMW („Low Molecular Weight“-)Marker (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden):

Proteine für Bindungsassays

Humanes Plasma-Fibronektin, Cat. No. FC010, Chemicon, Temecula, USA

Bovines Collagen Typ I (A), Cat. No. L7220, Biochrom, Berlin

Humanes Collagen Typ IV-Fragment (CB3), Dr. Eble, Institut für physiologische Chemie, Universität Münster

Murines Laminin-1 (EHS-Laminin), Dr. Timpl, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried

4.2 Methoden

Wenn nicht anders beschrieben, wurden die hier aufgeführten Methoden den Lehrbüchern „Antibodies: A laboratory manual“ von E. Harlow und D. Lane, „Molecular Cloning: A laboratory manual“ von J. Sambrook et al. und „Der Experimentator: Proteinchemie“ von H. Rehm entnommen und bei Raumtemperatur durchgeführt.

4.2.1 Proteinchemische Arbeiten

4.2.1.1 Proteinextrakte aus Gewebe

Tris/TBS-Extrakte

Bei -80 °C gelagerte oder frisch präpariertes Gewebe wurde auf Eis in fünffachem Volumen eisgekühlten Tris/EDTA- bzw. TBS/NP40-Puffer aufgetaut und im Fall von größeren Mengen sowie muskulärem Gewebe mit einem Polytron-Homogenisierer unter Kühlung zerkleinert. Kleinere Gewebemengen wurden direkt mit einem Glas-Homogenisator (Dounce) geschert bis eine homogene Suspension entstand (ca. 3-5 min). Der Gewebeextrakt wurde dann unter mehrmaligem Mischen für 30-60 min auf Eis inkubiert und 30 min bei 21000 g (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentrationen der erstellten Extrakte mit Hilfe eines BCA-Assays (s. 4.2.1.2) ermittelt.

Tris/EDTA-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7.4
10 mM EDTA
Complete-Proteaseinhibitor (1 Tablette pro 25 ml Puffer)

TBS/NP40-Puffer: 150 mM NaCl
50 mM Tris/HCl pH 7,4
2 mM EDTA
1 % NP40
Complete-Proteaseinhibitor (1 Tablette pro 25 ml Puffer)

Fraktionelle Extrakte

Bei -80 °C gelagertes oder frisch präpariertes Gewebe wurde auf Eis in TBS-Puffer aufgetaut und wie unter 4.2.1.1 beschrieben homogenisiert. Der Gewebeextrakt wurde dann unter mehrmaligem Mischen für 1 h auf Eis inkubiert, 30 min bei 21000 g (4 °C) zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde mit fünffachem Volumen eisgekühltem TBS/EDTA-Puffer vermischt, unter Rollen für 2 h bei 4 °C inkubiert und erneut 30 min bei 21000 g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet mit fünffachem Volumen TBS/Harnstoff-Puffer resuspendiert, 4 h bei 4 °C gerollt und 1 h bei 21000 g (4 °C) zentrifugiert. Diese Prozedur wurde mit dem Pellet in GuHCl-Puffer über Nacht wiederholt und der Extrakt wegen der schlechten Trennung von Überstand und Rückstand zwei- bis

dreimal 1 h bei 21000 g (4 °C) zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Proteinkonzentrationen der erstellten Extrakte wurde mit Hilfe des BCA-Assays (4.2.1.2) ermittelt.

TBS-Puffer: 150 mM NaCl
50 mM Tris/HCl pH 7,4
2 mM EDTA
Complete-Proteaseinhibitor (1 Tablette pro 25 ml)

TBS/EDTA-Puffer: 150 mM NaCl
50 mM Tris/HCl pH 7,4
10 mM EDTA
Complete-Proteaseinhibitor (1 Tablette pro 25 ml)

TBS/Harnstoff-Puffer: 4 M Harnstoff
150 mM NaCl
50 mM Tris/HCl pH 7,4
10 mM EDTA
Complete-Proteaseinhibitor (1 Tablette pro 25 ml)

GuHCl-Puffer: 6 M Guanidinhydrochlorid (GuHCl)
150 mM NaCl
50 mM Tris/HCl pH 7,4
10 mM EDTA
Complete-Proteaseinhibitor (1 Tablette pro 25 ml)

4.2.1.2 Proteinquantifizierung

Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Detektion von Proteinen ist aufgrund der Absorption des aromatischen Gerüsts von Tryptophan und Tyrosin bei 280 nm möglich. Unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten für Proteine bei 280 nm, korrigiert um den Wert bei 320 nm, um eventuelle Verunreinigungen zu erfassen, lässt sich die Proteinkonzentration mit folgender Formel berechnen:

$$c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \frac{(\text{OD } 280 \text{ nm} - \text{OD } 320 \text{ nm})}{\epsilon}$$

ϵ = für das Protein spezifische Extinktionskoeffizient [l/mol x cm]

BCA-Assay

Die Durchführung erfolgt nach Angaben des Herstellers. Als Referenz wurde eine Eichgerade verwendet, die durch das Messen eines BSA-Standards und anschließender linearer Regression erstellt wurde.

4.2.1.3 Proteinfällung

TCA-Fällung

Proteine können durch Säuren ausgefällt werden, da die pH-Verschiebung die Löslichkeit der Proteine beeinflusst. Dazu wurde die Proteinlösung mit ¼ Volumen 50 %-Trichloressigsäure (TCA)-Lösung und 0,1 %-Triton-X-100 für 30 min auf Eis inkubiert, die gefällten Proteine 10 min bei 13000 g und 4 °C zentrifugiert und das Pellet mit eisgekühltem 70%igen Ethanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Pellet an der Luft angetrocknet und in 1x SDS-Probenpuffer gelöst.

Ethanol-fällung

Zu der Probe wurde ein zehnfaches Volumen Ethanol (p.a.) gegeben und nach vorsichtigem Mischen über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 21000 g und 4 °C wurde das Pellet mit eisgekühltem 70%igen Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und in 1 x SDS-Probenpuffer resuspendiert.

4.2.1.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE unter Verwendung eines Tris/Glycin-Puffersystems durchlaufen die Proteine zuerst ein großporiges Sammelgel (pH 6,8), werden an der Grenzschicht zum Trenngel konzentriert und laufen als scharfe Bande in das Trenngel (pH 8,8) ein, wo sie nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Als Trennmatrix wurde eine Mischung aus Acrylamid und Bisacrylamid verwendet, die durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) polymerisiert wurde. Für das Sammelgel wurde eine Acrylamid-Konzentration von 4 % und für das Trenngel ein Acrylamid-Gradient von 4-15 % bzw. 8-15 % verwendet.

	Sammelgel (4%)	Trenngel (4%)	Trenngel (8%)	Trenngel (15%)
Protogel (30 % (w/v))	4,1 ml	3,6 ml	7,2 ml	13,6 ml
1 M Tris/HCl pH 8,8		10,2 ml	10,2 ml	10,2 ml
1 M Tris/HCl pH 6,8	3,7 ml			
H ₂ O	22,3 ml	12,8 ml	9,2 ml	2,8 ml
10 % SDS	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl
10 % APS	300 µl	100 µl	95 µl	85 µl
TEMED	41 µl	30 µl	24 µl	15 µl

Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris/HCl
192 mM Glycin
0,1 % SDS

Die zu untersuchenden Proben wurden mit 4xSDS-Probenpuffer versetzt, der bei reduzierender Probenaufarbeitung 5 % β -Mercaptoethanol enthielt, für 5 min auf 100 °C erwärmt und in die Geltaschen eingefüllt. Proben mit zu großem Volumen oder in Guanidinhydrochlorid-Puffer wurden vor der Auftrennung gefällt. Die Elektrophorese erfolgte unter Wasserkühlung bei konstanter Stromstärke von etwa 30 mA (1 h). Zur Abschätzung der Massen der Probenbanden wurden Eichproteine (Marker, s. 4.1.6) parallel mit aufgetrennt.

4.2.1.5 Western-Blot-Analyse

Die Proteine wurden entweder nach einer SDS-PAGE elektrophoretisch aus dem Gel heraus auf eine Nitrocellulosemembran transferiert oder mit Unterdruck auf die Membran aufgebracht und auf dieser dann mit Hilfe spezifischer Antikörper identifiziert. Der erste Antikörper band nach Blocken unspezifischer Bindungsstellen nur an das zu detektierende Protein und wurde mit Hilfe eines Enzym-gekoppelten zweiten Antikörpers sichtbar gemacht. An den zweiten Antikörper, der den Fc-Teil des ersten Antikörpers erkennt, war eine Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase) gekoppelt, die unter alkalischen Bedingungen und in Gegenwart von H_2O_2 die Oxidation von Luminol katalysierte. Als direktes Reaktionsprodukt entstand eine elektronisch angeregte Form des 3-Aminophthalats, das bei Relaxation in den elektronischen Grundzustand Strahlung abgab, die auf einem Röntgenfilm detektiert werden konnte.

Elektrotransfer auf eine Nitrocellulosemembran

Nach der SDS-PAGE wurde eine Nitrocellulosemembran kurz in Transfer-Puffer eingeweicht, das Gel anschließend luftblasenfrei auf die Nitrocellulosemembran und beides zwischen zwei Lagen feuchtes Whatman-3MM-Papier gelegt. Die fertige Transfereinheit wurde zwischen Schwammtüchern in eine Gitterkassette geklemmt und in die puffergefüllte Kammer gehängt. Der elektrophoretische Transfer der Proteine erfolgte bei konstanter Stromstärke von 250 mA (große Kammer) bzw. 100 mA (kleine Kammer) über Nacht bei 4 °C.

Transferpuffer: 50 mM Borsäure, pH 8,5
10 % MeOH

Slot-Blot

Die Slot-Blot-Analyse ist durch das schnelle Aufbringen der Proteine auf die Nitrocellulosemembran charakterisiert, wobei auf einen Elektrotransfer des Proteins verzichtet werden kann. Stattdessen erfolgt der Antigenauftrag mittels Unterdruck unter Verwendung einer Slot-Blot-Kammer. Die Proteine liegen hier im Gegensatz zu den nach SDS-PAGE elektrophoretisch transferierten Proteinen in nativer Form vor.

Die Nitrocellulosemembran wurde auf Größe der Slot-Blot-Kammer zurechtgeschnitten, mit Wasser angefeuchtet, in die vorgesehene Vertiefung der Kammer platziert und die Kammer mittels Schrauben fest verschlossen. Dann wurde die gewünschte, in 100 μ l TBS verdünnte

Proteinmenge in die Vertiefungen (Slots) eingebracht und der untere Teil der Apparatur mit einer Vakuum-erzeugenden Wasserstrahlpumpe verbunden. Um sicher zu gehen, dass die gesamte Proteinmenge aufgesaugt wird, wurde das entstandene Vakuum für 5 min aufrechterhalten. Die Membran wurde kurz mit TBS gewaschen und mit 5 % Milchpulver blockiert. Anschließend erfolgte der immunologische Nachweis, wie im Folgenden beschrieben.

Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine

Um nach der Elektrophorese die Proteinbanden auf der Nitrocellulose sichtbar zu machen, erfolgte eine reversible Anfärbung mit Ponceau S-Lösung. Die Markerbanden wurden mit wasserfestem Stift markiert und nach Anfertigung einer Kopie des gefärbten Blots mit TBS wieder vollständig entfärbt. Nach einstündiger Inkubation mit Blockierungslösung zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde für 1 h mit dem anti-Testican-2(fl)-Antikörper in Blockierungslösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,05 % Tween 20 in TBS erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem zweiten, Peroxidase-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper, der im Verhältnis von 1:2500 mit Blockierungslösung verdünnt eingesetzt wurde. Nach drei Waschschritten mit 0,05 % Tween 20 in TBS und einem weiteren mit Wasser wurden die Proteine dann durch Chemolumineszenz mit ECL-Lösung detektiert und die resultierenden Signale auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

anti-Testican-2-Antikörper	Verdünnung
ungereinigte Seren	1:500 bzw. 1:1000
affinitätsgereinigt (vor Abreicherung der Kreuzreaktion)	1:75-1:100
affinitätsgereinigt (nach Abreicherung der Kreuzreaktion)	1:50-1:75

Blockierungslösung: 5 % Milchpulver in TBS

ECL-Lösung: Lösung A 5 ml 100 mM Tris/HCl pH 8,5
 22 µl p-Coumarinsäure (90 mM in DMSO)
 50 µl 3-Aminophthalhydrazide (Luminol, 250 mM in DMSO)
Lösung B 5 ml 100 mM Tris/HCl pH 8,5
 3 µl H₂O₂ (30 %)

Lösungen A und B wurden kurz vor der Verwendung zusammengegeben.

Ab Kapitel 2.2 wurde die Kreuzreaktion des gereinigten anti-Testican-2-Antikörpers gegenüber Testican-1(fl) durch zweistündige Vorinkubation des Antikörpers mit 2 ng Protein pro 10 ng Antikörper in Anwesenheit von 1 % BSA in TBS-Puffer unterdrückt. Die Antikörper-Verdünnung betrug bei Anwendung mit Vorinkubation 1:40-1:50.

4.2.1.6 Anreicherung von Testican-2 aus Proteinextrakt des Gehirns

Aufgrund der negativen Ladung der GAG-Ketten können Proteoglykane von anderen Proteinen abgetrennt werden. Daher wurde zur Anreicherung von Testican-2 aus TBS-Mausgehirn-Extrakt (2.2.3.1) ein schwacher Anionenaustauschers (DEAE Fast Flow) verwendet. Zur Vermeidung von Protein-Abbau wurde der Säulenlauf in Anwesenheit von 7 M Harnstoff durchgeführt.

18 g Maus-Gehirngewebe (4-12 Wochen) wurden mit TBS-Puffer wie unter 4.2.1.1 beschrieben extrahiert und 70 ml Extrakt nach Entfernung letzter Schwebestoff durch Filtration mit 8 M Harnstoff-Puffer auf eine Endkonzentration von 7 M Harnstoff und 50 mM Natriumchlorid (NaCl) gebracht. Der vorbereitete Gehirnextrakt wurde nun bei 4 °C mit einer Geschwindigkeit von 1-1,5 ml/min über eine Säule mit äquilibrierter DEAE-Sepharose Fast Flow-Säulenmaterial gepumpt. Das Waschen der Säule und die Elution der gebundenen Proteine wurden mit Hilfe des High Load-Systems (s. 4.1.2) bei 4 °C unter Kontrolle der eluierten Proteine am UV-Monitor bei 280 nm und Aufzeichnung der ermittelten Werte durch einen Schreiber durchgeführt. Die Säule wurde bei einer Flussgeschwindigkeit von 1,5 ml/min mit 30 ml bei einer Salzkonzentration von 75 mM (5 % DEAE-Puffer 2) gewaschen und mit insgesamt 180 ml Puffer in 3 ml-Fractionen mit einem linearen Salzgradienten von 75 mM bis 1 M (66 % DEAE-Puffer 2) eluiert. Die verschiedenen Salzkonzentrationen wurden durch Mischung von DEAE-Puffer 1 und 2 erzeugt. Die Untersuchung der eluierten Fractionen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (4.2.1.4) und Western-Blot-Analyse (4.2.1.5).

Harnstoff-Puffer: 8 M Harnstoff
 35,7 mM NaCl
 50 mM Tris
 10 mM EDTA

DEAE-Puffer 1: 7 M Harnstoff pH 7,4
 50 mM Tris
 10 mM EDTA

DEAE-Puffer 2: 7 M Harnstoff pH 7,4
 1,5 mM NaCl
 50 mM Tris
 10 mM EDTA

4.2.1.7 Analyse der Glykoformen

Analyse von GAG-Ketten

Um das Vorhandensein von Glykosaminoglykanen (GAG) auf einem Proteoglykan zu untersuchen sowie deren Art zu identifizieren, kann das Proteoglykan mit geeigneten, für bestimmte GAG-Ketten spezifischen Lyasen inkubiert und damit gegebenenfalls die entsprechenden GAG-Ketten abgespalten werden. Der Erfolg dieser Prozedur kann mittels Western-Blot-Analyse verfolgt werden und äußert sich in Verringerung des apparenten Molekulargewichts („Shift“) der typischen, polydispersen Proteoglykan-Bande, die nach vollständiger Abspaltung aller GAG-Ketten einer distinkten Bande weichen sollte.

Zur Identifizierung der GAG-Ketten von Testican-2 wurde dieses einem enzymatischen Verdau mit einer Heparansulfat-spaltenden Lyase (Heparinase I/III) und/oder einer Chondroitinsulfat/Dermatansulfat-spaltenden Lyase (Chondroitinase ABC) unterzogen. Bei der GAG-Analyse von rekombinantem Testican-2 wurden jeweils 100-200 ng gereinigtes Protein und bei der Analyse von endogenem Testican-2 TBS/EDTA-Extrakte von Hypophyse (50 µg), Nebenniere (175 µg) und Gehirn (200 µg) einer adulten Maus sowie Gehirn einer neugeborenen (Postnataltag 6) Maus (200 µg) untersucht. Die Inkubation der Enzyme erfolgte in Puffern mit nach Hersteller-Hinweisen optimalem pH-Wert und in Anwesenheit gegebenenfalls erforderlicher Ionen. Die Testican-2-Lösungen wurden dazu durch Zusatz von Stocklösungen auf folgende Endkonzentrationen gebracht (Da in den Puffern der Gewebeextrakte 10 mM EDTA enthalten sind, wurde diesen jeweils 14 mM CaCl₂ zugegeben.):

Puffer:	<u>Heparinase:</u>	20 mM Tris/HCl pH 7,5
		50 mM NaCl
		4 mM CaCl ₂
	<u>Chondroitinase:</u>	20 mM Tris/HCl pH 8,0
		50 mM NaCl
		50 mM NaAcetat pH 7,7
	<u>Kombination:</u>	20 mM Tris/HCl pH 7,5
		50 mM NaCl
		4 mM CaCl ₂
		50 mM NaAcetat pH 7,7

Pro Ansatz wurden je 3 µl Enzym verwendet, was den folgenden Enzymmengen entsprach:

3 µl Heparinase I = 0,5 mIU

3 µl Heparinase III = 0,1 mIU

3 µl Chondroitinase ABC = 30 mIU

Die Inkubation mit Heparinase I und III erfolgte bei 37 °C über Nacht und mit Chondroitinase ABC für zweimal 2 h bei 37 °C. Für den Doppelverdau mit beiden Enzymen wurde das Protein erst mit Heparinase I/III über Nacht und am nächsten Tag mit Chondroitinase ABC

inkubiert. Die Negativkontrolle wurde unter Zusatz gleicher Puffermengen parallel durchgeführt. Aufgrund der großen Probenmengen wurden die mit Enzym inkubierten Gewebeextrakte vor der Western-Blot-Analyse mit Ethanol über Nacht bei 4 °C gefällt (s. 4.2.1.3).

Analyse der N-Glykane

Analog zur Analyse von GAG-Ketten können auch potentielle N-Glykane durch Inkubation mit geeigneten Enzymen nachgewiesen werden. Die Proteinlösung wird dafür mit Peptid-N-Glykosidase (PNGase) F inkubiert und Änderungen des Molekulargewichts mittels Western-Blot-Analyse verfolgt.

Zum Nachweis von N-Glykanen wurden 50 ng der GAG-freien Form von rekombinatem Testican-2 bzw. 50 µg Hypophysenextrakt, das zuvor zur Abspaltung der Heparansulfatketten in Anwesenheit von 4 mM Calcium für 10 h bei 37 °C mit Heparinase I/III inkubiert wurde (s. 4.2.1.7), in TBS-Puffer (pH 7,4) mit 1 % SDS versetzt, 15 min auf 95 °C erhitzt und dann kurz abzentrifugiert. Danach wurden die Proben mit TBS bis zu einer SDS-Endkonzentration von 0,1 % verdünnt, 0,5 % NonidentP40 zugesetzt und mit 1 IU (rekombinantes Protein) bzw. 2 IU (Gewebeextrakt) PNGase F über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Negativkontrollen wurden analog behandelt und alle Proben vor der Western-Blot-Analyse mit Ethanol (s. 4.2.1.3) gefällt.

4.2.2 Affinitätsreinigung des anti-Testican-2-Antikörpers aus Kaninchen

Ungereinigte polyklonale Antiseren weisen im Western-Blot neben spezifischen Signalen oft auch Kreuzreaktionen auf. Um diese zu verringern, wurde der Antikörper mit Hilfe einer Affinitätssäule gereinigt. Dabei handelte es sich um eine CNBr-aktivierte Sepharosesäule mit kovalent gekoppeltem Antigen. Da nach der ersten Affinitätsreinigung des aus Kaninchen stammenden anti-Testican-2(fl)-Antikörpers mittels einer Testican-2-Affinitätssäule noch Kreuzreaktionen zu beobachten waren, wurde der Antikörper erneut gereinigt. Dazu wurden die kreuzreagierenden Antikörper zunächst über eine Affinitätssäule mit gekoppeltem EBNA-293-Zellextrakt abgereichert und die spezifischen anti-Testican-2-Antikörper dann mit Hilfe einer Testican-2-Affinitätssäule angereichert (Schema: s. Abb. 2.7).

4.2.2.1 Erstellung des Protein-Extraktes aus EBNA-Zellen

EBNA-Zellen von 25 Platten (Ø 10 cm) wurden mittels Trypsin abgelöst, die Zellmembranen in 10 ml Extraktionspuffer mit einem Homogenisator geschert und die Probe für 30 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde dann 45 min bei 21000 g (4 °C) abzentrifugiert und der Überstand zweimal 6 h und einmal 12 h bei 4 °C gegen den Kopplungspuffer (s. 4.2.2.2) dialysiert.

Extraktionspuffer: 0,15 M NaCl
0,05 M Tris/HCl pH 7,4
0,01 M EDTA
Complete-Proteaseinhibitor (1 Tablette pro 25 ml)

4.2.2.2 Gießen der Affinitätssäulen

Die gewünschte Menge gefriergetrocknete Matrix wurde abgewogen (1 g Matrix ergibt 3,5 ml Gelvolumen,) und in 1 mM HCl suspendiert. Nach mehrmaligem Wechseln der HCl-Lösung war die Sepharose aktiviert und gequollen und konnte gekoppelt werden. Da die Kopplung der Proteine an die Säulenmatrix über Aminogruppen erfolgte, darf die Proteinlösung außer dem Protein selbst keine Komponenten mit Aminogruppen enthalten. Da sowohl die Zellextrakte, als auch das rekombinante Testican-2 in Tris-Puffer vorlag, wurde das Protein vor der Bindung an die Matrix daher zweimal 6 h und einmal 12 h bei 4 °C gegen Kopplungspuffer dialysiert.

Kopplungspuffer: 0,1 M NaHCO₃ pH 8,3
0,5 M NaCl

Die in HCl suspendierte Matrix und die Proteinlösungen wurden zusammengegeben und über Nacht bei 4 °C gerollt. Für Erstellung der Antigen säule wurden 500 µg gereinigtes rekombinantes Testican-2 (beide Formen 1:1) und 500 µl Gelmatrix und für Erstellung der Zellextrakt-Säule 29 mg EBNA-Zellextrakt mit 3,2 ml Gelmatrix inkubiert. Der Überstand wurde am nächsten Tag bei 1000 g abzentrifugiert, abgenommen und photometrisch vermessen, um den nicht gebundenen Anteil an Protein zu bestimmen. Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurde das Sepharose-Protein-Gemisch dann für 2 h mit 0,1 M Tris pH 8,0 inkubiert und in eine kleine Säule gepackt. Danach wurde die Säule mit alternierendem pH gewaschen und dazu je zehn Säulenvolumen eines Acetat- bzw. Tris-Puffers verwendet. Der Vorgang wurde dreimal wiederholt und die Säule anschließend in TBS äquilibriert.

Acetatpuffer: 0,1 M NaAcetat pH 4,0
0,5 M NaCl

Tris-Puffer: 0,1 M Tris pH 8,0
0,5 M NaCl

4.2.2.3 Anreicherung spezifischer Antikörper

Affinitätsreinigung mit der Antigen säule

Die Elution mit einem starken Salz wie Kaliumthiocyanat (KSCN) ermöglicht die Abtrennung stark affiner Antikörper-Epitope von der Säule. Da aber sowohl die Antigen-Matrix als auch die gereinigten Antikörper angegriffen werden, muss die Elution der Fraktionen einschließlich

Ansatz der Dialyse gegen TBS innerhalb von 30 min erfolgen. Die komplette Reinigung wurde im Kühlraum durchgeführt.

Das anti-Testican-2-Antiserum wurde zunächst für 1 h bei 13000 g und 4 °C zentrifugiert, mit einem Volumen TBS versetzt, langsam über die Säule gegeben und nach Waschen mit fünf Säulenvolumen (SV) TBS mit 3 M KSCN (in TBS) eluiert. Die eluierten Fraktionen wurden sofort gegen TBS dialysiert und die Säule mit TBS gewaschen. Nach dreimaliger Dialyse von insgesamt 18 h bei 4 °C wurden die Fraktionen photometrisch vermessen und Fraktionen mit mehr als 70 µg/ml gepoolt.

Antikörperreinigung mit Abreicherung kreuzreagierender Antikörper

Zur Abreicherung der kreuzreagierenden Antikörper wurde das zentrifugierte und mit TBS verdünnte anti-Testican-2-Antiserum zunächst über die Affinitätssäule mit gekoppeltem EBNA-Zellextrakt gegeben und die gebundenen Antikörper nach Waschen mit 5 SV TBS mittels 3 M KSCN eluiert. Danach wurde im durchgeflossenen Serum verbliebende kreuzreagierende Antikörper erneut über die Zellextrakt-Säule abgereichert und aus dem abgereicherten Serum die spezifischen anti-Testican-2-Antikörper dann mit Hilfe einer Testican-2-Affinitätssäule angereichert (4.2.2.3). Beide Säulen wurden nach der Elution mit 10 SV TBS gewaschen und in TBS mit 0,01 % Azid bei 4 °C gelagert.

4.2.2.4 Titerbestimmung mit Hilfe eines Festphasen-Immunoassays: ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Zur Charakterisierung des anti-Testican-2-Antiserums bzw. der gereinigten anti-Testican-2-Antikörper wurde eine konstante Menge Antigen an eine Mikrotiterplatte gebunden, eine Verdünnungsreihe des Antikörpers erstellt und die verschiedenen Verdünnungen im ELISA eingesetzt. Der gebundene Antikörper wurde mit Hilfe eines spezifischen zweiten Antikörpers detektiert, an den ein die Umsetzung eines Farbstoffes (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) katalysierendes Enzym gekoppelt war. Der Farbstoff ging nach Zugabe von 20%iger Schwefelsäure in eine Konfiguration mit Absorptionsmaximum bei 450 nm über und konnte im ELISA-Reader detektiert werden. Bei halblogarithmischer Auftragung des Verdünnungsfaktors gegen die Extinktion erhielt man eine sigmoide Sättigungskurve. Der Titer wird als Verdünnungsfaktor bei halbmaximaler Extinktion definiert und ermöglicht eine Beurteilung des Anteils spezifischer Antikörper im Antiserum sowie einen Vergleich der Spezifität des Antikörpers gegenüber dem Antigen und anderen verwandten Proteinen.

200 µl in TBS gelöstes Antigen (5 µg/ml) wurden in die Vertiefung der Mikrotiterplatte gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dann wurde fünfmal mit PBS/0,02 % Tween-20 gewaschen und unspezifische Bindungsstellen 1 h bei 37 °C mit 200 µl Blockierungslösung abgesättigt. Die Blockierungslösung wurde auch zur Verdünnung der Antikörper verwendet. Die Inkubation mit 100 µl Primärantikörper-Lösung verschiedener Verdünnungen (1:6,25 bis 1:409600) wurde ebenfalls für 1 h bei 37 °C durchgeführt. Nach fünfmaligem Waschen mit

0,02 % Tween-20 in PBS wurde wieder für 1 h bei 37 °C mit 100 µl des zugehörigen Peroxidase-gekoppelten anti-Kaninchen-Zweitantikörpers in einer Verdünnung von 1:4000 inkubiert. Abschließend folgten wieder fünf Waschschriffe mit 0,02 % Tween-20 in PBS und zwei mit Wasser. Zur Erzeugung der Farbreaktion wurde bei RT bis zur deutlichen Färbung mit 100 µl Farbstofflösung inkubiert und die Reaktion dann durch Zugabe desselben Volumens von 20%iger H₂SO₄ gestoppt. Die gefärbten Lösungen wurden mittels eines ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch vermessen.

Blockierungslösung: 1 % BSA in TBS

Farbstofflösung: 18 ml Wasser
2 ml 1 M Natriumacetat/Citronensäure-Puffer, pH 6
125 µl 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidinlösung (10 mg/ml in DMSO)
15 µl 3,5 % H₂O₂ (10 µl 30 % H₂O₂ + 75,5 µl H₂O)

4.2.3 Histologische Methoden

4.2.3.1 Herstellung der Gewebeschnitte

Frisch präpariertes Mausegewebe wurde zunächst 5 min in Tissue-Tek[®]-Einbettlösung inkubiert, auf Trockeneis in der gewünschten Lage darin eingebettet und die fertigen Blöcke bei -80 °C gelagert. Die Schnitte wurden bei -10 bis -20 °C in einem Kryostat angefertigt, wobei die Wahl der geeigneten Temperatur von Objektträger und Kammer in Abhängigkeit von dem jeweiligen zu schneidenden Gewebe getroffen wurde. Es wurden sagittale, transversale oder longitudinale Schnitte verschiedener Organe von adulten Mäusen (älter als acht Wochen) und Mausembryonen (Embryonalstage 5,5; 6,5; 7,5; 8,5; 9,5; 10,5; 12,5; 14,5; 16,5) sowie einer neugeborenen Maus (Postnataltag 1,5) mit einer Schnittdicke von 7 bis 9 µm erstellt. Die Schnitte wurden auf Objektträger überführt und bei -20 °C gelagert.

Wegen der geringen Größe der Mausembryonen zum Beginn der Entwicklung, wurden diese bis E 9,5 mit Uterusgewebe eingebettet; ab E 10,5 wurde der Embryo vor der Einbettung aus dem Uterus präpariert.

4.2.3.2 Färbungen

Immunofluoreszenz-Färbung

Zur Lokalisierung und Detektion von Proteinen in Gewebe wurde die indirekte Immunofluoreszenz-Färbung verwendet. Dabei wurde ein spezifischer Antikörper an das Antigen gebunden und mit einem Cy3-markierten Zweitantikörper visualisiert. Bei der Cy3-Markierung handelt es sich um das Fluorochrom-Indocarbocyanin, das eine maximale Absorption bei 553 nm (grün) und Emission bei 575 nm (rot) aufweist.

Die Kryoschnitte wurden etwa 1 h an der Luft getrocknet, 15 min in 2 % Paraformaldehyd-Lösung fixiert, je einmal mit PBS, TBS und 0,1 % Triton in TBS (TBS/Triton) gewaschen

und zur Reduktion einer möglichen Hintergrundfärbung 10 min in 100 mM Glycin in TBS/Triton inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS/Triton wurden die Schnitte mit 10 % BSA in TBS/Triton blockiert und über Nacht bei 4 °C mit dem ersten Antikörper, verdünnt in 1% FCS und 1% BSA in TBS/Triton, inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit TBS/Triton entfernt und der Schnitt für 1 h mit dem entsprechenden Zweitantikörper, ebenfalls verdünnt in 1 % FCS und 1 % BSA in TBS/Triton, inkubiert. Danach wurde zweimal mit TBS/Triton und einmal mit TBS gewaschen und die Schnitte für eine Kernfärbung für 10 min mit Bisbenzimid-Lösung (Stocklösung: 1 mg/ml MeOH) verdünnt in TBS mit 1:1500 inkubiert. Zuletzt wurden die Schnitte dreimal mit TBS und einmal mit Wasser gewaschen und die fast trockenen Schnitte mit Elvanol eingebettet.

	Antikörper	Verdünnung
Primärantikörper	anti-Testican-2-Antikörper (Kaninchen)	1:75
	anti-EHS-Laminin-Antikörper (Kaninchen)	1:1000
	anti-Nidogen-1-Antikörper (Ratte)	1:50
Sekundärantikörper	anti-Kaninchen-Cy3-Antikörper	1:400
	anti-Ratte-Alexa488-Antikörper	1:1000

4 % Paraformaldehyd: 400 ml H₂O auf 60 °C erwärmen
 20 g Paraformaldehyd einrühren
 1 N NaOH zugeben bis Lösung wieder klar ist
 50 ml 10x PBS zugeben und filtrieren
 pH-Wert mit HCl auf 7,4 einstellen
 auf 500 ml mit H₂O auffüllen
 bei -20 °C in Aliquots lagern

Elvanol: 12 g Mowiol 4-88 mit
 30 ml H₂O versetzen, kurz rühren und 2 h bei RT stehen lassen
 60 ml 0,2 M Tris/HCl pH 8,5 zugeben und unter Rühren lösen
 30 g Glycerin zugeben und 10 min bei 56 °C rühren
 15 min bei 5000 g zentrifugieren und klaren Überstand mit
 2 g DABCO versetzen (2,5 % Endkonzentration)
 bei -20 °C in Aliquots lagern

Immunhistochemische Färbung (DAB-Färbung)

Der Primärantikörper kann auch durch eine histochemische Färbung visualisiert werden. Diese bot die Möglichkeit, am Mikroskop Übersichtsaufnahmen eines ganzen Embryo zu erstellen.

Die Kryoschnitte wurden getrocknet, fixiert und dann einmal mit PBS und zweimal mit TBS gewaschen. Zur Reduktion möglicher Peroxidaseaktivität erfolgte nun eine 20-minütige Inkubation in 1 % H₂O₂ in TBS, gefolgt von drei Waschschrritten mit TBS/Triton. Dann wurde zur Reduktion einer Hintergrundfärbung 10 min in 100 mM Glycin in TBS/Triton inkubiert und wieder dreimal mit TBS/Triton gewaschen. Die Blockierung erfolgte 1 h in 10% FCS und 1 % BSA in TBS/Triton und die Erstantikörper-Inkubation über Nacht bei 4 °C in 1 % FCS und 1 % BSA in TBS/Triton (Antikörper und Verdünnungen siehe oben). Nach erneutem Waschen mit TBS/Triton wurden die Schnitte mit einem HRP-gekoppelten anti-Kaninchen-Antikörper aus Schwein bei einer Verdünnung von 1:100 inkubiert und dann zweimal mit TBS/Triton und einmal mit PBS gewaschen. Der Zweitantikörper wurde zur Sichtbarmachung mit einer Diaminobenzidin(DAB)-Lösung inkubiert und die Entwicklung der Signale mit einem Lichtmikroskop verfolgt. Erschienen die Signale deutlich genug, wurde die DAB-Lösung entfernt und die Schnitte dreimal mit PBS und einmal mit Wasser gewaschen. Die Schnitte wurden dann mit Hilfe einer steigenden Alkoholreihe entwässert und mit DPX eingedeckelt.

DAB-Lösung: 1 ml Phosphatpuffer nach Sørensen mit pH 7,4 (s. 4.1.1.2)
 + 12 µl Diaminobenzidin-Lösung (50 mg/ml in PB)
 + 12 µl NH₄Cl (40 mg/ml in PB)
 + 24 µl NiSO₄ (130 mg/ml in H₂O)
 + 24 µl β-D-Glukose (100 mg/ml in H₂O)
 + 4 µl Glukoseoxidase (1,2 mg/ml in H₂O)

Lösungen kurz vor Inkubation der Schnitte zusammengeben und filtrieren

Steigende Alkoholreihe: 2 min 50 % EtOH
 2 min 70 % EtOH
 2 min 90 % EtOH
 2 min 96 % EtOH
 2 x 2 min Isopropanol
 2 x 5 min Xylol I

Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Bei der HE-Färbung handelt es sich um eine Übersichtsfärbung. Kerne und Knorpelsubstanz werden blau gefärbt, das Cytoplasma wird rötlich und die Muskulatur und Bindegewebe erscheinen abgestuft rosa.

Die Kryoschnitte wurden je 5 min mit PBS und destilliertem Wasser gewaschen und dann 10 min mit 4%iger Paraformaldehydlösung fixiert. Danach werden die Objektträger für 10-15 min in einer kommerziellen Hämatoxylin-Färbelösung inkubiert, mit Leitungswasser abgespült, kurz in 1%igem HCl-Alkohol (EtOH) differenziert bis nur die Kerne blau-rot erscheinen und unter fließendem Leitungswasser 10 min gebläut. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte 5-10 min in 0,5%iger Eosinlösung inkubiert und dann in 70%igem Alkohol

differenziert bis das Cytoplasma rosa und die Erythrozyten rot erscheinen. Zuletzt wurden die Schnitte über die steigende Alkoholreihe entwässert und mit DPX eingebettet.

Hämalaun: 1 g Hämatoxylin
0,2 g Natriumjodat
50 g Kaliumalaun (Kaliumaluminiumsulfat Dodecahydrat)
50 g Chloralhydrat
1 g Zitronensäure
filtrieren und in dunkler Flasche aufbewahren

Eosinlösung (0,5 %): 1 % Eosin
99 % EtOH
mit destilliertem Wasser 1:1 verdünnt

Steigende Alkoholreihe: 1 min 70 % EtOH
1 min 96 % EtOH
2 x 1 min Isopropanol
2 x 5 min Xylol

4.2.4 Zellkulturarbeiten

Alle in dieser Arbeit verwendeten Säugetierzellen wurden in Brutschränken bei 5-7 % CO₂, 37 °C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden aseptisch in Sterilbänken mit autoklavierten Glasgeräten oder sterilen Kunststoffgegenständen ausgeführt. Die Zellen wurden regelmäßig mit frischem Medium versorgt und passagiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer.

Auftauen von Zellen

Das Auftauen von Zellen erfolgte in einem Wasserbad bei 37 °C. Die Zellen wurden in 10 ml Medium aufgenommen und 5 min bei 1000 g zentrifugiert, um das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu entfernen. Das Zellpellet wurde dann in 10 ml frischem Medium aufgenommen und auf eine Gewebekulturschale überführt.

Passagieren von Zellen

Um die Zellen vom Boden der Kulturschale zu lösen, wurde den Zellen mit EDTA die dafür benötigten zweiwertigen Kationen entzogen und durch Zusatz von Trypsin die für die Anheftung verantwortlichen Rezeptoren zerstört. Da das im Medium vorhandene FCS Trypsin-inhibitoren enthält, wurde das alte Medium zunächst abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach dem Waschen wurde den Zellen die EDTA/Trypsin-Lösung (0,25 %/2 mM) zugesetzt und diese im Brutschrank solange inkubiert, bis sie sich vom Untergrund lösten. Durch Zugabe von frischem, serumhaltigem Medium wurde das Trypsin inaktiviert, die

Zellen mit Hilfe einer Pipette vereinzelt und Aliquots der Zellsuspension auf mehrere Platten verteilt und mit frischem Medium versetzt.

Zellkulturmedien:

C2F3-Zellen: DMEM + 20 % FCS + 10 U/100 µg/ml Penicillin/Streptomycin
+ 2 mM Glutamat

NG108-Zellen: DMEM + 10 % FCS + 10 U/100 µg/ml Penicillin/Streptomycin
+ 2 mM Glutamat + 1 x HAT Media Supplement

N2A-Zellen: DMEM + 10 % FCS + 10 U/100 µg/ml Penicillin/Streptomycin
+ 2 mM Glutamat + 1 % NEA

(transfiziert) (+ 800 µg/ml Geneticin G-418 sulphate)

EBNA-293-Zellen: DMEM + 10 % FCS + 10 U/100 µg/ml Penicillin/Streptomycin
+ 2 mM Glutamat + 350 µg/ml Geneticin G-418 sulphate

(transfiziert) (+ 1 µg/ml Puromycin)

übrige Zellen: DMEM + 10 % FCS + 10 U/100 µg/ml Penicillin/Streptomycin
+ 2 mM Glutamat

Ernte serumfreier Überstände

Zur Überprüfung der Expression einzelner Proteine im Zellkulturüberstand wurden die Zellen serumfrei gesetzt. Dazu wurden sie mit PBS gewaschen und 48 h mit serumfreiem Medium kultiviert. Die Überstände wurden abgenommen, mit Proteaseinhibitor versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Einfrieren von Zellen

Nach Ablösung der Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung und anschließenden Zentrifugieren wurden die Zellen in Einfriermedium (Medium + 10 % DMSO) aufgenommen und die Zellen vereinzelt. Das DMSO soll die Bildung von Eiskristallen beim Einfrierprozess verhindern. Die Zellsuspension wurde in Cryo-Röhrchen (Greiner-Labortechnik) überführt und langsam bei -80 °C eingefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Transfektion von N2A-Zellen

Bei der Lipofektion wird in einem Vektor klonierte DNA mit einer Art Micelle umgeben und durch Verschmelzen von Micelle und Zellmembran in die Zelle befördert. Ein Teil der Vektor-DNA wird dann in das Genom integriert. Um eine stabile Transfektion und damit eine effektive Proteinexpression über einen längeren Zeitraum zu gewährleisten, wird ein Vektor mit eingebautem Resistenzgen verwendet und durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums Zellen mit in das Genom integriertem Vektor selektioniert.

Die Transfektionen von N2A-Zellen mit einem pcDNA-Vektor (4.1.1.5) inklusive Testican-2-Volllänge-Konstrukt (ohne *His-Myc-Tag*; stand in der Arbeitsgruppe zur Verfügung) wurden

mit FuGene (Roche, Mannheim) durchgeführt. In ein Eppendorfgesäß wurden dazu 94 µl serumfreies Medium vorgelegt und tropfenweise 6 µl FuGene hinzugefügt. Die Mischung wurde vorsichtig mit der Pipettenspitze umgerührt, 5 min inkubiert und vorsichtig in ein zweites Gefäß mit 2 µg DNA überführt. Nach 15 min wurde das Gemisch dann zu einer mit frischem Medium versorgten und ca. 70 %-konfluent bewachsenen Platte mit Zellen getropft. Nach 24 Stunden begann die Selektion mit Geneticin G-418 sulphate (800 µg/ml) und wurde beendet, als auf einer Kontrollplatte mit nicht transfizierten Zellen, die ebenfalls mit dem Antibiotika-haltigen Medium inkubiert wurden, keine Zellen mehr zu beobachten waren.

4.2.5 Bindungs- und Inhibitionsassay

4.2.5.1 Bindungsassay

Zur Analyse einer möglichen Bindung von Zellen an ein Protein in Abhängigkeit von dessen Konzentration wurden mit destilliertem H₂O Verdünnungsreihen dieser Proteine in einem Konzentrationsbereich von 0,5-30 µg/ml angefertigt und damit Vertiefungen von Zellkulturkompatiblen 96-Well Platten (Costar) beschichtet. Dazu wurden je 100 µl Proteinlösung in die Vertiefungen gegeben, über Nacht bei 4 °C inkubiert und am nächsten Tag mögliche freie Bindungsstellen mit 100 µl 1% BSA in H₂O für 3-4 h ebenfalls bei 4 °C blockiert.

Dann wurden Zellen (WI26 oder HaCaT) von ein oder zwei konfluent-gewachsene Platten mit Hilfe von Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst, mit serumhaltigem Medium resuspendiert, gut vereinzelt und ihre Anzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden nun 5 min bei 1000 g zentrifugiert, der Überstand entfernt und soviel reines DMEM-Medium zugesetzt, dass man eine Endkonzentration von 300.000 (WI26) bzw. 400.000 (HaCaT) Zellen/ml erhielt. Die Zellsuspension wurde dann zur Vereinzelnung der Zellen gemischt und dann je 100 µl der Zellsuspension pro Vertiefung mit einer 12-Kanal-Pipette auf die Platte gegeben. Als Negativkontrolle wurden auch Vertiefungen ohne Protein mit Zellsuspension versetzt. Die Zellen wurden auf den Substraten etwa 30 (WI26) bis 40 min (HaCaT) im Brutschrank (5 % CO₂, 37 °C) inkubiert und die mögliche Adhäsion der Zellen unter dem Mikroskop beobachtet. Nach der Inkubation wurden nicht gebundene Zellen entfernt, die anhaftenden Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen, 10 min mit 1 % Glutaraldehyd in PBS fixiert, 25 min mit je 100 µl 0,1 % Kristallviolett in destilliertem H₂O gefärbt und die überschüssige Farbe durch gründliches Waschen mit destilliertem Wasser entfernt. Zur Quantifizierung der gefärbten Zellen wurde die Farbe durch Zusatz von je 50 µl 0,2 % Triton-X-100 in destilliertem H₂O aus den gefärbten Zellen herausgelöst. Die Farbintensität der Lösung wurde nach 1 h mit einem ELISA-Reader bei 540 nm bestimmt und war proportional zur Anzahl der gefärbten Zellen. Die gemessenen Werte wurden dann um den Wert einer unspezifischen Zellbindung korrigiert. Dazu wurde in einigen Vertiefungen die oben beschriebene Prozedur ohne vorherige Beschichtung mit Protein durchgeführt. Zur Beur-

teilung der Signifikanz der ermittelten Werte wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt und die Standardabweichung ermittelt.

4.2.5.2 Untersuchung des Einflusses der GAG-Ketten auf die Zelladhäsion

Eine 96-Well-Platte wurde mit zwei Verdünnungsreihen von rekombinantem, GAG-haltigem Testican-2 über Nacht bei 4 °C beschichtet und ein Teil des gebundenen Proteins erst mit Heparinase I/III (2 h) und dann Chondroitinase ABC (1 h) in dem entsprechenden Puffer (s. 4.2.1.7) inkubiert. Der andere Teil wurde nur mit Puffer versetzt. Nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Platte analog zu 4.2.5.1 mit einer Suspension von WI26-Zellen (250.000 Zellen/ml) für 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, die adhären Zellen nach Waschen fixiert, mit Kristalviolett angefärbt und mit einer Triton-Lösung solubilisiert. Die Menge an herausgelöstem Farbstoff wurde mittels Extinktion bei einer Wellenlänge von 540 nm bestimmt.

4.2.5.3 Inhibitionsassay

Um zu untersuchen, ob es sich bei einer beobachteten Zelladhäsion um eine Integrin-vermittelte Bindung handelte, wurde versucht, die Adhäsion der Zellen mit anti-Integrin-Antikörpern gegen verschiedene Integrin-Untereinheiten zu inhibieren. Dazu wurde eine 96-Well-Platten mit Proteinlösungen einer einheitlichen Konzentration beschichtet und, wie unter 4.2.5.1 beschrieben, inkubiert und blockiert. Die jeweiligen Protein-Konzentrationen wurden den unter 4.2.5.1 ermittelten Bindungskurven entnommen und entsprachen in etwa dem Beginn der Sättigung. (20-30 µg/ml Testican-2, 10 µg/ml Collagen Typ I, 30 µg/ml EHS-Laminin).

Dann wurden WI26- bzw. HaCaT-Zellen wie bei 4.2.5.1 beschrieben einzeln, gezählt, in serumfreiem Medium aufgenommen und mit verschiedenen Konzentrationen an anti-Integrin-Antikörpern versetzt. Dabei lag die Antikörper-Konzentration des β 1-Integrin-Antikörpers (Klon DE9, Biomol) bei 0,313-5 µg/ml (entspricht einer Verdünnung von 1:100-1:3200, WI-26) bzw. 0,625-10 µg/ml (entspricht einer Verdünnung von 1:50-1:1600, HaCaT). Der anti- α 1-Integrin-Antikörper (Klon FB12, Chemicon) und der anti- α 6-Integrin-Antikörper (Klon NKI-GoH3, Chemicon) wurden in einem Konzentrationsbereich von 0,078-10 µg/ml (Verdünnung 1:50-1:12800) eingesetzt. Das Zell-Antikörper-Gemisch wurde dann, wie unter 4.2.5.1 beschrieben, bei 37 °C inkubiert, die Zellen gewaschen, gefärbt und nach Inkubation mit Triton-Lösung die der Zellzahl proportionalen Extinktion ermittelt. Als Positivkontrolle dienten Vertiefungen, die mit Zellen ohne Zusatz von Antikörper inkubiert worden, und als Negativkontrolle, analog zu 4.2.5.1, nicht beschichtete Vertiefungen. Aus wirtschaftlichen Gründen wurde hier nur eine Doppelbestimmung durchgeführt und daraus dann die Standardabweichung ermittelt.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Expressionsort und -form des Testican-2-Proteins in der Maus mit besonderer Fokussierung auf die Lokalisation im Verlauf der Entwicklung untersucht. Des Weiteren wurde das Verhalten von Testican-2 in Bezug auf Zelladhäsion geprüft und potentielle Bindungspartner identifiziert.

Ein polyklonaler Testican-2-Antikörper wurde zu Beginn affinitätsgereinigt und eine verbliebende Kreuzreaktivität gegen eine unbekanntes intrazelluläres Protein erfolgreich abgereichert.

Während der embryonalen Entwicklung konnte Testican-2 zum ersten Mal an Embryonaltag (E) 6,5 beobachtet werden. Zunächst lag es assoziiert an die Basalmembran zwischen den Keimblättern vor (E 6,5-9,5), danach zeigte es eine eher Zell-assoziierte Färbung in Herzmuskulatur (ab E 9,5), Nervensystem und den darin enthaltenen Blutgefäßen (ab E 10,5), Skelettmuskulatur (ab E 14,5), endokrinen Drüsen (ab E 16,5) und Lunge (ab Postnataltag 1,5). In der adulten Maus war Testican-2 verbreitet im Nervengewebe inklusive Blutgefäßen und in definierten Strukturen endokriner Organe sowie in Lunge zu detektieren, zeigte aber keine Expression mehr in Herz und Muskel. Die Färbung im zentralen Nervensystem war, abgesehen von den Endothelzellen der Blutgefäße, auf Neurone begrenzt.

Bei der Analyse der Glykoformen von Testican-2 konnten sowohl GAG-Ketten als auch N-Glykane nachgewiesen werden, wobei rekombinantes Testican-2 Chondroitinsulfat- und Heparansulfat-Ketten aufwies, während bei endogenem Testican-2 nur Heparansulfat-Ketten zu beobachten waren.

In Zellbindungsstudien konnte eine schwache, Ionen-abhängige Bindung von Fibroblasten und Keratinozyten an Testican-2 nachgewiesen werden. Mittels Zell-Inhibitionsstudien mit einem anti- $\beta 1$ -Integrin-Antikörper sowie Protein-Protein-Interaktionsstudien war es möglich, $\alpha 1\beta 1$ -Integrin als Bindungspartner von Testican-2 zu identifizieren. Die Bindung an $\alpha 1\beta 1$ -Integrin war Konformations-abhängig und mit Antikörpern gegen $\alpha 1$ - und $\beta 1$ -Integrin signifikant inhibierbar. Anhäsion von RuGli-Gliom-Zellen an Testican-2 zeigte die physiologische Relevanz der Interaktion von Testican-2 und $\alpha 1\beta 1$ -Integrin. Dabei war eine Spreitung der Zellen und die Konzentration von $\alpha 1\beta 1$ -Integrin an fokalen Kontakten zu beobachten.

6 Literaturverzeichnis

- Akiyama SK, Yamada SS, Chen WT, and Yamada KM. 1989.** Analysis of fibronectin receptor function with monoclonal antibodies: roles in cell adhesion, migration, matrix assembly, and cytoskeletal organization. *J Cell Biol* **109**: 863-75.
- Alliel PM, Perin JP, Jolles P, and Bonnet FJ. 1993.** Testican, a multidomain testicular proteoglycan resembling modulators of cell social behaviour. *Eur J Biochem* **214**: 347-50.
- Amthor H, Connolly D, Patel K, Brand-Saberi B, Wilkinson DG, 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**: 343-62.
- Arikawa-Hirasawa E, Watanabe H, Takami H, Hassell JR, and Yamada Y. 1999.** Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat Genet* **23**: 354-8.
- Bandtlow CE, and Zimmermann DR. 2000.** Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev* **80**: 1267-90.
- Barber AJ, and Lieth E. 1997.** Agrin accumulates in the brain microvascular basal lamina during development of the blood-brain barrier. *Dev Dyn* **208**: 62-74.
- Bartram U, Molin DG, Wisse LJ, Mohamad A, Sanford LP, Doetschman T, Speer CP, Poelmann RE, and Gittenberger-de Groot AC. 2001.** Double-outlet right ventricle and overriding tricuspid valve reflect disturbances of looping, myocardialization, endocardial cushion differentiation, and apoptosis in TGF-beta(2)-knockout mice. *Circulation* **103**: 2745-52.
- BaSalamah MA, Marr HS, Duncan AW, and Edgell CJ. 2001.** Testican in human blood. *Biochem Biophys Res Commun* **283**: 1083-90.
- Basu A, Kligman LH, Samulewicz SJ, and Howe CC. 2001.** Impaired wound healing in mice deficient in a matricellular protein SPARC (osteonectin, BM-40). *BMC Cell Biol* **2**: 15.
- Bauer HC, Steiner M, and Bauer H. 1992.** Embryonic development of the CNS microvasculature in the mouse: new insights into the structural mechanisms of early angiogenesis. *Exs* **61**: 64-8.
- Bazzoni G, Shih DT, Buck CA, and Hemler ME. 1995.** Monoclonal antibody 9EG7 defines a novel beta 1 integrin epitope induced by soluble ligand and manganese, but inhibited by calcium. *J Biol Chem* **270**: 25570-7.
- Becker C, Buttler P, and Graber HG. 2002.** Influence of anti-CD49f and anti-CD29 monoclonal antibodies on mitotic activity of epithelial cells (HaCaT) and gingival fibroblasts *in vitro*. *Eur J Oral Sci* **110**: 397-403.
- Bendik I, Schraml P, and Ludwig CU. 1998.** Characterization of MAST9/Hevin, a SPARC-like protein, that is down-regulated in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* **58**: 626-9.
- Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, and Zako M. 1999.** Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* **68**: 729-777.
- Bleil JD, and Wassarman PM. 1980.** Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev Biol* **76**: 185-202.
- Bocock JP, Edgell CJ, Marr HS, and Erickson AH. 2003.** Human proteoglycan testican-1 inhibits the lysosomal cysteine protease cathepsin L. *Eur J Biochem* **270**: 4008-15.

- Bonnet F, Perin JP, Charbonnier F, Camuzat A, Roussel G, Nussbaum JL, and Alliel PM. 1996.** Structure and cellular distribution of mouse brain testican. Association with the postsynaptic area of hippocampus pyramidal cells. *J Biol Chem* **271**: 4373-80.
- Bonnet F, Perin JP, Maillet P, Jolles P, and Alliel PM. 1992.** Characterization of a human seminal plasma glycosaminoglycan-bearing polypeptide. *Biochem J* **288 (Pt 2)**: 565-9.
- Bork P, Downing AK, Kieffer B, and Campbell ID. 1996.** Structure and distribution of modules in extracellular proteins. *Q Rev Biophys* **29**: 119-67.
- Bosman FT, and Stamenkovic I. 2003.** Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol* **200**: 423-8.
- Bourin MC, Boffa MC, Bjork I, and Lindahl U. 1986.** Functional domains of rabbit thrombomodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 5924-8.
- Bouvard D, Brakebusch C, Gustafsson E, Aszodi A, Bengtsson T, Berna A, and Fassler R. 2001.** Functional consequences of integrin gene mutations in mice. *Circ Res* **89**: 211-23.
- Bradshaw AD, Puolakkainen P, Dasgupta J, Davidson JM, Wight TN, and Helene Sage E. 2003.** SPARC-null mice display abnormalities in the dermis characterized by decreased collagen fibril diameter and reduced tensile strength. *J Invest Dermatol* **120**: 949-55.
- Brakebusch C, Seidenbecher CI, Asztely F, Rauch U, Matthies H, Meyer H, Krug M, Bockers TM, Zhou X, Kreutz MR, Montag D, Gundelfinger ED, and Fassler R. 2002.** Brevican-deficient mice display impaired hippocampal CA1 long-term potentiation but show no obvious deficits in learning and memory. *Mol Cell Biol* **22**: 7417-27.
- Brancaccio M, Cabodi S, Belkin AM, Collo G, Koteliansky VE, Tomatis D, Altruda F, Silengo L, and Tarone G. 1998.** Differential onset of expression of alpha 7 and beta 1D integrins during mouse heart and skeletal muscle development. *Cell Adhes Commun* **5**: 193 bis 205.
- Brandan E, and Hirschberg CB. 1988.** Purification of rat liver N-heparan-sulfate sulfotransferase. *J Biol Chem* **263**: 2417-22.
- Brunetti A, and Goldfine ID. 1990.** Role of myogenin in myoblast differentiation and its regulation by fibroblast growth factor. *J Biol Chem* **265**: 5960-3.
- Bullock SL, Fletcher JM, Beddington RS, and Wilson VA. 1998.** Renal agenesis in mice homozygous for a gene trap mutation in the gene encoding heparan sulfate 2-sulfotransferase. *Genes Dev* **12**: 1894-906.
- BurrIDGE K, FATH K, KELLY T, NUCKOLLS G, and TURNER C. 1988.** Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* **4**: 487-525.
- Cancilla PA, and DeBault LE. 1983.** Neutral amino acid transport properties of cerebral endothelial cells *in vitro*. *J Neuropathol Exp Neurol* **42**: 191-99.
- Carter WG, Wayner EA, Bouchard TS, and Kaur P. 1990.** The role of integrins alpha 2 beta 1 and alpha 3 beta 1 in cell-cell and cell-substrate adhesion of human epidermal cells. *J Cell Biol* **110**: 1387-404.
- Chan CS, Weeber EJ, Kurup S, Sweatt JD, and Davis RL. 2003.** Integrin requirement for hippocampal synaptic plasticity and spatial memory. *J Neurosci* **23**: 7107-16.
- Charbonnier F, Chanoine C, Cifuentes-Diaz C, Gallien CL, Rieger F, Alliel PM, and Perin JP. 2000.** Expression of the proteoglycan SPOCK during mouse embryo development. *Mech Dev* **90**: 317-21.
- Cheifetz S, Andres JL, and Massague J. 1988a.** The transforming growth factor-beta receptor type III is a membrane proteoglycan. Domain structure of the receptor. *J Biol Chem* **263**: 16984-91.

- Cheifetz S, Bassols A, Stanley K, Ohta M, Greenberger J, and Massague J. 1988b.** Heterodimeric transforming growth factor beta. Biological properties and interaction with three types of cell surface receptors. *J Biol Chem* **263**: 10783-9.
- Choi ES, Rettig WJ, Wayner EA, Srour ML, and Clegg DO. 1994.** Functional identification of integrin laminin receptors that mediate process outgrowth by human SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurosci Res* **37**: 475-88.
- Cifuentes-Diaz C, Alliel PM, Charbonnier F, de la Porte S, Molgo J, Goudou D, Rieger F, and Perin JP. 2000.** Regulated expression of the proteoglycan SPOCK in the neuromuscular system. *Mech Dev* **94**: 277-82.
- Costell M, Gustafsson E, Aszodi A, Morgelin M, Bloch W, Hunziker E, Addicks K, Timpl R, and Fassler R. 1999.** Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. *J Cell Biol* **147**: 1109-22.
- Darribère T, Skalski M, Cousin HL, Gaultier A, Montmory C, and Alfandari D. 2000.** Integrins: regulators of embryogenesis. *Biol Cell* **92**: 5-25.
- De Groot E, Feijen A, Eib D, Zwijsen A, Sugino H, Martens G, and Van Den Eijnden-Van Raaij AJ. 2000.** Expression patterns of follistatin and two follistatin-related proteins during mouse development. *Int J Dev Biol* **44**: 327-30.
- Dedhar S, and Hannigan GE. 1996.** Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. *Curr Opin Cell Biol* **8**: 657-69.
- Delany AM, 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**: 915-23.
- Diepen R. 1962.** Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen VII: Der Hypothalamus. *Springer-Verlag, Berlin*.
- Douglas SP, and Kadler KE. 1998.** Specific glycanforms of type IX collagen accumulate in embryonic chick sterna after 17 days of development. *Glycobiology* **8**: 1013-9.
- Dransfield I, Cabanas C, Craig A, and Hogg N. 1992.** Divalent cation regulation of the function of the leukocyte integrin LFA-1. *J Cell Biol* **116**: 219-26.
- Driessens MH, Van Rijthoven EA, Kemperman H, and Roos E. 1995.** Adhesion of lymphoma cells to fibronectin: differential use of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrins and stimulation by the 9EG7 mAb against the murine beta 1 integrin subunit. *Cell Adhes Commun* **3**: 327-36.
- Dym M. 1994.** Basement membrane regulation of Sertoli cells. *Endocr Rev* **15**: 102-15.
- 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**: 455-64.
- Dziadek M, and Timpl R. 1985.** Expression of nidogen and laminin in basement membranes during mouse embryogenesis and in teratocarcinoma cells. *Dev Biol* **111**: 372-82.
- Eckhardt M, Bukalo O, Chazal G, Wang L, Goridis C, Schachner M, Gerardy-Schahn R, Cremer H, and Dityatev A. 2000.** Mice deficient in the polysialyltransferase ST8SialIV/PST-1 allow discrimination of the roles of neural cell adhesion molecule protein and polysialic acid in neural development and synaptic plasticity. *J Neurosci* **20**: 5234-44.
- Eickelberg O, Centrella M, Reiss M, Kashgarian M, and Wells RG. 2002.** Betaglycan inhibits TGF-beta signaling by preventing type I-type II receptor complex formation. Glycosaminoglycan modifications alter betaglycan function. *J Biol Chem* **277**: 823-9.
- Elices MJ, Urry LA, and Hemler ME. 1991.** Receptor functions for the integrin VLA-3: fibronectin, collagen, and laminin binding are differentially influenced by Arg-Gly-Asp peptide and by divalent cations. *J Cell Biol* **112**: 169-81.

- Elvin JA, Yan C, and Matzuk MM. 2000.** Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility. *Mol Cell Endocrinol* **159**: 1-5.
- Eppig JJ, Chesnel F, Hirao Y, O'Brien MJ, Pendola FL, Watanabe S, and Wigglesworth K. 1997.** Oocyte control of granulosa cell development: how and why. *Hum Reprod* **12**: 127-32.
- Eriksson I, Sandback D, Ek B, Lindahl U, and Kjellen L. 1994.** cDNA cloning and sequencing of mouse mastocytoma glucosaminyl N-deacetylase/N-sulfotransferase, an enzyme involved in the biosynthesis of heparin. *J Biol Chem* **269**: 10438-43.
- Fässler R, and Meyer M. 1995.** Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. *Genes Dev* **9**: 1896-908.
- Fitzgerald MC, and Schwarzbauer JE. 1998.** Importance of the basement membrane protein SPARC for viability and fertility in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* **8**: 1285-8.
- Ford-Perriss M, Turner K, Guimond S, Apedaile A, Haubeck HD, Turnbull J, and Murphy M. 2003.** Localisation of specific heparan sulfate proteoglycans during the proliferative phase of brain development. *Dev Dyn* **227**: 170-84.
- Forsberg E, and Kjellen L. 2001.** Heparan sulfate: lessons from knockout mice. *J Clin Invest* **108**: 175-80.
- Fox JW, Mayer U, Nischt R, Aumailley M, Reinhardt D, Wiedemann H, Mann K, Timpl R, Krieg T, Engel J, et al. 1991.** Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. *Embo J* **10**: 3137-46.
- Franke RP. 1995.** Die extrazelluläre Matrix – Struktur und Funktion. *HARTMANN WundForum* **3/95**: 21-24.
- Fukamauchi F, Aihara O, and Kusakabe M. 1998.** The effects of central administration of neuropeptide Y on behavior of tenascin-gene knockout mice. *Neuropeptides* **32**: 461-4.
- Fukamauchi F, Mataga N, Wang YJ, Sato S, Youshiki A, and Kusakabe M. 1996.** Abnormal behavior and neurotransmissions of tenascin gene knockout mouse. *Biochem Biophys Res Commun* **221**: 151-6.
- Gailit J, and Ruoslahti E. 1988.** Regulation of the fibronectin receptor affinity by divalent cations. *J Biol Chem* **263**: 12927-32.
- Gardner H, Kreidberg J, Kotliansky V, and Jaenisch R. 1996.** Deletion of integrin alpha 1 by homologous recombination permits normal murine development but gives rise to a specific deficit in cell adhesion. *Dev Biol* **175**: 301-13.
- Garwood J, Schnadelbach O, Clement A, Schutte K, Bach A, and Faissner A. 1999.** DSD-1-proteoglycan is the mouse homolog of phosphacan and displays opposing effects on neurite outgrowth dependent on neuronal lineage. *J Neurosci* **19**: 3888-99.
- Gehlsen KR, Dickerson K, Argraves WS, Engvall E, and Ruoslahti E. 1989.** Subunit structure of a laminin-binding integrin and localization of its binding site on laminin. *J Biol Chem* **264**: 19034-8.
- Gehlsen KR, Dillner L, Engvall E, and Ruoslahti E. 1988.** The human laminin receptor is a member of the integrin family of cell adhesion receptors. *Science* **241**: 1228-9.
- Genini M, Schwalbe P, Scholl FA, and Schafer BW. 1996.** Isolation of genes differentially expressed in human primary myoblasts and embryonal rhabdomyosarcoma. *Int J Cancer* **66**: 571-7.
- Giebel J, Loster K, and Rune GM. 1997.** Localization of integrin beta 1, alpha 1, alpha 5 and alpha 9 subunits in the rat testis. *Int J Androl* **20**: 3-9.

- Gilmour DT, Lyon GJ, Carlton MB, Sanes JR, Cunningham JM, Anderson JR, Hogan BL, Evans MJ, and Colledge WH. 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**: 1860-70.
- Ginsberg MH, Loftus JC, D'Souza S, and Plow EF. 1990.** Ligand binding to integrins: common and ligand specific recognition mechanisms. *Cell Differ Dev* **32**: 203-13.
- Girard JP, and Springer TA. 1995.** Cloning from purified high endothelial venule cells of hevin, a close relative of the antiadhesive extracellular matrix protein SPARC. *Immunity* **2**: 113-23.
- Girard JP, and Springer TA. 1996.** Modulation of endothelial cell adhesion by hevin, an acidic protein associated with high endothelial venules. *J Biol Chem* **271**: 4511-7.
- Gongidi V, Ring C, Moody M, Brekken R, Sage EH, Rakic P, and Anton ES. 2004.** SPARC-like 1 Regulates the Terminal Phase of Radial Glia-Guided Migration in the Cerebral Cortex. *Neuron* **41**: 57-69.
- Greene LA, and Tischler AS. 1976.** Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**: 2424-8.
- Grenz H, Carbonetto S, and Goodman SL. 1993.** Alpha 3 beta 1 integrin is moved into focal contacts in kidney mesangial cells. *J Cell Sci* **105** (Pt 3): 739-51.
- Grobe K, Ledin J, Ringvall M, Holmborn K, Forsberg E, Esko JD, and Kjellen L. 2002.** Heparan sulfate and development: differential roles of the N-acetylglucosamine N-deacetylase/N-sulfotransferase isozymes. *Biochim Biophys Acta* **1573**: 209-15.
- Gude WD, Crosgrave GE und Hirsch GP. 1982.** Histological Atlas of the Laboratory Mouse. *Plenum Press, New York, USA*.
- Guermah M, Crisanti P, Laugier D, Dezelee P, Bidou L, Pessac B, and Calothy G. 1991.** Transcription of a quail gene expressed in embryonic retinal cells is shut off sharply at hatching. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 4503-7.
- Gustafsson E, and Fassler R. 2000.** Insights into extracellular matrix functions from mutant mouse models. *Exp Cell Res* **261**: 52-68.
- Hambrock H. 2001.** Struktur-Funktions-Beziehungen der extrazellulären Calcium-bindendem Proteine SC1/Hevin und TSC-36/FRP. *Dissertation, Universität zu Köln*.
- Hambrock HO, Nitsche DP, Hansen U, Bruckner P, Paulsson M, Maurer P, and Hartmann U. 2003a.** SC1/hevin. An extracellular calcium-modulated protein that binds collagen I. *J Biol Chem* **278**: 11351-8.
- Hambrock HO, Kaufmann B, Muller S, Hanisch FG, Nose K, Paulsson M, Maurer P, and Hartmann U. 2003b.** Structural characterization of TSC-36/Flik. Analysis of two charge isoforms. *J Biol Chem*.
- Harlow E und Lane D. 1988.** Antibodies: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA*.
- Hartmann U, and Maurer P. 2001.** Proteoglycans in the nervous system--the quest for functional roles *in vivo*. *Matrix Biol* **20**: 23-35.
- Hatten ME. 1999.** Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci* **22**: 511-539.
- Hechler D. 2003.** Lokalisation von Testican-3 in Maus und Untersuchung von alternativen Splicevarianten. *Diplomarbeit, Universität zu Köln*.

- Heino J, Ignatz RA, Hemler ME, Crouse C, and Massague J. 1989.** Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor-beta. Concomitant regulation of integrins that share a common beta 1 subunit. *J Biol Chem* **264**: 380-8.
- Heino J, and Massague J. 1990.** Cell adhesion to collagen and decreased myogenic gene expression implicated in the control of myogenesis by transforming growth factor beta. *J Biol Chem* **265**: 10181-4.
- Hemler ME. 1990.** VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu Rev Immunol* **8**: 365-400.
- Herndon ME, and Lander AD. 1990.** A diverse set of developmentally regulated proteoglycans is expressed in the rat central nervous system. *Neuron* **4**: 949-61.
- Hintermann E, Bilban M, Sharabi A, and Quaranta V. 2001.** Inhibitory role of alpha 6 beta 4-associated erbB-2 and phosphoinositide 3-kinase in keratinocyte haptotactic migration dependent on alpha 3 beta 1 integrin. *J Cell Biol* **153**: 465-78.
- Hirosaki T, Tsubota Y, Kariya Y, Moriyama K, Mizushima H, and Miyazaki K. 2002.** Laminin-6 is activated by proteolytic processing and regulates cellular adhesion and migration differently from laminin-5. *J Biol Chem* **277**: 49287-95.
- Hoffman S, and Edelman GM. 1983.** Kinetics of homophilic binding by embryonic and adult forms of the neural cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 5762-6.
- Hoffman S, Sorkin BC, White PC, Brackenbury R, Mailhammer R, Rutishauser U, Cunningham BA, and Edelman GM. 1982.** Chemical characterization of a neural cell adhesion molecule purified from embryonic brain membranes. *J Biol Chem* **257**: 7720-9.
- Hohenadl C, Mann K, Mayer U, Timpl R, Paulsson M, and Aeschlimann D. 1995.** Two adjacent N-terminal glutamines of BM-40 (osteonectin, SPARC) act as amine acceptor sites in transglutaminaseC-catalyzed modification. *J Biol Chem* **270**: 23415-20.
- 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**: 3778-86.
- Horacek MJ, Kawaguchi T, and Terracio L. 1994.** Adult adeno-hypophysial cells express beta 1 integrins and prefer laminin during cell-substratum adhesion. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **30A**: 35-40.
- Hynes RO. 2002.** Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**: 673-87.
- Ignatz RA, Heino J, and Massague J. 1989.** Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor-beta. Regulation of vitronectin receptor and LFA-1. *J Biol Chem* **264**: 389-92.
- Iozzo RV. 1998.** Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* **67**: 609-52.
- Japon MA, Rubinstein M, and Low MJ. 1994.** *In situ* hybridization analysis of anterior pituitary hormone gene expression during fetal mouse development. *J Histochem Cytochem* **42**: 1117-25.
- Johnston IG, Paladino T, Gurd JW, and Brown IR. 1990.** Molecular cloning of SC1: a putative brain extracellular matrix glycoprotein showing partial similarity to osteonectin/BM40/SPARC. *Neuron* **4**: 165-76.
- Johnston IM, Spence HJ, Winnie JN, McGarry L, Vass JK, Meagher L, Stapleton G, and Ozanne BW. 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**: 5348-58.
- Junqueira LC und Carneiro J. 1996.** Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. *Springer-Verlag, Berlin*.

- Kaufmann MH. 1998.** The Atlas of Mouse Development. *Academic Press, London, Grossbritannien.*
- Kaufmann MH und Bard JBL. 1999.** The Anatomical Basis of Mouse Development. *Academic Press, London, Grossbritannien.*
- Kawamata H, Furihata T, Omotehara F, Sakai T, Horiuchi H, Shinagawa Y, Imura J, Ohkura Y, Tachibana M, Kubota K, Terano A, and Fujimori T. 2003.** Identification of genes differentially expressed in a newly isolated human metastasizing esophageal cancer cell line, T.Tn-AT1, by cDNA microarray. *Cancer Sci* **94**: 699-706.
- Kjellén L, and Lindahl U. 1991.** Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem* **60**: 443-75.
- Kohfeldt E, Maurer P, Vannahme C, and Timpl R. 1997.** Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican. *FEBS Lett* **414**: 557-61.
- Koivisto L, Larjava K, Hakkinen L, Uitto VJ, Heino J, and Larjava H. 1999.** Different integrins mediate cell spreading, haptotaxis and lateral migration of HaCaT keratinocytes on fibronectin. *Cell Adhes Commun* **7**: 245-57.
- Kokenyesi R, and Bernfield M. 1994.** Core protein structure and sequence determine the site and presence of heparan sulfate and chondroitin sulfate on syndecan-1. *J Biol Chem* **269**: 12304-9.
- Kolset SO, Prydz K, and Pejler G. 2004.** Intracellular proteoglycans. *Biochem J Pt.*
- Konrad L, Albrecht M, Renneberg H, Ulrix W, Hoeben E, Verhoeven G, and Aumuller G. 2000.** Mesenchymal entactin-1 (nidogen-1) is required for adhesion of peritubular cells of the rat testis *in vitro*. *Eur J Cell Biol* **79**: 112-20.
- Kresse H, Seidler DG, Muller M, Breuer E, Hausser H, Roughley PJ, and Schonherr E. 2001.** Different usage of the glycosaminoglycan attachment sites of biglycan. *J Biol Chem* **276**: 13411-6.
- Laemmli UK. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5.
- Lane TF, and Sage EH. 1990.** Functional mapping of SPARC: peptides from two distinct Ca²⁺-binding sites modulate cell shape. *J Cell Biol* **111**: 3065-76.
- Larrain J, Carey DJ, and Brandan E. 1998.** Syndecan-1 expression inhibits myoblast differentiation through a basic fibroblast growth factor-dependent mechanism. *J Biol Chem* **273**: 32288-96.
- Lenarcic B, and Bevec T. 1998.** Thyropins--new structurally related proteinase inhibitors. *Biol Chem* **379**: 105-11.
- Lenter M, Uhlig H, Hamann A, Jenö P, Imhof B, and Vestweber D. 1993.** A monoclonal antibody against an activation epitope on mouse integrin chain beta 1 blocks adhesion of lymphocytes to the endothelial integrin alpha 6 beta 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 9051-9055.
- Li JP, Gong F, Hagner-McWhirter A, Forsberg E, Abrink M, Kisilevsky R, Zhang X, and Lindahl U. 2003.** Targeted disruption of a murine glucuronyl C5-epimerase gene results in heparan sulfate lacking L-iduronic acid and in neonatal lethality. *J Biol Chem* **278**: 28363-6.
- Lin X, Wei G, Shi Z, Dryer L, Esko JD, Wells DE, and Matzuk MM. 2000.** Disruption of gastrulation and heparan sulfate biosynthesis in EXT1-deficient mice. *Dev Biol* **224**: 299-311.
- Lindgren P. 1999.** Effects of the proteoglycan Testican-2 on cell adhesion and axonal outgrowth *in vitro*. *Master thesis in Biology, University of Cologne.*

- Liu C, Litscher ES, Mortillo S, Sakai Y, Kinloch RA, Stewart CL, and Wassarman PM. 1996.** Targeted disruption of the mZP3 gene results in production of eggs lacking a zona pellucida and infertility in female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 5431-6.
- Lopez-Casillas F, Cheifetz S, Doody J, Andres JL, Lane WS, and Massague J. 1991.** Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell* **67**: 785-95.
- Lopez-Casillas F, Wrana JL, and Massague J. 1993.** Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* **73**: 1435-44.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. 1951.** Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.
- Luque A, Sanchez-Madrid F, and Cabanas C. 1994.** Functional regulation of the human integrin VLA-1 (CD49a/CD29) by divalent cations and stimulatory beta 1 antibodies. *FEBS Lett* **346**: 278-84.
- Mann K, Deutzmann R, Paulsson M, and Timpl R. 1987.** Solubilization of protein BM-40 from a basement membrane tumor with chelating agents and evidence for its identity with osteonectin and SPARC. *FEBS Lett* **218**: 167-72.
- Marr HS, Basalamah MA, Bouldin TW, Duncan AW, and Edgell CJ. 2000.** Distribution of testican expression in human brain. *Cell Tissue Res* **302**: 139-44.
- Marr HS, and Edgell CJ. 2003.** Testican-1 inhibits attachment of Neuro-2a cells. *Matrix Biol* **22**: 259-66.
- Mashimo J, Maniwa R, Sugino H, and Nose K. 1997.** Decrease in the expression of a novel TGF beta1-inducible and ras-recision gene, TSC-36, in human cancer cells. *Cancer Lett* **113**: 213-9.
- Maurer P, Hohenadl C, Hohenester E, Gohring 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**: 347-57.
- Maurer P. 2002.** SPARC. Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine: 2961-2965.
- Mayer U, Saher G, Fassler R, Bornemann A, Echtermeyer F, von der Mark H, Miosge N, Poschl E, and von der Mark K. 1997.** Absence of integrin alpha 7 causes a novel form of muscular dystrophy. *Nat Genet* **17**: 318-23.
- McKinnon PJ, McLaughlin SK, Kapsetaki M, and Margolskee RF. 2000.** Extracellular matrix-associated protein Sc1 is not essential for mouse development. *Mol Cell Biol* **20**: 656-60.
- Melo F, Carey DJ, and Brandan E. 1996.** Extracellular matrix is required for skeletal muscle differentiation but not myogenin expression. *J Cell Biochem* **62**: 227-39.
- Mendis DB, Shahin S, Gurd JW, and Brown IR. 1996.** SC1, a SPARC-related glycoprotein, exhibits features of an ECM component in the developing and adult brain. *Brain Res* **713**: 53-63.
- Merry CL, Bullock SL, Swan DC, Backen AC, Lyon M, Beddington RS, Wilson VA, and Gallagher JT. 2001.** The molecular phenotype of heparan sulfate in the Hs2st^{-/-} mutant mouse. *J Biol Chem* **276**: 35429-34.
- Michel U, Farnworth P, and Findlay JK. 1993.** Follistatins: more than follicle-stimulating hormone suppressing proteins. *Mol Cell Endocrinol* **91**: 1-11.
- Muller D, Djebbara-Hannas Z, Jourdain P, Vutskits L, Durbec P, Rougon G, and Kiss JZ. 2000.** Brain-derived neurotrophic factor restores long-term potentiation in polysialic acid-neural cell adhesion molecule-deficient hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4315-20.

- Nakanishi S, Inoue A, Kita T, Nakamura M, Chang AC, Cohen SN, and Numa S. 1979.** Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature* **278**: 423-7.
- Nakada M, Miyamori H, Yamashita J, and Sato H. 2003.** Testican 2 abrogates inhibition of membrane-type matrix metalloproteinases by other testican family proteins. *Cancer Res* **63**: 3364-9.
- Nakada M, Yamada A, Takino T, Miyamori H, Takahashi T, Yamashita J, and Sato H. 2001.** Suppression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MMP)-mediated MMP-2 activation and tumor invasion by testican 3 and its splicing variant gene product, N-Tes. *Cancer Res* **61**: 8896-902.
- Nakato H, and Kimata K. 2002.** Heparan sulfate fine structure and specificity of proteoglycan functions. *Biochim Biophys Acta* **1573**: 312-8.
- Nelson PS, Plymate SR, Wang K, True LD, Ware JL, Gan L, Liu AY, and Hood L. 1998.** Hevin, an antiadhesive extracellular matrix protein, is down-regulated in metastatic prostate adenocarcinoma. *Cancer Res* **58**: 232-6.
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, and von Heijne G. 1997.** Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* **10**: 1-6.
- Norose K, Clark JI, Syed NA, Basu A, Heber-Katz E, Sage EH, and Howe CC. 1998.** SPARC deficiency leads to early-onset cataractogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**: 2674-80.
- 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**: 400-3.
- 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**: 42-8.
- Olwin BB, and Rapraeger A. 1992.** Repression of myogenic differentiation by aFGF, bFGF, and K-FGF is dependent on cellular heparan sulfate. *J Cell Biol* **118**: 631-9.
- Osses N, and Brandan E. 2002.** ECM is required for skeletal muscle differentiation independently of muscle regulatory factor expression. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**: C383-394.
- Patel K, Connolly DJ, 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**: 327-42.
- Paulsson M. 1992.** Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **27**: 93-127.
- Perret S, Eble JA, Siljander PR, Merle C, Farndale RW, Theisen M, and Ruggiero F. 2003.** Prolyl hydroxylation of collagen type I is required for efficient binding to integrin alpha 1 beta 1 and platelet glycoprotein VI but not to alpha 2 beta 1. *J Biol Chem* **278**: 29873-9.
- Perrimon N, and Bernfield M. 2000.** Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes. *Nature* **404**: 725-8.
- Pilcher BK, Dumin JA, Sudbeck BD, Krane SM, Welgus HG, and Parks WC. 1997.** The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J Cell Biol* **137**: 1445-57.
- Poole AR. 1986.** Proteoglycans in health and disease: structures and functions. *Biochem J* **236**: 1-14.

- Prydz K, and Dalen KT. 2000.** Synthesis and sorting of proteoglycans. *J Cell Sci* **113 Pt 2:** 193-205.
- Rankin T, and Dean J. 2000.** The zona pellucida: using molecular genetics to study the mammalian egg coat. *Rev Reprod* **5:** 114-21.
- Rankin TL, O'Brien M, Lee E, Wigglesworth K, Eppig J, and Dean J. 2001.** Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. *Development* **128:** 1119-26.
- Rapraeger A, Jalkanen M, Endo E, Koda J, and Bernfield M. 1985.** The cell surface proteoglycan from mouse mammary epithelial cells bears chondroitin sulfate and heparan sulfate glycosaminoglycans. *J Biol Chem* **260:** 11046-52.
- Rehm H. 1997.** Der Experimentator: Proteinchemie. *Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.*
- Rich RL, Deivanayagam CC, Owens RT, Carson M, Hook A, Moore D, Symersky J, Yang VW, Narayana SV, and Hook M. 1999.** Trench-shaped binding sites promote multiple classes of interactions between collagen and the adherence receptors, alpha(1)beta(1) integrin and Staphylococcus aureus cna MSCRAMM. *J Biol Chem* **274:** 24906-13.
- Ringuette M, Rogers I, Varmuza S, Rush S, and Brown IR. 1998.** Expression of SC1 is associated with the migration of myotomes along the dermomyotome during somitogenesis in early mouse embryos. *Dev Genes Evol* **208:** 403-6.
- Ross RS, and Borg TK. 2001.** Integrins and the myocardium. *Circ Res* **88:** 1112-9.
- Rougon G, Deagostini-Bazin H, Hirn M, and Goridis C. 1982.** Tissue- and developmental stage-specific forms of a neural cell surface antigen linked to differences in glycosylation of a common polypeptide. *Embo J* **1:** 1239-44.
- Rugh R. 1990.** The Mouse – Its Reproduction and Development. *Oxford University Press, Oxford, Grossbritannien.*
- Ruuslahti E. 1988.** Structure and biology of proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol* **4:** 229-55.
- Sadoul R, Hirn M, Deagostini-Bazin H, Rougon G, and Goridis C. 1983.** Adult and embryonic mouse neural cell adhesion molecules have different binding properties. *Nature* **304:** 347-9.
- Sage 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.
- Salmivirta M, Lidholt K, and Lindahl U. 1996.** Heparan sulfate: a piece of information. *Faseb J* **10:** 1270-9.
- Sambrook J, Fritsch EF und Maniatis T. 1989.** Molecular Cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.*
- Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, and Seiki M. 1994.** A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* **370:** 61-65.
- Scharffetter-Kochanek K, Klein CE, Heinen G, Mauch C, Schaefer T, Adelman-Grill BC, Goerz G, Fusenig NE, Krieg TM, and Plewig G. 1992.** Migration of a human keratinocyte cell line (HACAT) to interstitial collagen type I is mediated by the alpha 2 beta 1-integrin receptor. *J Invest Dermatol* **98:** 3-11.
- Schwartz TW. 1986.** The processing of peptide precursors. 'Proline-directed arginyl cleavage' and other monobasic processing mechanisms. *FEBS Lett* **200:** 1-10.

- 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-beta 1-regulated genes, one of which seems to encode a follistatin-related polypeptide. *Eur J Biochem* **217**: 13-9.
- Silbert JE, and Sugumaran G. 1995.** Intracellular membranes in the synthesis, transport, and metabolism of proteoglycans. *Biochim Biophys Acta* **1241**: 371-84.
- Skinner MK, Tung PS, and Fritz IB. 1985.** Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. *J Cell Biol* **100**: 1941-7.
- Smith JL, and Schoenwolf GC. 1997.** Neurulation: coming to closure. *Trends Neurosci* **20**: 510-7.
- Smyth N, Vatansever HS, 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**: 151-60.
- Soderling JA, Reed MJ, Corsa A, and Sage EH. 1997.** Cloning and expression of murine SC1, a gene product homologous to SPARC. *J Histochem Cytochem* **45**: 823-35.
- Sonnenberg A, Modderman PW, and Hogervorst F. 1988.** Laminin receptor on platelets is the integrin VLA-6. *Nature* **336**: 487-9.
- Stark M, Danielsson O, Griffiths WJ, Jornvall H, and Johansson J. 2001.** Peptide repertoire of human cerebrospinal fluid: novel proteolytic fragments of neuroendocrine proteins. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **754**: 357-67.
- Stenvers KL, Tursky ML, Harder KW, Kountouri N, Amatayakul-Chantler S, Grail D, Small C, Weinberg RA, Sizeland AM, and Zhu HJ. 2003.** Heart and liver defects and reduced transforming growth factor beta2 sensitivity in transforming growth factor beta type III receptor-deficient embryos. *Mol Cell Biol* **23**: 4371-85.
- Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, and Liotta LA. 1993.** Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* **9**: 541-73.
- Streuli C. 1999.** Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 634-40.
- Sumitomo K, Kurisaki A, Yamakawa N, Tsuchida K, Shimizu E, Sone S, and Sugino H. 2000.** Expression of a TGF-beta1 inducible gene, TSC-36, causes growth inhibition in human lung cancer cell lines. *Cancer Lett* **155**: 37-46.
- Theiler K. 1972.** The House Mouse - Development and Normal Stages from Fertilization to 4 Weeks of Age. *Springer-Verlag, Berlin*.
- Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, and Martin GR. 1981.** Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* **26**: 99-105.
- Thamilselvan V, Fomby M, Walsh M, and Basson MD. 2003.** Divalent cations modulate human colon cancer cell adhesion. *J Surg Res* **110**: 255-65.
- Theodosis DT, Rougon G, and Poulain DA. 1991.** Retention of embryonic features by an adult neuronal system capable of plasticity: polysialylated neural cell adhesion molecule in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 5494-8.
- Timpl R, and Brown JC. 1996.** Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays* **18**: 123-32.
- Tochitani S, Liang F, Watakabe A, Hashikawa T, and Yamamori T. 2001.** The *occl* gene is preferentially expressed in the primary visual cortex in an activity-dependent manner: a pattern of gene expression related to the cytoarchitectonic area in adult macaque neocortex. *Eur J Neurosci* **13**: 297-307.

- Toma L, Berninsone P, and Hirschberg CB. 1998.** The putative heparin-specific N-acetylglucosaminyl N-Deacetylase/N-sulfotransferase also occurs in non-heparin-producing cells. *J Biol Chem* **273**: 22458-65.
- 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.
- Vandenberg P, Kern A, Ries A, Luckenbill-Edds L, Mann K, and Kuhn K. 1991.** Characterization of a type IV collagen major cell binding site with affinity to the alpha 1 beta 1 and the alpha 2 beta 1 integrins. *J Cell Biol* **113**: 1475-83.
- Vannahme C, Gosling S, Paulsson M, Maurer P, and Hartmann U. 2003.** Characterization of SMOC-2, a modular extracellular calcium-binding protein. *Biochem J* **373**: 805-14.
- Vannahme C, Schubel S, Herud M, Gosling S, Hulsmann 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.
- Vannahme C. 2000.** Isolierung und Charakterisierung neuer extrazellulärer Calcium-bindender Proteine der BM-40-Familie. *Dissertation, Universität zu Köln.*
- Vannahme C, Smyth N, Miosge N, Gosling S, Frie C, Paulsson M, Maurer P, and Hartmann U. 2002.** Characterization of SMOC-1, a novel modular calcium-binding protein in basement membranes. *J Biol Chem* **277**: 37977-86.
- Vignola AM, Bonsignore G, Siena L, Melis M, Chiappara G, Gagliardo R, Bousquet J, and Merendino AM. 2000.** ICAM-1 and alpha3beta1 expression by bronchial epithelial cells and their *in vitro* modulation by inflammatory and anti-inflammatory mediators. *Allergy* **55**: 931-9.
- Wayner EA, and Carter WG. 1987.** Identification of multiple cell adhesion receptors for collagen and fibronectin in human fibrosarcoma cells possessing unique alpha and common beta subunits. *J Cell Biol* **105**: 1873-84.
- Wehrle-Haller B, and Imhof B. 2002.** The inner lives of focal adhesions. *Trends Cell Biol* **12**: 382-9.
- Williamson RA, Henry MD, Daniels KJ, Hrstka RF, Lee JC, Sunada Y, Ibraghimov-Beskrovnaya O, and Campbell KP. 1997.** Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in Dag1-null mice. *Hum Mol Genet* **6**: 831-41.
- Zamir E, and Geiger B. 2001.** Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* **114**: 3583-90.
- Zhang L, and Esko JD. 1994.** Amino acid determinants that drive heparan sulfate assembly in a proteoglycan. *J Biol Chem* **269**: 19295-9.
- Zhou XH, Brakebusch C, Matthies H, Oohashi T, Hirsch E, Moser M, Krug M, Seidenbecher CI, Boeckers TM, Rauch U, Buettner R, Gundelfinger ED, and Fassler R. 2001.** Neurocan is dispensable for brain development. *Mol Cell Biol* **21**: 5970-8.
- Zilles K und Rehkämper G. 1998.** Funktionelle Neuroanatomie. *Springer-Verlag, Berlin.*
- Zwijssen A, Blockx H, Van Arnhem W, Willems J, Franssen 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**: 937-46.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BM-40	Basalmembranprotein (Molekulargewicht 40 kDa)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
DDT	Dithiotreitol
DEAE	Diethylaminoethyl
E	Embryonaltag
EBNA	Epstein-Barr Nuclear Antigen
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHS-(Tumor)	Engelbreth-Holm-Swarm-(Tumor)
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
fl	Volllänge (<i>full length</i>)
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GAG	Glykosaminoglykan
Gal	Galactose
GalNac	N-Acetylgalactosamin
GlcA	Glucuronsäure
GlcNac	N-Acetylglucosamin
GuHCl	Guanidin-Hydrochlorid
h	Stunde
HMW	Proteinmarker im Bereich hoher Molekulargewichte (<i>High molecular weight</i>)
IAA	Iodazidamin
IdoA	Iduronsäure
Immun.-tag	Immunisierungstag
k.o.	Nullmutante (<i>knock out</i>)
kDa	Kilodalton
l	Liter

M	Molar
MALDI	<i>Matrix-assisted laser-desorption ionization</i>
min	Minute
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
MT-MMP	Membran-type Matrix-Metallo-Proteinase
OD	Optische Dichte
P	Postnataltag / Tag nach der Geburt
p.c.	nach der Befruchtung (<i>post coitum</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Physiologisch isotoner Puffer (<i>Phosphat buffered saline</i>)
PNS	peripheres Nervensystem
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
rb	Kaninchen (<i>rabbit</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
SV	Säulenvolumen
TBS	Tris-Kochsalz-Puffer (<i>Tris buffered saline</i>)
TCAN	Testican
TGF	Wachstumsfaktor (<i>Transforming growth factor</i>)
TOF	<i>Time of flight</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TY	Thyroglobulin
IU	Internationale Units
Xyl	Xylose
ZMMK	Zentrum für molekulare Medizin Köln
ZNS	zentrales Nervensystem

EC Domäne

t can2_human
t can2_mouse

1

EF-hand 1 EF-hand 2

2 3 4 5 6

TCTGQDLADLIGDRLRDWFQLLHNSKQNGSASSVAGPAG.LLDKSLGASCKDSIGWFMFKLPTSA DLFLDQT ELAAINLDKYEVCIRPFFNSCDTYKDGRVSTAEWCFCFWREK
TCTGQDLADLIGDRLRDWFQLLHNSKQNGSANSATNPA.G.LLDKSLGASCKDSIGWFMFKLPTSGDLFLDQT ELAAINLDKYEVCIRPFFNSCDTYKDGRVSTAEWCFCFWREK

t can1_human
t can1_mouse

CTDKELRNLASRLKDWFGALHEDANRVIK.PTSSNTAQGRFDTSLILPICKDLSLWMMFNKLFMNYDLLLDPSSINAIYLDKYEPCIKPLFNSCDSEFKDGLSNNEWCYCFOKPGG
CTDKELRNLASRLKDWFGALHEDANRVIK.PTSSDGAQGRFDTSLILPICKDLSLWMMFNKLFMNYDLLLDPSSINAIYLDKYEPCIKPLFNSCDSEFKDGLSNNEWCYCFOKPAG

TY-Domäne

t can2_human
t can2_mouse

1

2 3 4 5 6

PPCLAELERIQIEAAKKKPGIFIPSCDEEDGYRKMQCDQSSGDWCVDQLGLELITGTRTHGSPDGD
PPCLAELERTQIEAAKKKPGVIFIPSCDEEDGYRKMQCDQSRGDWCVDQLGLELITGTRMHGTPDGD

t can1_human
t can1_mouse

LPCQEMNRIQKLSKGSLLGAFIPRCNEEGYKATQCHGSTGCWCVDKYGNELAGSRKQGVSC
LPCQEMNRIQKLSKGSLLGAFIPRCNEEGYKATQCHGSTGCWCVDKYGNELAGSRKQGTVSC

C-terminale Domäne mit potentiellen GAG-Bindungsstellen (v)

t can2_human
t can2_mouse

v v

DIVGFSGDFGSGVGVW.....EDEEKETEEAGEEAEEEGEAGEADDDGGYIW*
DIVGFSGDFGSGVGVW.....EDEEKETEEAGEEAEEEGEAGEADDDGGYIW*

t can1_human
t can1_mouse

EEQETS GDFGSGSVVLLDDLEYERELGPKDKEGKLRVHTRAVTEDEDEDDEDDKEDVGYIW*
EEQETS GDFGSGSVVLLDDLEDERDVGPKDKEGKLRVTRAVREDEDEDDDDKEDVGYIW*

Abstract

In this thesis, the distribution and structure of testican-2 protein with focus on localisation during embryonic development of the mouse have been studied. In addition the properties of testican-2 in cell adhesion assays were analysed and potential binding partners were identified.

A polyclonal antibody was raised in rabbit, purified and successfully relieved of a cross reactivity against an unknown intracellular protein.

In embryonic development testican-2 was first recognized at embryonic day (E) 6.5, where it was associated with the basement membrane between the germ layers (E 6.5-9.5). Later in the development a more cell-associated staining was seen in heart myocardium (from E 9.5), nervous system including the developing blood vessels (from E 10.5), skeletal muscle (from E 14.5), endocrinal glands (from E 16.5) and lung (from postnatal day 1.5). In adult mouse, testican-2 was expressed in the nervous system including blood vessels, in defined structures of endocrinal glands and in lung, but not in heart and muscle. Except for endothelia cells of blood vessels only neurons were stained in the nervous system.

Analysis of the glycostructure revealed that native testican-2 is a heparan sulfate proteoglycan, whereas recombinant testican-2 bears chondroitin and heparan sulfate chains. The attachment of N-glycans to both testican-2 forms could also be proven.

In cell binding studies cation-dependent adhesion and spreading of fibroblasts and keratinocytes on testican-2 could be shown. By inhibition of the cell adhesion with an anti- β 1-integrin-antibody in combination with protein-protein interaction studies, α 1 β 1 could be identified as a binding partner of testican-2. Binding of the α 1 β 1-integrin was conformation-dependent and could be significantly inhibited by incubation with antibodies against α 1- and β 1-integrin. Attachment of RuGli-glioma cells to testican-2 revealed the physiological relevance of the interaction between testican-2 and α 1 β 1-integrin. Thereby cell spreading and concentration of α 1 β 1-Integrin in focal contacts could be observed.

Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass die Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität vorgelegt 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 Herrn Prof. Dr. Mats Paulsson betreut worden.

Keine Teilpublikationen.

Köln, im März 2004

Anke Schnepf

Danksagung

Am Ende dieser Arbeit möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen:

Frau Dr. Ursula Hartmann für die interessante Themenstellung, fachliche Betreuung und freundschaftliche und engagierte Unterstützung sowie Korrekturlesen dieser Arbeit;

Herrn Prof. Dr. Mats Paulsson für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Doktorarbeit in seinem Institut und engagierte Unterstützung und Förderung;

Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer und Frau Prof. Dr. Sabine Waffenschmidt für die kurzfristige Übernahme des Zweitgutachtens und Herrn Prof. Hans-Günther Schmalz für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes;

Herrn Prof. Dr. Wolfram Neiss für Beratung bei der histologischen Zuordnung der Expression von Testican-2 während der embryonalen Mausentwicklung;

Frau Dr. Brigitte Witter für die Anfertigung der Färbung primärer Hippocampuszellen;

Herrn Dr. Johannes Eble für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit bei Analyse der Bindungspartner von Testican-2;

Herrn Dr. Rupert Timpl, Herrn Dr. Neil Smith und Herrn Prof. Dr. Mats Paulsson für die Bereitstellung von rekombinantem EHS-Laminin sowie von Antikörpern gegen Nidogen-1 und EHS-Laminin;

Den Ehemaligen, namentlich Anja Geiger, Brigitte Kaufmann und Harald Hambrock für die immer vorhandene Bereitschaft zur Unterstützung und die zahlreichen guten Ratschläge zu Beginn meiner Arbeit;

Den Technischen Assistenten für Rat und Tat: Christian Frie, Monika Pesch, Wieslaw Krzyzak, Sani Dahmen, und vor allem Hanni Hülsmann für die stete „Versorgung“ mit rekombinanten Proteinen;

Mark Milbrandt für freundliche und stete Hilfe bei Computer-technischen und Herrn Dr. Frank Zaucke bei Sigma-Plot-technischen Fragen und Problemen.

Weiterhin bedanke ich mich bei meiner Arbeitsgruppe und allen Mitarbeitern des Institutes für Biochemie II der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln für die gute Zusammenarbeit und freundschaftliche Atmosphäre;

Meiner Familie, im besonderen meiner Schwester Klaudia und meinen Eltern, die immer für mich da waren und mich unterstützt haben;

Meinem Freund Toni Cuddemi für die liebevolle Unterstützung und Geduld.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Anke Schnepf
Anschrift Petersbergstraße 2
53604 Bad Honnef
Geburtsdatum/-ort 4. Oktober 1972 in Wuppertal
Familienstand ledig
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung

1979-1983 Grundschule Geranienstrasse in Wuppertal
1983-1992 Gymnasiums St. Anna in Wuppertal
Juni 1992 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung

1992-1994 Berufsbildende Schule 16 der Stadt Köln,
Höhere Berufsfachschule für technische Assistenten, Fachrichtung
Chemie
Juni 1994 Abschluss als staatlich geprüfte Chemisch-technische Assistentin

Studium

1994-1999 Studium der Chemie an der Universität zu Köln
Januar/Februar 1999 Theoretische Diplomprüfung
März 1999 bis Dezember 1999 Diplomarbeit am Institut für physiologische Chemie der Universität zu Köln unter der Leitung von Herrn Prof. Paulsson und der Betreuung von Frau Dr. Ursula Hartmann im Bereich Biochemie mit dem Thema „Untersuchungen zur Expression des Proteoglykans Testican-2 in Maus-Gewebe“
seit April 2000 Doktorarbeit am Institut für physiologische Chemie der Universität zu Köln unter der Leitung von Herrn Prof. Paulsson und der Betreuung von Frau Dr. Ursula Hartmann im Bereich Biochemie mit dem Thema „Testican-2 - Studien zu Expression und Funktion eines neuen Proteoglykans“

Köln, im März 2004