In vitro und *in vivo* Studien zur Charakterisierung von Testican-2 und SMOC-1, zweier neuer Mitglieder der BM-40 Familie

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

vorgelegt von

Detlef Heep

aus Olpe

im Dezember 2005

Die vorliegende Arbeit wurde an der medizinischen Fakultät der Universität zu Köln im Institut für Biochemie II (Direktor: Prof. Dr. Mats Paulsson), unter Betreung von Prof. Dr. Mats Paulsson, angefertigt.

Berichterstatter:	**Prof. Dr. Mats Paulsson**
	Prof. Dr. Siegfried Roth
Prüfungsvorsitzender:	**Prof. Dr. H. W. Klein**

Tag der mündlichen Prüfung: **13.02.2006**

meinen Eltern
(und Dermot Trellis)

Abstract

Testicans (testican-1, -2 and –3) are proteoclycans which, by structure, are assigned to the BM-40 family of secreted, calcium binding proteins.

Here, mice were generated, in which the gene for testican-2 was inactivated by homologous recombination. Animals are viable and do not differ from their wildtype littermates with regard to body weight and -shape or morphology of the inner organs. However, their fertility appears reduced, as mating of two testican-2 deficient mice lead to significantly decreased litter sizes compared to matings of mice, where only one animal is homozygous for the testican-2 mutant allele, or matings of heterozygous mice. Histological comparison did not show any obvious differences for brain, testis and endocrinal glands like adrenal gland or pancreas between knock-out and wildtype mice. However, the hearts of testican-2 deficient mice show dilated ventricles and a reduced diameter of the myocard. This phenotype corresponds to a pathophysiological condition dilated cardiomyopathy. The lungs of animals with mutated testican-2 appear to have somewhat enlarged alveoli.

In addition, the expression and possible functions of a micro exon was analysed, which in all testicans codes for the amino acids EVE in the testican-specific first domain. In contrast to testican-1 and –3, in case of testican-2 the isoform containing this exon was almost exclusively detected both in mouse and man. Recombinant expression of both isoforms in eucaryotic cells and subsequent biochemical analysis revealed that the sequence functions as proteolytic cleavage site. So far the nature of the cleaving protease is not known.

Furthermore, SMOC-1, another member of the BM-40 family, was investigated. SMOC-1 is a glycoprotein and was shown to be an integral component of most basement membranes. Binding of recombinant SMOC-1 to other components of basement membranes was specifically analysed. Using the Luminex system laminin-1 as well as the perlecan fragment PIV-1 could be identified as binding partners. The results could be verified by surface plasmon resonance measurements.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis 1

1. Einleitung 4

1.1 BM-40/SPARC/Osteonectin 4

1.2 Die BM-40 Familie 9

1.3 Testican-1, -2 und -3 12

1.4 SMOC-1 und -2 15

1.5 Ziele der Arbeit 18

2. Ergebnisse 19

2.1 Untersuchungen zur Funktion des Exon 2 im Testican-2 Gen 19

2.1.1 Die genomische Organisation des Testican-2 19

2.1.2 Klonierung und anschließende Expression der verschiedenen Testican-2 Isoformen in eukaryontischen Zellen 20

2.1.3 Alternatives Spleissen des Exon 2 im Testican-2 Gen 23

2.2 Inaktivierung des Testican-2 Gens in der Maus 26

2.2.1 Allgemeine Strategie 26

2.2.2 Das *Targeting*-Konstrukt 28

2.2.3 Herstellung und Genotypisierung rekombinanter ES-Zell-Klone 29

2.2.4 Etablierung Testican-2 defizienter Mäuse 31

2.2.5 Genotypisierung von Mausschwanz DNA 32

2.2.6 Nachweis der Testican-2 Defizienz auf RNA und Protein Ebene 33

2.2.7 Makroskopische Analyse Testican-2 defizienter Mäuse 34

2.2.8 Morphologische und histologische Untersuchungen Testian-2 defizienter Mäuse 36

2.3 SMOC-1 Interaktionsstudien 45

2.3.1 Rekombinante Expression von SMOC-1 45

2.3.2 Potentielle Interaktionspartner für SMOC-1 46

2.3.3 Interaktionsstudien mit dem Luminex System 46

2.3.4 Interaktionsstudien mittels Oberflächen Plasmon Resonanz im BIACORE System 50

3. Diskussion 52

3.1 Inaktivierung des Testican-2 Gens in der Maus 52

3.1.1 Makroskopische Analyse Testican-2 defizienter Mäuse 52

3.1.2 Morphologische und histologische Analyse Testican-2 defizienter Mäuse 54

3.2 Mögliche Bedeutung des Exons 2 im Testican-2 Gen 59
3.3 Interaktionen von SMOC-1 mit Basalmembranproteinen 62
3.4 Ausblick 64
4. Material und Methoden 66
4.1 Material 66
4.1.1 Puffer 66
4.1.2 Kulturmedien und Zellen 68
4.1.3 Weitere Verbrauchsmaterialien 69
4.2 Molekularbiologische Methoden 71
4.2.1 Isolierung genomischer DNA aus ES Zellen und Mausschwanzbiopsien 71
4.2.2 Native Gelelektrophorese 72
4.2.3 Southern Blot Analyse 72
4.2.4 Radioaktive Markierung von DNA 73
4.2.5 Hybridisierung membrangebundener DNA oder RNA mit radioaktiv markierten Sonden 73
4.2.6 Isolierung von Gesamt RNA aus Geweben 74
4.2.7 Isolierung von mRNA aus Gesamt RNA 74
4.2.8 Denaturierende Gelelektrophorese 74
4.2.9 Northern Blot Analyse 75
4.2.10 Reverse Transkription 75
4.2.11 Polymerase Kettenreaktion (PCR) 75
4.2.12 *In vitro* Mutagenese 78
4.2.13 Isolierung von DNA 80
4.2.14 DNA Sequenzierung 80
4.3 Proteinchemische Methoden 81
4.3.1 Proteinaufreinigung aus Zellkulturüberständen 81
4.3.2 Proteinaufreinigung aus Matrixfraktionen von Zellen 81
4.3.3 Proteinextraktion aus Gehirnen 81
4.3.4 Immunpräzipitation 82
4.3.5 Proteinfällung 82
4.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 82
4.3.7 Western Blot Analyse 83
4.3.8 Coomassie Färbung 83
4.3.9 Konzentrationsbestimmungen von Proteinen 83
4.4 Zellkulturarbeiten 84
4.4.1 Transfektion und Kultur von Zellen 84
4.4.2 Transfektion und Kultur von ES Zellen 84

4.4.3 Präparation von embryonalen Fibroblasten 84
4.5 Histologische Methoden 86
4.5.1 Herstellung von Gefrierschnitten 86
4.5.2 Herstellung von Paraffinschnitten 86
4.5.3 Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE Färbung) 87
4.5.4 Kresylechtviolett Färbungen 87
4.5.5 *Fast Green*/ *Sirius Red* Färbung 87
4.6 Bindungsstudien 88
4.6.1 Das Luminex System 88
4.6.2 Oberflächen Plasmon Resonanz im BIACORE System 89
5. Zusammenfassung 91
Literaturverzeichnis 92
Abkürzungen 99
Anhang
Erklärung
Danksagung
Lebenslauf

1. Einleitung

1.1 BM-40/SPARC/Osteonectin

SMOC-1 und Testican-2 sind zwei neue Mitglieder der BM-40 Proteinfamilie. Diese Familie umfasst homologe Proteine mit einem ähnlichen Domänenaufbau. Im folgendem sollen zunächst die strukturellen Besonderheiten und einige Funktionen dieser Proteine am Beispiel des Prototyps dieser Familie, BM-40 vorgestellt werden.

BM-40 ist ein extrazelluläres Calcium-bindendes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 40 kDa, welches ursprünglich aus der Basalmembran-ähnlichen Matrix des Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Tumors isoliert wurde (Dziadek et al., 1986). Spätere Sequenzbestimmungen zeigten, dass BM-40 mit dem aus der Knochenmatrix isolierten Osteonectin (Termine et al., 1981) und dem von embryonalen Fibroblasten und Endothelzellen sekretierten SPARC (*secreted protein acidic* and *rich* in *cysteine*) identisch ist (Mason et al., 1986). Der moduläre Aufbau seiner Aminosäuresequenz wurde als Multidomänen Struktur interpretiert. BM-40 setzt sich aus insgesamt drei Domänen zusammen. Einer für dieses Protein uniken und negativ geladenen aminoterminalen Domäne schließt sich eine Domäne mit Homologie zum Activin Inhibitor Follistatin (FS) an. Die carboxyterminale Domäne wird aufgrund ihrer Calcium-bindenden Eigenschaften als extrazelluläre Calcium-bindende Domäne (EC) bezeichnet. Die einzelnen Domänen ließen sich rekombinant exprimieren und wiesen voneinander unabhängige Bindungseigenschaften auf. Den endgültigen Beweis für die Domänenstruktur lieferte die Auflösung der Röntgenstruktur des FS-EC Domänenpaares im BM-40 (siehe *Abb. 1.1.1*).

Die Analyse offenbart für die FS Domäne eine lang gestreckte und über Disulfidbrücken stabilisierte Struktur. Einem aminoterminal gelegenen β-Haarnadel Motiv mit Homologie zu epidermalen Wachstumsfaktoren (EGF) schließt sich ein über Schleifen verbundener Bereich aus α- und β-Sekundärstrukturelementen an, der Homologie zu Serin Protease Inhibitoren der Kazal Familie aufweist. Allerdings findet sich beim BM-40 in der für die Inhibition notwendigen Schleife eine Insertion, die eine inhibitorische Funktion unwahrscheinlich macht. Die Analyse der EC Domäne ergab eine kompakte und über zwei Disulfidbrücken stabilisierte Struktur mit hohem α-helikalen Anteil. Zudem sind zwei über ein EF-Hand Paar gebundenen Ca^{2+}-Ionen zu sehen (Hohenester et al., 1997; Maurer, 2002).

Eine EF-Hand bindet Calcium über ein Helix-Schleife-Helix Motiv und erinnert an eine greifende Hand mit ausgestrecktem Daumen und Zeigefinger (die Bindungsstelle flankierenden Helices). Es wurde zuerst im Parvalbumin entdeckt, dass insgesamt zwei solcher Motive aufweist. Eines dieser Motive wird durch die Helices αE, αF und der dazwischen liegenden Schleife gebildet und wurde deshalb als EF-Hand bezeichnet (Kretsinger und Nockolds, 1973). EF-Hand Motive finden sich in Pro- und Eukaryonten gleichermaßen. Bekanntester Vertreter ist das Calmodulin, das insgesamt vier solcher Motive besitzt. Calmodulin wird ab einer cytosolische Calciumkonzentration von 500 nM aktiviert. In dieser Form aktiviert es z.B. die Calmodulin -abhängigen Proteinkinasen (CaM-Kinasen). Das aktive Protein stimuliert zudem die Ca^{2+}-ATPase-Pumpe in der Plasmamembran, was zu einer Senkung des Calciumspiegels und einer Inaktivierung des Calmodulin führt. Dieses intrazellular weit verbreitete Motiv konnte im BM-40 zum ersten Mal für ein extrazelluläres Protein nachgewiesen werden.

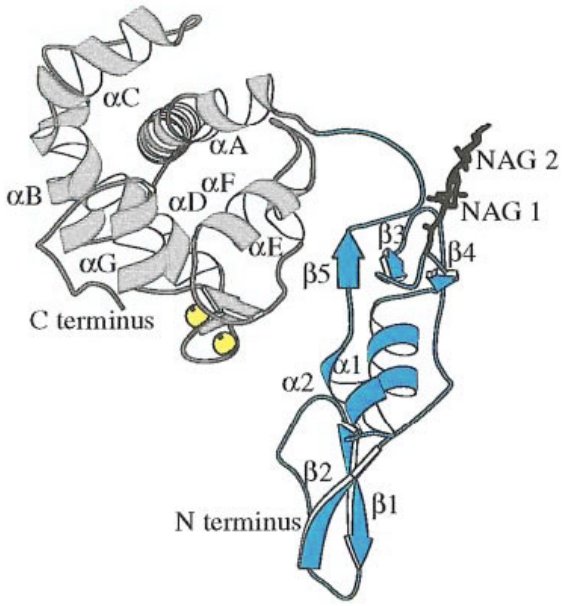


Abb.1.1.1: **Auf der Röntgenstrukturanalyse basierende schematische Darstellung des FS-EC Domänenpaares von BM-40.** Die FS Domäne ist blau, die EC Domäne grau hinterlegt. Die gebundenen Calciumionen sind als gelbe Sphären dargestellt. NAG1/NAG2 = die ersten beiden an Asparagin 99 gekoppelten N-Acetylglucosamin Einheiten (nach Hohenester et al., 1997).

Die extrazelluläre Konzentration an freiem Calcium liegt bei etwa 1 mM. Das Vorhandensein eines Calcium-bindenden Motivs, welches in intrazellulären Proteinen die Aktivität dieser Proteine reguliert, warf die Frage auf, ob eine solche Calcium Bindung im BM-40 ebenfalls von regulatorischer oder eher von struktureller Bedeutung ist. Die für BM-40 ermittelten Dissoziationskonstanten von 490 nM für die Bindung des

ersten Ca^{2+}-Ions und 57 nM für die Bindung des zweiten Ca^{2+}-Ions belegen neben einer Kooperativität der Bindungsstellen (Busch et al., 2000) auch, dass eine Calcium bedingte Regulation in einer Umgebung mit Calciumkonzentrationen im minimolaren Bereich ausgeschlossen werden kann. Es ist jedoch bekannt, dass es lokal und in speziellen physiologischen oder pathologischen (Hypocalcämie) Situationen zu Verringerungen in der extrazellulären Calciumkonzentration kommen kann. Ein Calcium Gradient findet sich beispielsweise in der Haut, wo er vermutlich Einfluss auf die Migration von Keratinocyten nimmt (Hennings et al., 1980). In solchen Umgebungen kann eine regulatorische Bedeutung der Calcium Bindung im BM-40 nicht ganz ausgeschlossen werden. Untersuchungen mittels circularer Dichroismus Spektroskopie zeigen für BM-40 in Anwesenheit von Calcium einen erhöhten α-helikalen Anteil und belegen damit einen Struktur stabilisierenden Einfluss der Calcium Bindung (Maurer, 2002).

Die EC Domäne des BM-40 enthält Bindungsstellen für die fibrillären Kollagene I, II, III und V sowie für das Basalmembran Kollagen IV. Die Helix αC (siehe *Abb. 1.1.1*) des BM-40 kann durch verschiedene Matrixmetalloproteinasen (MMPs) gespalten werden, wodurch die Zugänglichkeit zur Helix αA und dadurch wiederum die Affinität für die Kollagene I, IV und V erhöht wird (Sasaki et al., 1997). Mutationsuntersuchungen unterstützen diese Erkenntnis und zeigen, dass die Helix αA sowie die beiden EF-Hand Motive verbindende Schleife für die Kollagenbindung entscheidend sind (Sasaki et al., 1998). Die Bedeutung der Kollagen I Bindung für die Lokalisation von BM-40 in der Matrix wird aus der Analyse Kollagen I defizienter Fibroblasten erkennbar. Solche Zellen produzieren BM-40 zwar in gleichen Mengen wie Fibroblasten aus Wildtyp Zellen, es findet jedoch kein Einbau in die Matrix mehr statt (Iruela-Arispe et al., 1996). Zudem sind Interaktionen von BM-40 mit den Wachstumsfaktoren PDGF (*platelet derived growth factor*) (Göhring et al., 1998) und VEGF (*vascular endothelial frowth factor*) (Kupprion et al., 1998) dokumentiert.

Aufschluss über die Funktion von BM-40 *in vivo* gibt die Analyse BM-40 defizienter Mäuse. Während der Embryonalentwicklung und innerhalb der ersten Wochen nach Geburt zeigt sich zwischen BM-40 defizienten Mäusen und Wildtyp Mäusen kein Unterschied. Ab dem zweiten Monat nimmt der Kollagenanteil der Haut ab, womit sich deren Reißfestigkeit verringert. Interessanterweise nimmt der Kollagenanteil mit zunehmendem Alter der Maus aber wieder zu, und ist ab dem siebten Monat auf dem Niveau von Wildtyp Mäusen (Bradshaw et al., 2003). Ab dem sechsten Lebensmonat entwickeln BM-40 defiziente Mäuse Osteopenie, zeigen eine beschleunigte Wundheilung, übermäßige Fettbildung und entwickeln grauen Star (Übersicht in

Bornstein und Sage, 2002). Es gibt aber auch deutlich diffizilere Phänotypen, die erst in speziellen oder induzierten pathologischen Situationen erkennbar werden. So zeigen injizierte Bauchspeicheldrüsen Tumore in BM-40 defizienten Mäusen eine geringere Apoptoserate und wachsen schneller als in Wildtyp Tieren (Puolakkainen et al., 2004). Eine in Lungen durch intratracheale Bleomycin Injektion hervorgerufene Fibrose entwickelt in BM-40 defizienten Mäusen einen schwerwiegender Verlauf als in den Vergleichstieren und es kommt zu einem Leukozytenanstieg in der Lunge (Savani et al., 2000). Embryonale Fibroblasten aus BM-40 defizienten Mäusen zeigen zudem eine reduzierte Expression des IGFI-R (*insulin-like growth factor I receptor*), was in der Folge zu einer geringeren Synthese von Cylin A und p 107 nach Stimulation der Zellen durch Insulin und damit zu einem verzögerten Übergang von der G1- in die S-Phase führt (Basu et al., 1999).

Anhand von *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Effekt von BM-40 auf die Proliferation von Zellen konzentrationsabhängig sein kann. Während geringe Mengen BM-40 auf humane Fibroblasten proliferationsfördernd wirken, führt eine deutlich erhöhte Zugabe zu einem gegenteiligen Effekt. Humane Endothelzellen hingegen, werden in ihrem Wachstum bereits durch solche Mengen an BM-40 gehemmt, die auf Fibroblasten noch stimulierend wirken (Funk und Sage, 1993). BM-40 zeigt zudem einen regulatorischen Einfluss auf die Synthese vieler Matrix Komponenten. So wird z.B. die Produktion verschiedenen Matrix Metalloproteinasen (MMP-1, MMP-2, MMP-3 und MMP-9) in Fibroblasten durch BM-40 induziert, wohingegen die Expression von Fibronectin und Thrombospondin-1 reduziert wird (zur Übersicht siehe Maurer, 2002).

Eine Vielzahl von *in vitro* Experimenten belegt einen Einfluss von BM-40 auf das Verhalten von Zellen in ihrer Umgebung. So konnte gezeigt werden, dass BM-40 an der Umorganisation von Actinfilamenten und fokalen Zellkontakten beteiligt ist. Der Verlust solcher Zellkontakte wirkt sich auf die Morphologie der Zellen aus, eine Beobachtung die für Zellen, welche BM-40 ausgesetzt werden beschrieben ist (siehe *Abb. 1.1.2*). Der Verlust fokaler Zellkontakte führt die Zelle von einem stationären (stark adhesiven, *Abb. 1.1.2*, III) Zustand in einen Zustand über, bei dem die verbliebene Adhesivität im Wesentlichen über Interaktionen zwischen extrazellulären Rezeptoren und Integrinen gewährleistet wird (siehe *Abb. 1.1.2*, II). Ein Übergang von einem adhesiven in einen eher de-adhesiven Zustand ist in biologischen Situationen, in denen Umorganisationen von Geweben stattfinden müssen eine unbedingte Vorraussetzung. Für BM-40 konnte eine Beteiligung an solchen Prozessen, wie z.B. der Wundheilung, der Angiogenese und der Invasion von Tumoren gezeigt werden (zur Übersicht siehe Murphy-Ullrich, 2001; Bornstein und Sage, 2002).

Trotz der Vielfalt an Daten, die eine Funktion von BM-40 auf die Morphologie von Zellen und die Synthese von DNA oder Proteinen belegen, konnte bis heute keine direkte Interaktion mit einem zellulären Rezeptor gezeigt werden. Tumorbiologische Untersuchungen liefern aber Hinweise auf mögliche Interaktionspartner.

Ein erforderlicher Schritt bei der Entwicklung und Metastasierung von Tumoren ist der Übergang von einer radialen in eine vertikale Wachstumsphase. Dieser Übergang korreliert mit der Expression von β_3-Integrinen. Ein Vergleich der Transkriptionsprofile dieser beiden Wachstumsphasen zeigt BM-40 als ein Gen, dessen Expression mit der von β_3-Integrin korreliert (Sturm et al., 2002). Zudem lassen Untersuchungen zur Migration von Prostata- und Brusttumoren in den Knochen eine $\alpha_v\beta_3$-Integrin vermittelte Wanderung dieser Tumorzellen auf BM-40 als Substrat vermuten (De et al., 2003; Sloan und Anderson, 2002; Liapis et al., 1996). Ein weiterer Hinweis ergibt sich aus der Überexpression des *promyelocytic leukemia zinc finger* (PLZF) Proteins in humanen Melanomzelllinien. Dieser u.a. in Melanozyten exprimierte Transkriptionsfaktor wird in Melanomzellen nicht mehr produziert. Eine Überexpression dieses „Tumorsupressors“ führt zu einer geringeren Expression von BM-40 und $\alpha_v\beta_3$ Integrin in solchen Melanomzellen (Felicetti et al., 2004).

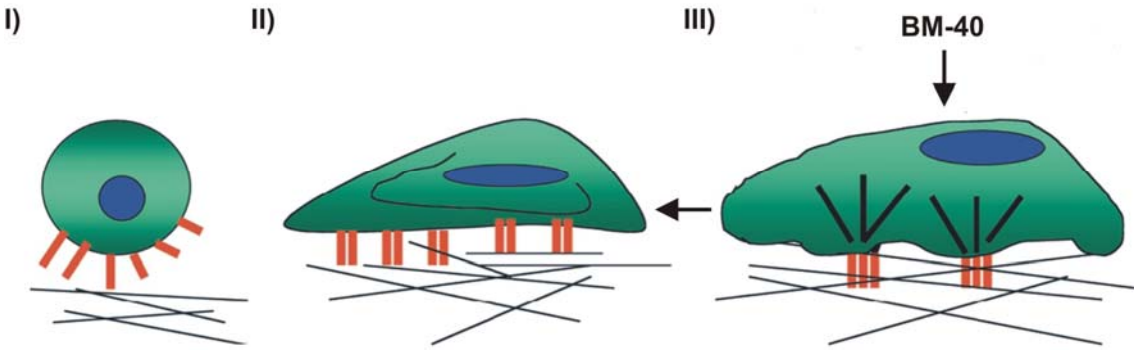


Abb. 1.1.2: **Schematische Darstellung der Wirkung von BM-40 auf das Adhesionsverhalten von Zellen.** I) keine Adhesivität (z.B. bei apoptotischen Zellen); II) schwache bis mittlerer Adhesivität (z.B. bei migrierenden Zellen), III) starke Adhesivität (z.B. bei differenzierenden Zellen) (nach Murphy-Ullrich, 2001)

Es ist auch vorstellbar, dass es keinen zellulären Rezeptor für BM-40 gibt, und das die umfänglich dokumentierten Funktionen sich auf indirekte Interaktionen von BM-40, etwa über Interaktionen mit Wachstumsfaktoren, zurückführen lassen.

1.2 Die BM-40 Familie

Der Nachweis des ersten EF-Hand Paares in einem extrazellulären Protein warf die Frage auf, ob es weitere Proteine gibt, die ein solches Motiv aufweisen. Anhand von Datenbanksuchen mit der Sequenz des BM-40 konnten weitere extrazelluläre Proteine mit einem FS-EC Domänenpaar, aber teilweise unterschiedlichem Domänenaufbau identifiziert werden (siehe *Abb. 1.2.1*). Hierbei handelt es sich um das in einer gehirnspezifischen Expressionsdatenbank aus Ratte gefundene SC1 (Johnston et al., 1990), das von Müller Zellen in der späten Phase der Retinaentwicklung exprimierte QR1 aus Wachtel (Guermah et al., 1991), das in Osteoblasten aus Maus durch TGF-β induzierte TSC-36 (Shibanuma et al., 1993) und das aus humaner Samenflüssigkeit isolierte Proteoglykan Testican (Alliel et al., 1993).

In unserem Institut wurden in den letzten Jahren sechs weitere Proteine mit Homologie zum FS-EC Domänenpaar des BM-40 gefunden. Zwei dieser Proteine waren in ihrem Domänenaufbau identisch zum Testican und wurden deshalb als Testican-2 und -3 bezeichnet. Vier weitere zeigen einen bis dahin unbekannten Domänenaufbau. Dabei handelt es sich um die von uns als SMOC-1 und -2 (*secreted modular calcium binding protein -1* und *-2*) bezeichneten Proteine, sowie um die Proteine Fstl4 und Fstl5 (*follistatin like 4* und *5).* Zusammen bilden diese Proteine die BM-40 Familie (siehe *Abb. 1.2.1*).

Neben der Follistatin ähnlichen (FS) und extrazellulären Calcium-bindenden (EC) Domäne besitzen die meisten Mitglieder der BM-40 Familie noch zusätzliche Domänen. Die als Fstl4 und Fstl5 bezeichneten Proteinen weisen carboxyterminal des FS-EC Domänenpaares zwei Immunglobulin ähnliche Domänen und eine Domäne ohne Homologie zu bekannten Proteinen auf. Die im BM-40 aminoterminal des FS-EC Domänenpaares gelegene negativ geladene Domäne fehlt. Dies gilt ebenso für SMOC-1 und -2. Die beiden Proteine nehmen zudem eine Sonderstellung innerhalb der BM-40 Familie ein, da bei ihnen das FS-EC Domänenpaar durch eine Insertion einer von zwei Thyroglobulin ähnlichen (TY) Domänen flankierten SMOC spezifischen Sequenz unterbrochen ist. Thyroglobulin ähnliche Domänen werden auch als Thyropine bezeichnet und kommen z.B. einfach im IGFBP (*insulin-like growth factor binding protein*) oder elffach im Thyroglobulin vor. Die Testicane besitzen neben einer negativ geladenen Domäne an ihrem Aminoterminus caboxyterminal des FS-EC Domänenpaares eine TY Domäne, sowie eine Domäne ohne Homologie zu bekannten Proteinen. Diese Domäne enthält zwei potentielle Glykosylierungsstellen für

Glykosaminoglykane. Solche Stellen finden sich in keinem anderen Protein der BM-40 Familie. Beim TSC-36 finden sich aminoterminal des FS-EC Domänenpaares nur wenige Aminosäuren. Die carboxyterminale Domäne von TSC-36 zeigt Ähnlichkeiten zu von Willebrand Faktor Typ C Domänen. SC1 und QR1 sind in ihrem Domänenaufbau dem BM-40 am ähnlichsten und unterscheiden sich nur in Ladung und Länge ihrer aminoterminalen Domäne.

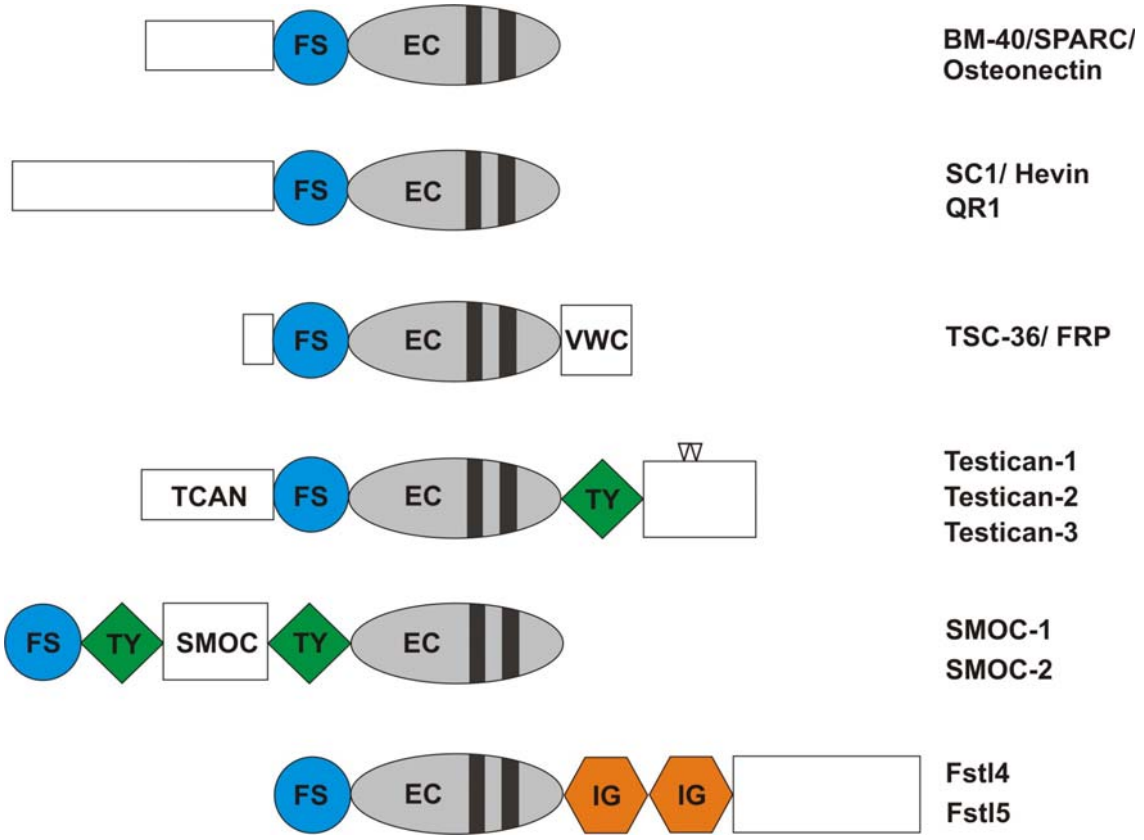


Abb.1.2.1: **Schematische Darstellung der Domänenorganisation aller bekannten Mitglieder der BM-40 Familie.** (FS) = Follistatin ähnliche Domäne, (EC) = extrazelluläre Calcium bindende Domäne mit zwei EF-Hand Motiven (schwarze Balken), (TY) = Thyroglobulin ähnliche Domäne, (IG) = Immunglobulin ähnliche Domäne, (VWC) = von Willebrand Faktor C ähnliche Domäne, (TCAN) = Testican spezifische Domäne, (SMOC) = *secreted modular calcium binding protein* spezifische Domäne, offene Boxen = Domänen ohne Homologie zu bekannten Proteinen, ∇ = potentielle Glykosylierungsstelle für Glykosaminoglykan Ketten

Auf Aminosäurenebene zeigen SC1 und sein humanes Ortholog Hevin eine Homologie von mehr als 50% zum BM-40. Es überrascht deshalb nicht, dass SC1 dem BM-40 vergleichbare Funktionen zugeordnet werden können. Wie bereits erwähnt interagiert BM-40 mit Kollagen I. Eine solche Interaktion konnte auch für SC1 gezeigt werden (Hambrock et al., 2002). Darüber hinaus sind de-adhesive Eigenschaften für SC1 belegt. So verhindert SC1 die Ausbildung fokaler Zellkontakte von Endothelzellen (Girard und Springer, 1995) und reduziert die Adhesivität von migrierenden Neuronen

im sich entwickelnden Cortex von Ratten Embryonen. Dort findet es sich auf der Oberfläche von Gliafasern und dient den migrierenden Neuronen als Terminationssignal (Gongidi et al., 2004). Im Gegensatz zu BM-40 wird die Produktion von SC1 in Tumorzellen gedrosselt (Claeskens et al., 2000). Trotz offensichtlich ähnlicher Eigenschaften ist die Expression in Tumorzellen für beide Proteine diametral. Eine unterstützende oder voneinander abhängige Funktion der beiden Proteine belegen Experimente mit Mäusen, die für SC1 und BM-40 defizient sind. Diese Tiere zeigen in der körpereigenen Abwehrreaktion nach Implantationen eine übermäßige Vaskularisierung rund um das implantierte Fremdgewebe. Dieser Effekt ist in Mäusen mit nur einem inaktiven Gen nicht zu beobachten (Barker et al., 2005).

Die Beobachtung, dass zwei zueinander homologe Proteine neben ähnlichen bzw. ergänzenden Funktionen auch antagonistische Funktionen besitzen können, ist auch für die Testicane gezeigt. Einen ähnlichen Effekt zeigen Testican-1 (nach der Entdeckung zweier neuer Testicane wird das zuvor bereits erwähnte Testican im folgendem als Testican-1 bezeichnet) und Testican-2 in Zellkulturexperimenten auf das Auswachsen von Neuriten. So ist für Testican-1 eine de-adhesive Wirkung und ein repulsiver Effekt auf das Neuritenwachstum von Neuroblastomzellen beschrieben (Marr und Edgell, 2003). Eine vergleichbare inhibitorische Wirkung auf das Neuritenwachstum primärer Cerebellumzellen ist für Testican-2 gezeigt (Schnepp et al., 2005). Ein antagonistischer Effekt von Testican-2 auf die Funktion von Testican-1 und -3 konnte ebenfalls anhand von *in vitro* Experimenten bestimmt werden. So wird die inhibitorische Wirkung von Testican-1 und -3 auf die Aktivierung von MMP-2 (Matrix Metalloproteinase 2) durch Testican-2 aufgehoben. Zusätzlich verlieren Testican-3 transfizierte Gliomazellen in Gegenwart von Testican-2 die Fähigkeit in eine sie umgebende Kollagenmatrix einzudringen. Mutationsanalysen zeigen, dass die aminoterminale Domäne der Testicane für die unterschiedlichen Funktionen verantwortlich ist (Nakada et al., 2001; Nakada et al., 2003).

Eingehend untersucht ist von allen BM-40 Familienmitgliedern bisher nur BM-40 selbst. Ob solche antagonistischen oder ergänzenden Funktionen auch zwischen anderen Mitgliedern der BM-40 Familie von Bedeutung sind, und ob es sich dabei um ein für die BM-40 Familie typisches Phänomen handelt, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt deshalb nicht sagen.

Da in dieser Arbeit Testican-2 und SMOC-1 untersucht werden, sollen beide Proteine in den folgenden Kapiteln noch etwas detaillierter vorgestellt werden.

1.3 Testican-1, -2 und -3

Ihre übereinstimmende Domänenorganisation macht die Testicane zu einer aus drei Mitgliedern bestehenden Unterfamilie innerhalb der BM-40 Familie. Die Calcium -bindenden Eigenschaften der EC Domäne sind für alle Testicane experimentell nachgewiesen (Kohfeldt et al., 1997; Vannahme et al., 1999; Ursula Hartmann, pers. Mitteilung). Die Testicane besitzen ein theoretisches Molekulargewicht zwischen 46,9 kDa und 49,6 kDa. Das Vorhandensein hydrophober Aminosäuren am Amino-terminus, wie sie für Signalpeptide typisch sind und das Fehlen weiterer hydrophober Regionen, wie sie Transmembranproteine enthalten, lassen darauf schließen, dass es sich um sekretierte, extrazelluläre Proteine handelt. In der am stärksten konservierten Region der aminoterminalen Domäne finden sich zwei durch ein Valin getrennte Glutaminsäuren. Diese drei Aminosäuren werden in allen Testicanen von einem neun Basenpaare großen Mikro-Exon codiert. Datenbankanalysen zeigen, dass dieses Exon in Testican-1 und -3 alternativ gespleisst wird (Detlef Heep, Diplomarbeit). In ihrer C-terminalen Domäne besitzen die Testicane zwei potentielle Glykosylierungsstellen für Glykosaminoglykane (siehe *Abb. 1.2.1)*.

Proteoglykane bestehen aus einem Proteinkern mit kovalent gebundenen Glykosaminoglykanketten (GAG Ketten). Solche GAG Ketten bestehen aus sich wiederholenden Disacharid Einheiten und lassen sich entsprechend der chemischen Natur ihrer Bausteine in vier Gruppen einteilen: Hyaluronan (HA), welches als proteinfreies Polysacharid vorkommt, Chondroitinsulfat/ Dermatansulfat (CS/DS), Keratansulfat (KS) und Heparansulfat (HS). Die Diversität solcher GAG Ketten ergibt sich durch ihre Länge, der chemischen Natur ihrer Bausteine, sowie der unterschiedlichen Nutzung möglicher Sulfatierungsstellen (Hartmann und Maurer, 2001). Experimentell konnte gezeigt werden, dass alle drei Testicane tatsächlich als Proteoglykane (PG) vorkommen. Testican-2 und -3 existieren in allen bisher unter-suchten Geweben nur als Heparansulfat Proteoglykane, während Testican-1 als Chondroitin/ Heparansulfat Proteoglykan vorkommt (Alliel et al., 1993; Schnepp et al., 2005; Daniel Hechler, Diplomarbeit).

Das ursprünglich aus humaner Samenflüssigkeit isolierte Testican-1 (Alliel et al., 1993) wird in Mäusen während der Embryogenese hauptsächlich im Nervensystem exprimiert, wo sein Auftreten mit der Migration von Neuronen und axonalen Wachstumsphasen korreliert. Die Expression beginnt am Embryonaltag 10,5 (E 10,5) und neben dem Gehirn finden sich weitere Signale im Rückenmark, im peripheren Nervensystem und in der Medulla der Nebenniere (Charbonnier et al., 2000). In

adulten Mäusen ist seine Expression vorwiegend auf das Gehirn beschränkt, mit besonders starken Signalen in den CA3 und CA4 Regionen des Hippocampus (Bonnet et al., 1996; Charbonnier et al., 1997). Testican-2 wird zum ersten Mal am Embryonaltag 6,5 (E 6,5) detektiert, wo es mit der Basalmembran assoziert ist, die das Ektoderm vom Endoderm trennt. Während der Embryogenese findet sich Testican-2 im Nervensystem, dem Herzen, in Blutgefäßen, in der Skelettmuskulatur und in endokrinen Organen. Kurz nach der Geburt verschwinden die Signale im Herzen und in der Skelettmuskulatur, dafür wird Testican-2 zusätzlich in der Lunge exprimiert. Im adulten Gehirn finden sich besonders starke Signale im Hippocampus und in den Purkinje Zellen des Cerebellums (siehe *Abb. 1.3.1*) (Vannahme et al. 1999; Schnepp et al., 2005). Testican-3 wird zum ersten Mal am Embryonaltag 10,5 (E 10,5) detektiert. Während der Embryonalentwicklung finden sich Testican-3 spezifische Signale im Nervensystem, in der Basalmembran von Blutgefäße des Herzens und in der Leber (Daniel Hechler, Diplomarbeit). In adulten Mäusen ist Testican-3 auf das Gehirn beschränkt (Ursula Hartmann, pers. Mitteilung). Allen Testicanen gemeinsam ist, dass ihre Expression im Gehirn auf Neuronen beschränkt ist.

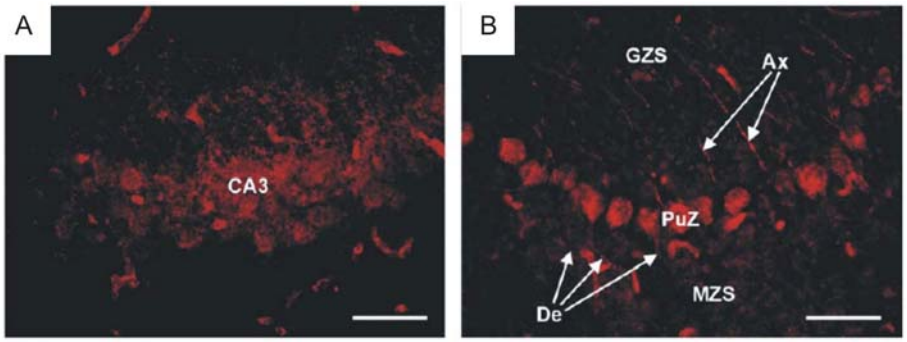


Abb. 1.3.1: **Immunhistochemische Lokalisation von Testican-2 im Hippocampus und Cerebellum einer adulten Maus.** A: Hippocampus, CA3 = Hippocampusfeld CA3. B: Cerebellum, Ax = Axon, De = Dendriten, GZS = Granulärzellschicht, MZS = Mitralzellschicht, PuZ = Purkinje Zellen (nach Schnepp et al, 2005)

Neben dem schon erwähnten inhibitorischen Effekt von Testican-1 und -3 auf die Aktivierung von MMP-2, ist für Testican-1 auch eine inhibitorische Funktion für das lysosomale Enzym Cathepsin L beschrieben. Die inhibitorischen Eigenschaften sind der Thyropin Domäne von Testican-1 zuzurechnen. Große Mengen an Testican-1 und Enzym führen zu einer proteolytischen Spaltung von Testican-1 nahe dem für die Inhibierung verantwortlichen aktiven Zenrum (Bocock et al., 2003; Meh et al., 2005). Da es sich bei den Testicanen um extrazelluäre Proteine handelt, ist eine inhibitorische Funktion von Testican-1 *in vivo* auf ein lysosomales Enzym vielleicht nicht zu erwarten.

Aus *in vitro* Experimenten ist aber bekannt, dass Cathepsin L in Anwesenheit von Proteoglykanen extrazelluläre Proteine degradiert (Ishidoh et al., 1995).

Eine Möglichkeit zur Bestimmung der tatsächlichen Funktion von Testicanen *in vivo* besteht in der Inaktivierung der entsprechenden Gene in der Maus. In unserem Institut wurden vor kurzem Testican-1 defiziente Mäuse generiert. Die Mäuse sind lebensfähig, fruchtbar und zeigen keinen auffällig veränderten Phänotyp (Sandra Röll, Dissertation).

1.4 SMOC-1 und -2

Während bei allen anderen Familienmitgliedern der BM-40 Familie unmittelbar carboxyterminal der FS Domäne die EC Domäne folgt, ist diese Abfolge bei SMOC-1 und -2 durch eine Insertion unterbrochen. Die Insertion besteht aus zwei TY Domänen, die einen Bereich flankieren, der zwar innerhalb der SMOC Proteine hoch konserviert ist, aber keinerlei Homologie zu anderen Proteinen aufweist (siehe *Abb. 1.2.1*). Beide Proteine besitzen ein Signalpeptid an ihrem Aminoterminus und keine weiteren hydrophoben Regionen, so dass es sich bei SMOC-1 und -2 ebenfalls um sekretierte Proteine handelt.

SMOC-1 ist ein Glykoprotein mit Calcium bindenden Eigenschaften und einem theoretischen Molekulargewicht von 50,7 kDa. Northern Blot und RT-PCR Ergebnisse zeigen eine breite Gewebeverteilung mit besonders starken Signalen in den Ovarien, dem Thymus und dem Gehirn. Keine Transkripte finden sich in der Milz. Immunhistologische Untersuchungen zeigen mit Ausnahme der Ovarien eine Basalmembran assoziierte Färbung. In den Ovarien ist ein Bereich direkt um die Eizelle herum markiert. Experimente zur ultrastrukturellen Lokalisation von SMOC-1 verifizieren diese Beobachtungen (*siehe Abb. 1.4.1*). Die Bilder zeigen SMOC-1 als integralen Bestandteil der Basalmembran. In den Ovarien findet sich SMOC-1 innerhalb der Zona Pellucida (Vannahme et al., 2002).

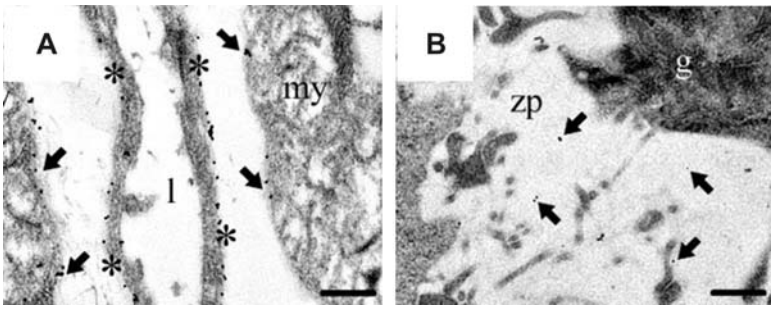


Abb. 1.4.1: **Ultrastrukturelle Lokalisation des goldmarkierten SMOC-1 in Muskel (A) und Ovar (B).** A) die Pfeile kennzeichnen die Basalmembran um den Muskel, die Sternchen die endotheliale Basalmebran eines Blutgefäßes. my = Myozyt, l = Lumen, Balken = 0,25 µm
B) die Pfeile markieren die Lokalisation von SMOC-1 in der Zona Pellucida. g = Granulosa Zellen, zp = Zona Pellucida, Balken = 0,18 µm (aus Vannahme et al., 2002)

Basalmembranen stellen eine spezialisierte Struktur innerhalb der extrazellulären Matrix dar. Sie sind üblicherweise zwischen 40 und 120 nm dick und bestehen aus einer überschaubaren Anzahl struktureller Komponenten. Hierbei handelt es sich vor

allem um Kollagen Typ IV, verschiedene Laminine, das Adaptermolekül Nidogen-1 (Entactin) und um das Proteoglykan Perlecan. Vielfältige Interaktionen zwischen diesen Komponenten gewährleisten die Stabilität dieser Struktur (siehe *Abb. 1.4.2*). Die Organisation der Basalmembran wird über Interaktionen mit membranständigen Proteinen (z.B. Integrine und Dystroglykane) gesteuert.

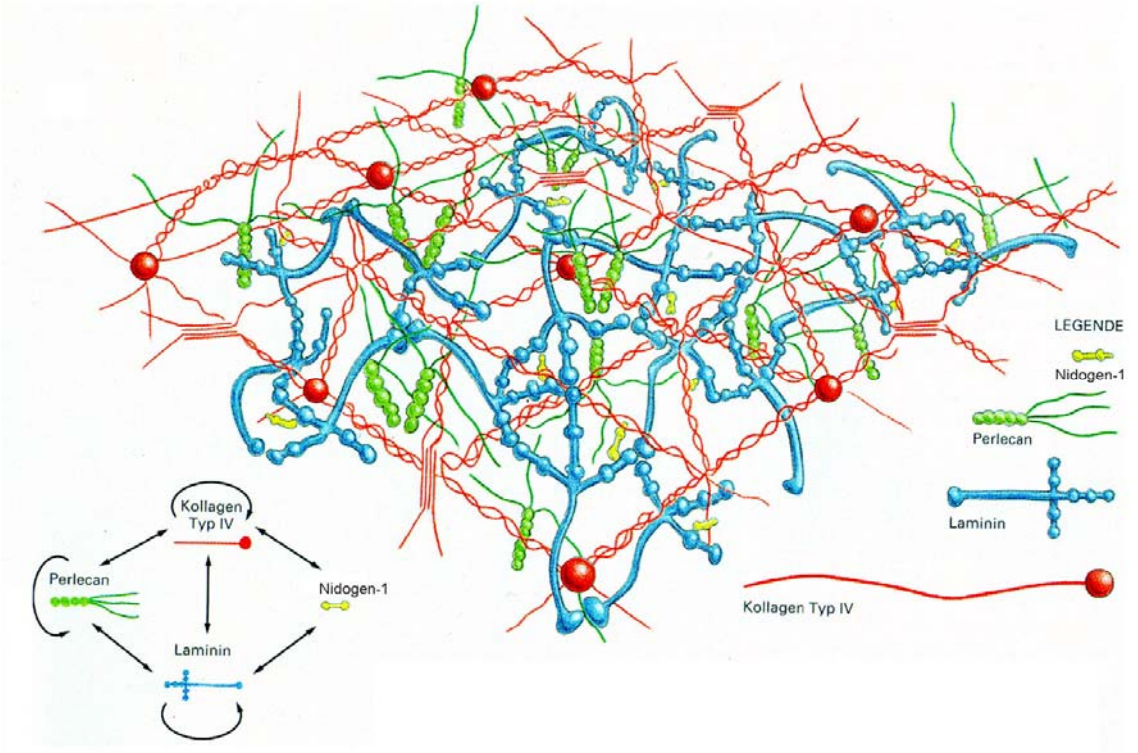


Abb. 1.4.2: **Schematische Darstellung der strukturbildenden Interaktionen der wichtigsten Basalmembrankomponenten.** Das Kollagen IV und das Laminin Netzwerk wird über das Adaptermolekül Nidogen-1 verknüpft. Perlecan besitzt Bindungsstellen für Laminin-1 und Kollagen IV (nach Yurchenco und Schittny, 1990; aus Alberts „Molekularbiologie der Zelle“ übernommen)

Basalmembranen trennen Zellen oder Zellverbände vom sie umgebenden Bindegewebe und besitzen neben strukturellen und filternden Eigenschaften auch regulatorische Funktionen. Ein Beispiel: Brust Epithelzellen, die mit Basalmembranen in direktem Kontakt stehen sind für apoptotische Signale unempfänglich, Zellen aus dem Zentrum einer mit der Basalmembran in Kontakt stehenden „Zellmasse“ sterben hingegen (Debnath et al., 2002). Es ist bekannt, dass Interaktionen zwischen der Basalmembran und $\alpha_6\beta_4$ Integrin für die Bildung von Hemidesmosomen verantwortlich sind. Die Polarisierung der Zellen ist zwingende Vorraussetzung für eine erfolgreiche Organisation des Cytoskeletts und damit der Etablierung funktionaler Signalwege. Schlägt eine solche intrazelluläre Umorganisation fehl, sind Zellen beispielsweise nicht in der Lage Apoptose auslösenden Signalen zu widerstehen (Weaver et al., 2002). Es

konnte gezeigt werden, dass eine Laminin Matrix für eine erfolgreiche Polarisierung von Epithelzellen unabdingbar ist (O'Brien et al., 2001). Basalmembran assoziierte Proteine, wie SMOC-1, könnten durchaus die biologischen Eigenschaften von Basalmembranen beeinflussen.

SMOC-2 ist mit einem theoretischen Molekulargewicht von 52,9 kDa etwas größer als SMOC-1. Es ist ebenfalls glykosyliert und hat die Fähigkeit, Calcium zu binden. Northern Blot und RT-PCR Untersuchungen zeigen eine breite Gewebeverteilung mit starken Signalen in den Ovarien, dem Herz, dem Muskel und in der Milz (Vannahme et al., 2003).

1.5 Ziele der Arbeit

Zur Bestimmung einer potentiellen Funktion von Testican-2 *in vivo* sollte das murine Gen mittels homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus inaktiviert und ein möglicher Phänotyp analysiert werden. Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde bereits ein Vektor zur Inaktivierung des Testican-2 Gens in der Maus generiert. Da nah verwandte Proteine häufig ähnliche Funktionen übernehmen, ist eine Kompensierung der Testican-2 Defizienz durch eines der anderen Testicane denkbar. Die Inaktivierung des Testican-2 Gens in der Maus ist Teil eines Projekts, bei dem alle drei Testicane inaktiviert werden sollen. Dies ermöglicht neben der Analyse der einfach defizienten Tiere auch die Aufdeckung der Funktionen, die von mehr als einem der Proteine übernommen werden.

Zusätzlich sollte die mögliche Bedeutung eines in allen Testicanen vorkommenden Mikro-Exons untersucht werden.

Ausgehend von der Gewebeverteilung konnte SMOC-1 als integraler Bestandteil von Basalmembranen ermittelt werden. Es stellte sich die Frage, welche Funktion SMOC-1 in dieser Struktur übernimmt. Die Ermittlung möglicher Interaktionspartner in der Basalmembran könnte einen ersten Hinweis darauf geben. Zur Beantwortung dieser Frage sollte SMOC-1 in einem eukaryotischen Expressionsystem exprimiert und mit dem gereinigten Protein Interaktionsstudien mit strukturellen Basalmembran Komponenten durchgeführt werden.

2. Ergebnisse

2.1 Untersuchungen zur Funktion des Exon 2 im Testican-2 Gen

Das Exon 2 im Testican-2 Gen ist nur neun Basenpaare groß. Dieses Exon codiert zwei durch ein Valin getrennte Glutaminsäuren (EVE). Diese drei Aminosäuren finden sich in der am stärksten konservierten Region der aminoterminalen Domäne aller Testicane (siehe Anhang 1). Ergebnisse aus Datenbankanalysen während meiner Diplomarbeit zeigen, dass dieses Exon im Testican-1 und -3 Gen alternativ gespleisst wird. Die in der Datenbank gefundenen Testican-2 Sequenzen enthielten hingegen immer Exon 2. Eine mögliche Funktion der von dieser Sequenz codierten Aminosäuren sollte mittels einer um Exon 2 deletierten Isoform bestimmt werden. Eine Vermutung war, dass die drei Aminosäuren (EVE) Einfluss auf die Lokalisation des Proteins haben. Das eine solche Funktion von kurzen Sequenzabschnitten übernommen werden kann, zeigt das dem Testican-2 Gen benachbarte Prosaposin Gen. Es enthält ebenfalls ein für nur drei Aminosäuren (QDQ) codierendes und alternativ gespleisstes Exon. Die Variante mit den drei Aminosäuren wird sekretiert, das Protein ohne die drei Aminosäuren zu den Lysosomen transportiert (Madar-Shapiro et al., 1999). In einem zweiten Experiment sollte untersucht werden, ob es sich bei den durch das Mikro-Exon codierten Aminosäuren (EVE) um eine proteolytische Prozessierungsstelle handelt. Anhaltspunkt hierfür ist die Ähnlichkeit mit der Consensus Sequenz der Spaltestelle für das proteolytische Enzyms Aggrecanase 1 (ADAMTS-4). Diese besteht aus zwei Glutaminsäuren und einer zentralen dritten Aminosäure, die wenig bis gar nicht konserviert ist (E-[G/L/E/S]-E). Die Proteoglykane Aggrecan und Brevican werden carboxyterminal dieser Sequenz gespalten (Tortorella et al., 2000; Nakamura et al., 2000).

2.1.1 Die genomische Organisation des Testican-2

Mit Hilfe der murinen und humanen cDNA Sequenz (*copyDNA*) wurde anhand von Datenbankanalysen in der HTGS Datenbank (*high throughput genomic sequences*) die genomische Lokalisation sowie die Exon/Intron Struktrur der entsprechenden Gene ermittelt (siehe *Abb. 2.1.1*).

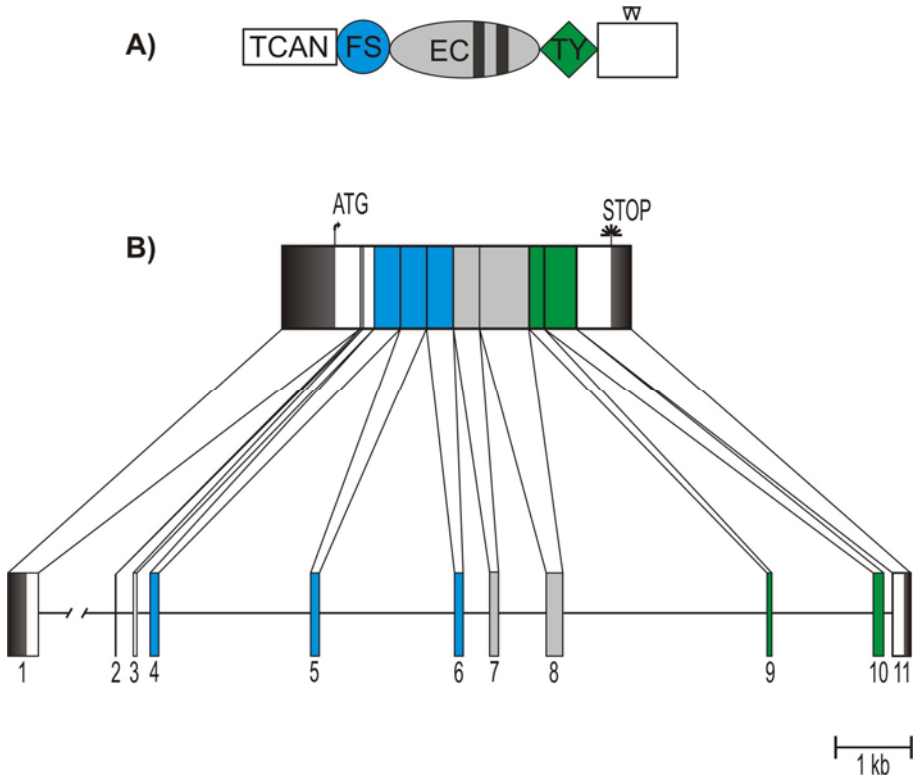


Abb. 2.1.1: **Darstellung der Domänenorganisation und der Exon/Intron Struktur des murinen Testican-2.** A) Domänenorganisation: (FS) = Follistatin ähnliche Domäne, (EC) = extrazelluläre Calcium bindende Domäne mit zwei EF-Hand Motiven (schwarze Balken), (TY) = Thyroglobulin ähnliche Domäne, (TCAN) = Testican spezifische Domäne, offene Boxen = Domänen ohne Homologie zu bekannten Proteinen, ∇ = potentielle Glykosylierungsstelle für Glykosaminoglykan Ketten.
B) Exon/Intron Struktur: Für eine bessere Darstellung sind die Exons in der oberen Abbildung vergrößert abgebildet. Die tatsächliche Größe des Intron 1 beträgt 14,72 kb.

Den Domänengrenzen können immer Exon/Intron Übergänge zugeordnet werden (Detlef Heep, Diplomarbeit). Das humane Testican-2 Gen ist 29,5 kb groß, das murine Gen mit einer Größe von 25,5 kb etwas kleiner. Beide Gene konnten jeweils dem Chromosom 10 zugeordnet werden und setzten sich aus insgesamt 11 Exons zusammen.

2.1.2 Klonierung und anschließende Expression der verschiedenen Testican-2 Isoformen in eukaryontischen Zellen

Die mögliche Bedeutung, der von Exon 2 codierten Aminosäuren (EVE) sollte durch rekombinante Expression der murinen Isoformen in eukaryontischen Zellen und anschließender Charakterisierung der Proteine untersucht werden. Dabei wurde das um die drei Aminosäuren (EVE) deletierte Protein mit dem Volllänge Protein verglichen. Da die Möglichkeit einer unterschiedlichen Lokalisation untersucht werden sollte, wurden Testican-2-GFP (*green fluorescent protein*) Fusionsproteine hergestellt.

Die hierfür benötigten Konstrukte wurden über *in vitro* Mutagenese generiert. Nach Vermehrung der Konstrukte in Bakterien und anschließender Aufreinigung der Plasmid DNA wurden beide Konstrukte sequenziert. Die Analyse ergab, dass keine ungewollten Mutationen eingeführt wurden. Zunächst wurde ein möglicher Einfluss der drei Aminosäuren auf die Lokalisation des Proteins untersucht. Dabei sollte beantwortet werden, ob z.B. das Volllänge Konstrukt sekretiert wird, während sich das um die drei Aminosäuren deletierte Protein in der Zelle anreichert. Es wurden die murine Myoblastenzelllinie C2F3 und die aus Neuroblastomzellen und Gliomazellen bestehende Hybridzelllinie NG108 eingesetzt. Beide Zelllinien exprimieren endogen Testican-2. Durch die Verwendung von Zelllinien verschiedenen Ursprungs, sollte einer gewebeabhängigen Funktion der verschiedenen Isoformen entsprochen werden. Die Zellen wurden transfiziert und über einen Zeitraum von vier Tagen beobachtet. An keinem der Tage konnte ein signifikanter Unterschied in der Lokalisation der Proteine beobachtet werden. Da die Zellen durch etwa 0,5 cm Medium hindurch beobachtet wurden, muss allerdings gesagt werden, dass eine genaue Lokalisation der Fusionsproteine (z.B. in den verschiedenen Zellkompartimenten) nicht bestimmt werden kann (siehe *Abb. 2.1.2.1*).

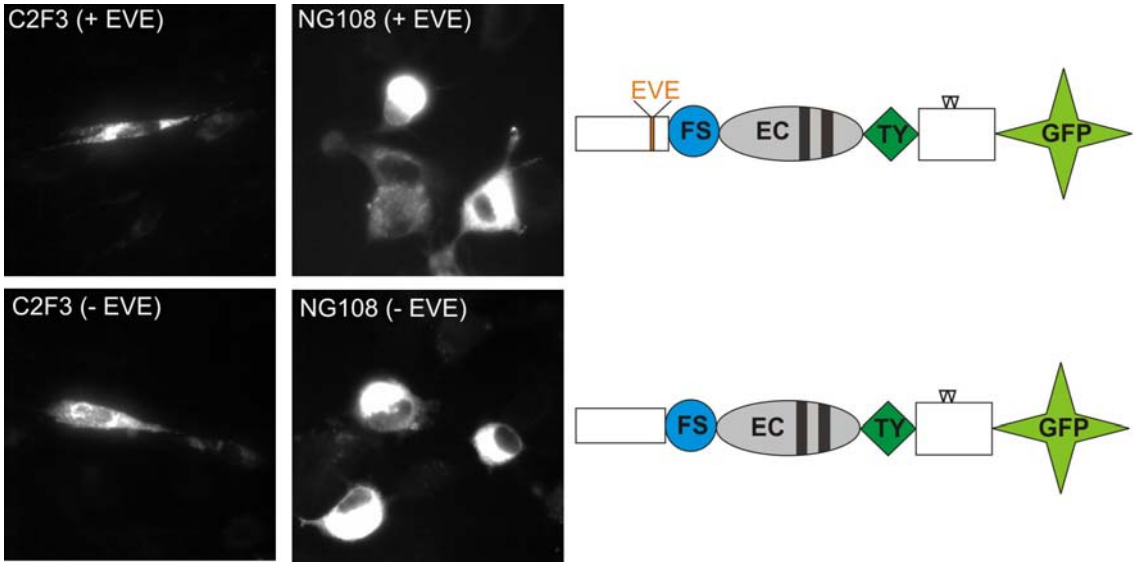


Abb.2.1.2.1: **Untersuchungen zur möglichen Bedeutung der vom Mikro-Exon codierten Aminosäuren (EVE) auf die Lokalisation von Testican-2.** Links: Fluoreszenzbilder der mit den verschiedenen Testican-2-GFP Konstrukten transfizierten Zellen 48 Stunden nach Transfektion. Die Bilder wurden durch 0,5 cm Medium hindurch aufgenommen. C2F3 = murine Myoblasten, NG108 = Hybridzelllinie aus murinen Neuroblasten (N18TG2) und Gliomazellen aus Ratte (C6).
Rechts: Domänenorganisation der Testican-2-GFP Fusionsproteine (mit und ohne EVE). (FS) = Follistatin ähnliche Domäne, (EC) = extrazelluläre Calcium bindende Domäne mit zwei EF-Hand Motiven (schwarze Balken), (TY) = Thyroglobulin ähnliche Domäne, GFP = *green fluorescent protein*, offene Boxen = Domänen ohne Homologie zu bekannten Proteinen, ∇ = potentielle Glykosylierungsstelle für Glykosaminoglykan Ketten

Als nächstes sollte untersucht werden, ob es sich bei den von Exon 2 codierten Aminosäuren (EVE) um eine proteolytische Prozessierungsstelle handelt. Aufgrund der Ähnlichkeit mit der Consensus Sequenz der Spaltstelle für das Enzyms Aggrecanase-1, wurden in Kooperation mit der Firma Invitek (Gesellschaft für Biotechnik & Biodesign mbH, Berlin) proteolytische Verdaue aller drei Volllänge Testicane mit diesem Enzym durchgeführt. Keines der Testicane wird von diesem Enzym prozessiert (nicht gezeigte Ergebnisse).

Ob es sich bei den drei Aminosäuren (EVE) um eine Prozessierungsstelle für ein anderes Enzym handelt, sollte durch Expression der beiden Testican-2 Isoformen in humanen Fibrosarcomzellen (HT1080) untersucht werden. Der Vorteil dieser Zelllinie wurde darin gesehen, dass Krebszelllinien ganz allgemein größere Mengen an Proteasen exprimieren und invasive Eigenschaften für diese Zelllinie belegt sind (u.a. Yoon et al., 2001). Nach Transfektion und Selektion der Zellen, wurden äquivalente Mengen an Überstand und Matrix aus den verschiedenen Kulturen in einem SDS PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mittels Western Blot Analyse untersucht. Die größten Mengen an Testican-2 wurden als Proteoglykan Form im Überstand gefunden. Im Gegensatz dazu war Testican-2 (beide exprimierten Isoformen) nur dann Bestandteil der extrazellulären Matrix, wenn es nicht mit GAG Ketten komplexiert war (Abb. 2.1.2.2 B). In der Matrix Fraktion, die das Testican-2-GFP Fusionsprotein mit den drei Aminosäuren (EVE) enthielt, wurden neben der apparenten Bande bei 94 kDa, welche der Größe des Fusionsproteines entspricht, zwei zusätzliche Banden detektiert. Diese Banden waren in der Matrixfraktion der Deletionsmutante (- EVE) nicht zu finden. Die apparente Bande bei etwa 88 kDa entspricht dabei der Größe eines im Bereich der drei Aminosäuren (EVE) gespaltenen Proteins. In der Matrix der Kontrollfraktion (das unveränderte peGFP-N1 Expressionsplasmid) wurde erwartungsgemäß kein Testican-2 detektiert. Bei den vom Exon 2 codierten Amino-säuren (EVE) handelt es sich vermutlich um eine Erkennungssequenz nahe der eigentlichen Prozessierungsstelle für ein proteolytisches Enzym oder um die Spaltstelle selbst.

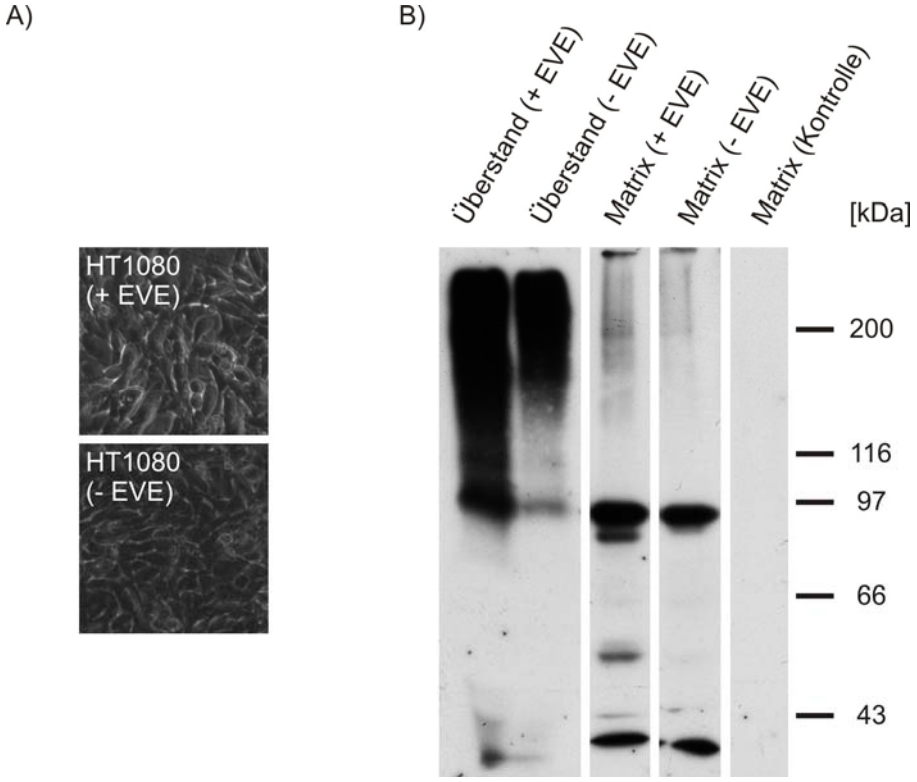


Abb.2.1.2.2: **HT1080 Zellen in Kultur und biochemische Analyse der beiden Testian-2 Isoformen.** A) Durchlichtbilder der mit den verschiedenen Testican-2-GFP Konstrukten stabil transfizierten HT1080 Zellen 6 Tage nach Beendigung der Selektion durch G418. Obere Reihe: Volllänge Testican-2 (+EVE), untere Reihe die Deletionsmutante (- EVE). Die Bilder wurden durch 0,5 cm Medium hindurch aufgenommen.
B) Von diesen Kulturen wurden jeweils 60 µl Überstand und umgerechnet 1cm^2 der Matrixfraktion unter reduzierenden Bedingungen in einem 7% SDS PAGE aufgetrennt, anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und die spezifischen Signale mit einem affinitätsgereinigten Antikörper gegen murines Testican-2 detektiert.

2.1.3 Alternatives Spleissen des Exon 2 im Testican-2 Gen

Parallel zu den Zellkulturexperimenten sollte überprüft werden, ob und in welchen Geweben das Exon 2 im Testican-2 Gen alternativ gespleisst wird. In Kapitel 2.1 wurde erwähnt, dass die während meiner Diplomarbeit gefundenen EST Klone immer der Isoform entsprachen, die Exon 2 enthält. Zu diesem Zeitpunkt wurden allerdings nur 13 humane und 3 murine EST Klone in der Datenbank gefunden. Nach dem Stand September 2005 wurden in Datenbankanalysen insgesamt 34 murine, 52 humane und 79 EST Klone anderer Spezies gefunden. Abgesehen von einer Ausnahme in einem humanen EST Klon aus einem adulten Gewebepool (sechs Gehirne, eine Lunge und ein Testikel, Gen Bank Nummer BI822626) der das Exon 2 nicht enthielt, war das Exon 2 immer Bestandteil der Sequenzen. Unterstützend wurden mehrere RT-PCR Untersuchungen auf RNA aus murinen und humanen Geweben durchgeführt (siehe *Abb. 2.1.3*).

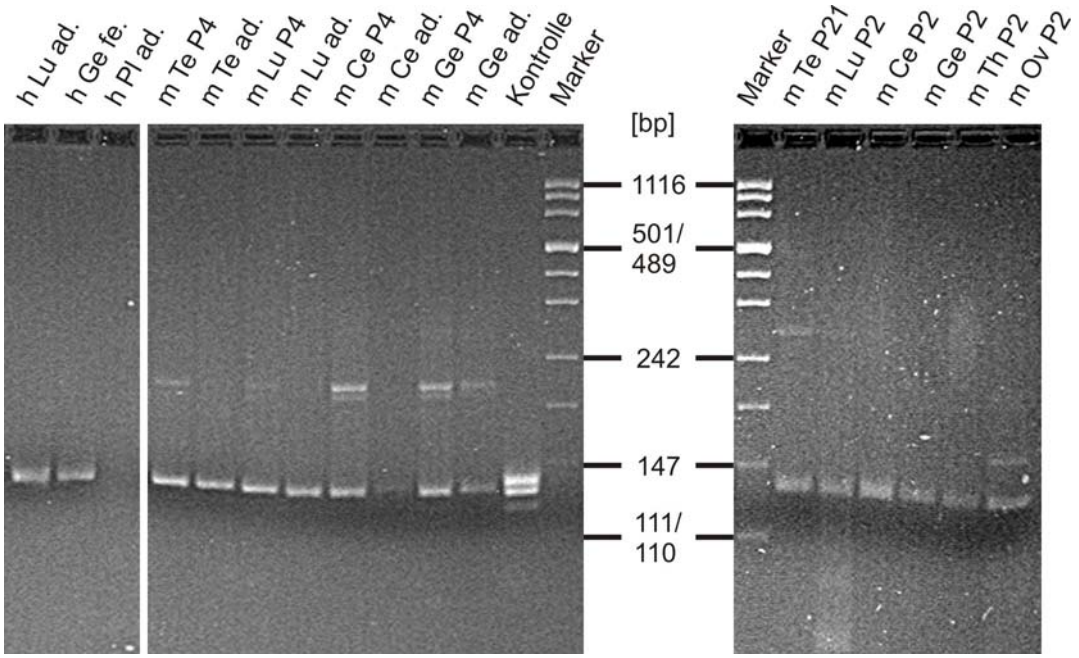


Abb. 2.1.3: **RT-PCR Analyse auf murine und humane RNA aus verschiedenen Geweben zur Darstellung eines möglichen alternativen Spleissens von Exon 2.** Es wurden jeweils 25 µl Aliquots der entstandenen RT-PCR Produkte in einem 4% Agarosegel elektrophoretisch getrennt und mit Etidiumbromid (EtBr) sichtbar gemacht. Lu = Lunge, Ge = Gehirn, Pl = Placenta, Te = Testis, Ce = Cerebellum, Th = Thymus, Ov = Ovarien, h = human, m = murin, ad = adult, fe = fetal, P = postnatal, Kontrolle = Mix aus beiden Testican-2 Isoformen (je 0,1 ng Plasmid DNA).
Anm.: In der Kontrolle sind drei Banden zu sehen. Von oben nach unten sind dies die durch Hybridisierung der unterschiedlichen Fragmente entstandene Heteroduplex Bande, das Exon 2 enthaltende 132 bp (murin) bzw. 135 bp (human) große Fragment, sowie das 123 bp (murin) bzw. 126 bp (human) große Fragment ohne Exon 2.

Mit den Oligonukleotiden Ex 1s (EVE) (komplementär zum *antisense* Strang von Exon 1) und Ex 3a (EVE) (komplementär zum *sense* Strang von Exon 3) wurden Testican-2 spezifische Fragmente amplifiziert, die eine Größe von 132 bp für die murine Sequenz einschließlich Exon 2 (bzw. 135 bp human), und 123 bp für die murine Sequenz ohne Exon 2 (bzw. 126 bp human) aufwiesen. Da sich beide Fragmente nur um neun Basenpaare unterscheiden, wurde ein Mix aus den in Kapitel 2.1.2 hergestellten Plasmiden als Positivkontrolle für eine erfolgreiche Trennung der beiden Fragmente eingesetzt. Bei Vorhandensein zweier verschieden großer Fragmente, die über einen großen Bereich ihrer Sequenz komplementär sind, entsteht üblicherweise eine zusätzliche Bande im Gel, die als Heteroduplex Bande bezeichnet wird. In keinem der analysierten Gewebe konnte das kleinere Fragment (123 bp bzw. 126 bp) oder der Heteroduplex Komplex detektiert werden.

Um die Spezifität der Banden zu überprüfen und das Vorhandensein geringer Mengen des kleineneren Fragments auszuschließen, wurde die DNA auf eine Nylonmembran transferiert und mit für die verschiedenen Isoformen spezifischen und radioaktiv markierten Oligonukleotiden unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

Nach Exposition der Röntgenfilme wurden in den analysierten Geweben nur dann Signale detektiert, wenn mit einem Oligonukleotid hybridisiert wurde, welches die Sequenz von Exon 2 enthält. Das Oligonukleotid welches die Sequenz unmittelbar 5' und 3' von Exon 2, nicht aber das Exon 2 selbst enthielt, markierte ausschließlich die untere Bande und die Heteroduplexbande der Positivkontrolle (nicht gezeigte Ergebnisse). In keinem der analysierten Gewebe und nur in einem humanen EST Klon wurde die Testican-2 Isoform ohne Exon 2 gefunden. Ein alternatives Spleissen, wie es für Testican-1 und -3 zu beobachten ist, findet im Testican-2 Gen nur sehr selten statt.

2.2 Inaktivierung des Testican-2 Gens in der Maus

2.2.1 Allgemeine Strategie

Um die Bedeutung eines bestimmten Proteins *in vivo* zu bestimmen, ist es sinnvoll, dass dazugehörige Gen zu inaktiveren und anschließend den Organismus auf mögliche Veränderungen hin zu analysieren. In dieser Arbeit sollte das Testican-2 Gen der Maus inaktiviert werden (zur Übersicht siehe *Abb. 2.2.1*). Der hierfür verwendete Vektor (*Targeting*-Konstrukt) besteht aus einem Teil des genomischen Testican-2 Lokus, der wenige Basenpaare 3' des codierten Translationsstartpunktes (ATG) im Exon 1 durch eine Selektionskassette unterbrochen ist. Die gewählte Selektionskassette besteht aus einem konstitutiven Promotor, einem Neomycinresistenzgen und einem Polyadenylierungssignal. Nach Elektroporation des *Targeting*-Konstrukts in embryonale Stammzellen (hier ES Zellen aus den Mausstämmen 129/sv bzw. 129/ola, helle Fellfarbe) und Selektion der Zellen mit Neomycin überleben nur die Zellen, die das *Targeting*-Konstrukt integriert haben. Notwendig für die Inaktivierung ist eine homologe Rekombination des Vektors mit dem genomischen Tesitcan-2 Lokus. Der murine Testican-2 Lokus ist für ein Rekombinationsereignis aufgrund seiner Homologie zum *Targeting*-Konstrukt zwar allen anderen Regionen bevorzugt (homologe Rekombination), aufgrund der Größe des Genoms und der unterschiedlich guten Zugängigkeit der DNA, bedingt durch deren Kondensationsgrad, findet in den meisten Fällen trotz allem eine Integration jenseits der gewünschten Position statt (heterologe Rekombination). Mittels geeigneter Restriktionsenzyme und Southern Blot Analyse lassen sich homologe von heterologen Rekombinationen unterscheiden. Gelingt eine homologe Rekombination ist in der Regel nur eines der beiden Allele mutiert. Solche ES Zellen werden in Blastocysten eines anderen Mausstammes (hier C57Bl/6, schwarze Fellfarbe) injiziert. Die entstehenden Tiere besitzen vier genetische Eltern und können durch die Verwendung verschiedener Mausstämme an ihrer gemischten Fellfarbe erkannt werden. Solche Tiere werden als Chimäre bezeichnet. Waren die ES Zellen zum Zeitpunkt der Injektion totipotent, besteht die Möglichkeit, dass sich einige von ihnen zu Vorläuferzellen der Keimzellen entwickeln (Keimbahngängigkeit). Solche Chimäre vererben das mutierte Allel an die Nachkommen und durch geeignete Verpaarungen lassen sich Mäuse züchten, die homozygot für das integrierte *Targeting*-Konstrukt sind (Testican-2 defiziente Mäuse). Diese Tiere sind nicht in der Lage Testican-2 zu produzieren.

Solche Testican-2 defizienten Mäuse sollten mit gesunden Mäusen (Wildtyp) verglichen und mögliche Veränderungen beschrieben werden.

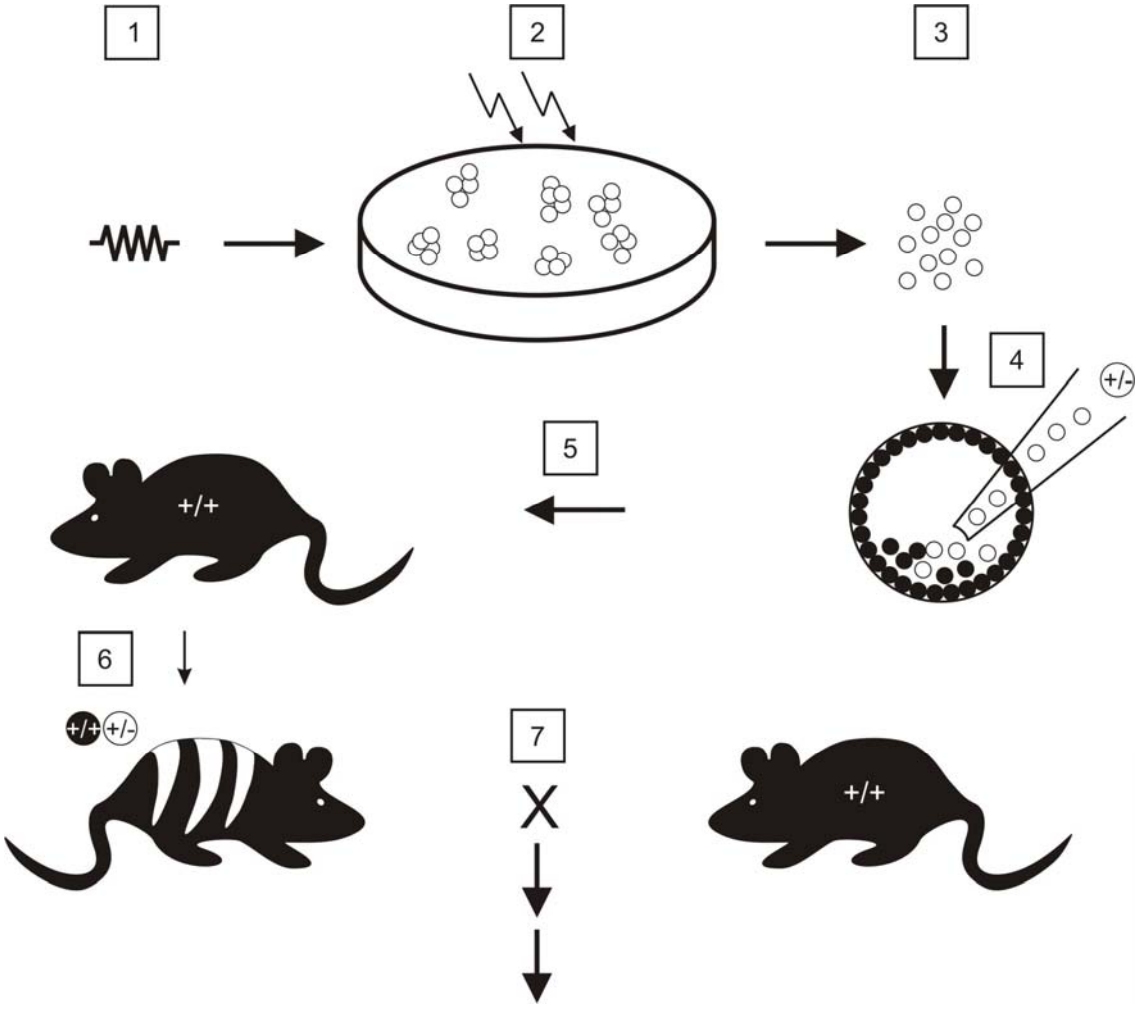


Abb. 2.2.1: **Allgemeine Übersicht zur gewählten *Targeting*-Strategie.**
1) Generierung des *Targeting*-Konstrukts
2) Transfektion des Konstrukts mittels Elektroporation in embryonale Stammzellen der Linie 129/sv bzw. 129/Ola (helle Fellfarbe) und Selektion auf Zellen, die das *Targeting*-Konstrukts integriert haben;
3) Identifizierung von ES-Zell-Klonen mit homologer Rekombination (+/-)
4) Injektion dieser ES Zellen (+/-) in 3,5 Tage alte Blastozysten der Linie C57Bl/6 (schwarze Fellfarbe)
5) Transplantation der Blastozysten in Leihmütter Mäuse
6) Sind die injizierten ES Zellen und die ES Zellen der Wirtsblastozyste an der Entwicklung der Maus beteiligt entstehen Chimäre
7) Verpaarung der Chimären mit Mäusen der Mauslinie C57Bl/6. Die Keimbahngängigkeit der injizierten ES Zellen lässt sich an der gemischten Fellfarbe (braun) der Nachkommen erkennen. → Analyse dieser Nachkommen auf das Rekombinationsereignis (max. 50% heterozygote Mäuse). → Verpaarung heterozygoter Mäuse untereinander und Analyse der Nachkommen (Genotyp nach dem Spaltungsgesetzt von Mendel 1:2:1).
(verändert nach Vorlage der Taconic *Website* (www.taconic.com))

2.2.2 Das *Targeting*-Konstrukt

Wie in der Einleitung erwähnt, wurde der Vektor zur Inaktivierung des Testican-2 Gens in der Maus bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit generiert. Das *Targeting* -Konstrukt ist in einem 9,4 kb großem Bereich dem genomischen Testican-2 Lokus der Maus homolog. Eine mittels Mutagenese eingefügte Not I Restriktionsschnittstelle unmittelbar 3' des ATG diente der Insertion einer Selektionskassette in das Exon 1 (siehe *Abb. 2.2.2*). Diese Selektionskassette setzt sich aus einem konstitutivem Promotor (Phosphoglyceratkinase Promotor), einem Neomycinresistenzgen und einem Polyadenylierungssignal zusammen. Die in *Abb. 2.2.2* angegebenen Restriktions-schnittstellen dienen der Überprüfung der korrekten Integration des 3' Arms. Im Falle einer homologen Rekombination liefert eine Analyse mit dem Restriktionsenzym Sac I nach Southern Blot und Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten externen Sonde (e.S.) ein 5,4 kb großes Fragment (von der Sac I Schnittstelle in der Selektionskassette bis zur Sac I Schnittstelle 3' von Exon 1). Integriert das *Targeting*-Konstrukt heterolog bleibt der Testican-2 Lokus unverändert und es wird ein 8,6 kb großes Fragment detektiert (von der Sac I Schnittstelle 5' von Exon 1 bis zur Sac I Schnittstelle 3' von Exon 1). Die zur Detektion einer homologen Rekombination eingesetzte Sonde muss außerhalb des genomischen Bereichs des *Targeting*-Konstrukts liegen. Nur so ist sichergestellt, dass das detektierte 5,4 kb Fragment auf das mutierte Testican-2 Gen und nicht auf eine heterologen Rekombination fernab des Testian-2 Lokus zurückzuführen ist.

Die korrekte Integration des 5' Arms sollte mittels PCR überprüft werden. Dazu wurden Oligonukleotide aus dem genomischen Bereich des Testican-2 Lokus unmittelbar 5' der Region, welche zum *Targeting*-Konstrukt homolog ist, und Oligonukleotide aus dem Sequenzbereich der Selektionskasette (neo) eingesetzt (siehe *Abb. 2.2.2*). Da die Amplifikation großer Fragmente auf der Basis genomischer DNA nicht leich ist, wurden verschiedene Oligonukleotid Kombinationen eingesetzt. Je nachdem, welche Kombination an Oligonukleotiden verwendet werden, ergeben sich Fragmentgrößen zwischen 7,4 kb (Kombination III/ a) und 9,1 kb (Kombination I/ c).

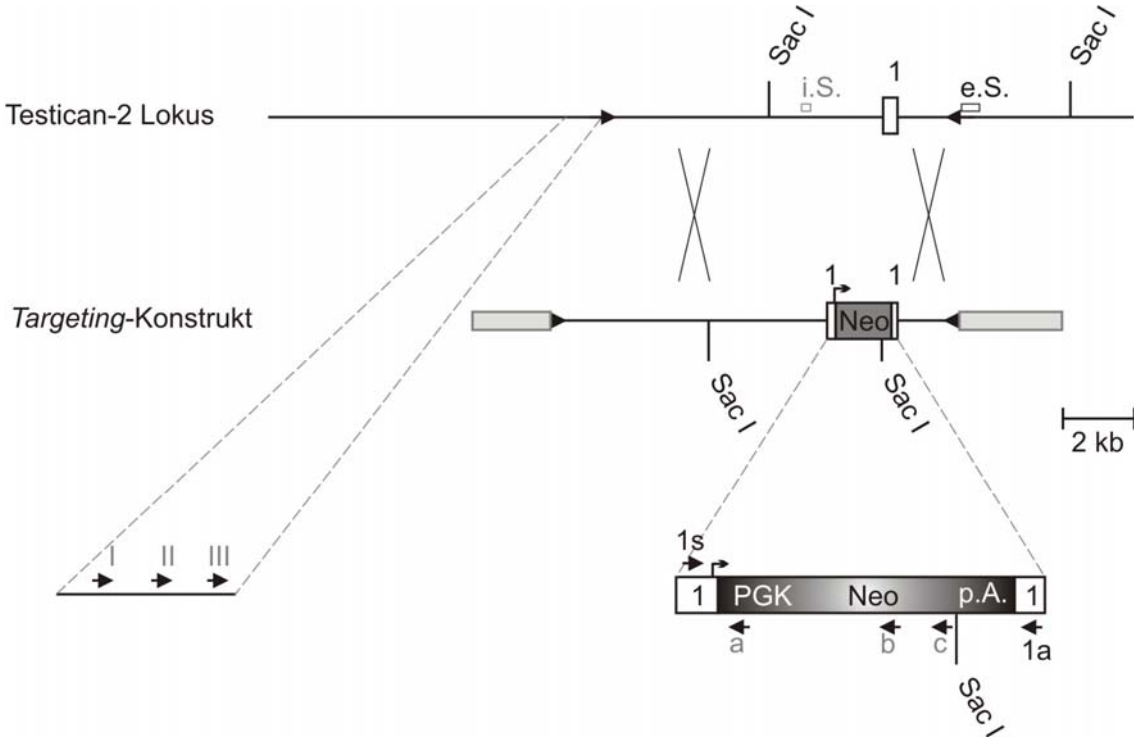


Abb. 2.2.2: ***Targeting*-Konstrukt zur Inaktivierung des Testican-2 Gens in der Maus und Genotypisierungs- Strategie.** Dargestellt ist der genomische Testican-2 Lokus im Bereich des Exon 1 und das zur Inaktivierung generierte *Targeting*-Konstrukt. Die eingezeichneten Restriktionsschnittstellen für Sac I dienen der Genotypisierung der genomischen ES-Zell bzw. Mausschwanz-DNA. 1 = Exon 1; i.S. = Position der interne Sonde, e.S. = Position der externen Sonde, ► = markieren den homologen Bereich zwischen dem genomischen Testican-2 Lokus und dem *Targeting*-Konstrukt (im *Targeting*-Konstrukt exklusive der Selektionskassette), ┌► = ATG. Die das *Targeting*-Konstrukt flankierenden hellgrauen Boxen repräsentieren Cosmid bzw Plasmid DNA (bedingt durch die gewählte Klonierungsstrategie)
Im unteren Teil der Abbildung ist eine vergrößerte (5 x) Darstellung eines 1kb großen Bereiches direkt 5' des zum *Targeting*-Konstrukt homologen Bereiches und der Selektionskassette (Neo) dargestellt. I, II, III, a, b und c markieren die Position der zur Bestimmung eines korrekten Integrationsereignisses des 5' Arms verwendeten Oligonukleotide.
Die Oligonukleotide 1s und 1a, sowie b wurden zur Genotypisierung von Mausschwanz-DNA mittels PCR eingesetztt. PGK = Phosphoglyceratkinase Promotor, Neo = Neomycinresistenz-gen, p.A. = Polyadenylierungssignal

2.2.3 Herstellung und Genotypisierung rekombinanter ES-Zell-Klone

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene ES Zelllinien eingesetzt. Die zuerst eingesetzte ES Zelllinie R1 (Mausstamm 129/sv) besitzt eine niedrigere Passagen-nummer (weniger Teilungszyklen) als die ES Zelllinie IB10 (Mausstamm 129/Ola), und da niedrigere Passagennummer generell eine bessere Keimbahngängigkeit ver-sprechen, wurde zunächst versucht, das Testican-2 Gen in diesen Zellen zu inaktivieren. Nach Linearisierung des *Targeting*-Konstrukts wurden 30 µg mittels Elektroporation in ES Zellen transfiziert. Nach sieben bis neuntägiger Selektion in Geneticin-haltigem Kulturmedium wurden in zwei Experimenten insgesamt 705 resistente Klone isoliert. Diese wurden auf 24 Loch Platten expandiert und

anschließend zwei Drittel der Zellen eines jeden Klons bei -80°C eingefroren. Das verbleibende Drittel wurde zur Gewinnung genomischer DNA erneut expandiert. Nach Präparation der genomischen DNA wurden die Klone genotypisiert. Dazu wurde die genomische DNA mit dem Enzym Sac I gespalten und nach elektrophoretischer Auftrennung und Transfer auf eine Nitrocellulosemembran mit der radioaktiv markierten externen Sonde (siehe *Abb. 2.2.2*) auf eine homologe Rekombination analysiert. Keiner der 705 Klone zeigte eine homologe Rekombination (nicht gezeigte Ergebnisse). In unserer Arbeitsgruppe wurden bisher zwei erfolgreiche Gen-inaktivierungen in ES Zellen der IB10 Zelllinie durchgeführt. Daher wurden diese für einen dritten Versuch ausgewählt. Unter den insgesamt 248 Klonen waren sechs ES-Zell-Klone (112, 135, 143, 152, 199 und 225), in denen das *Targeting*-Konstrukt über homologe Rekombination integriert war (siehe *Abb. 2.2.3* A).

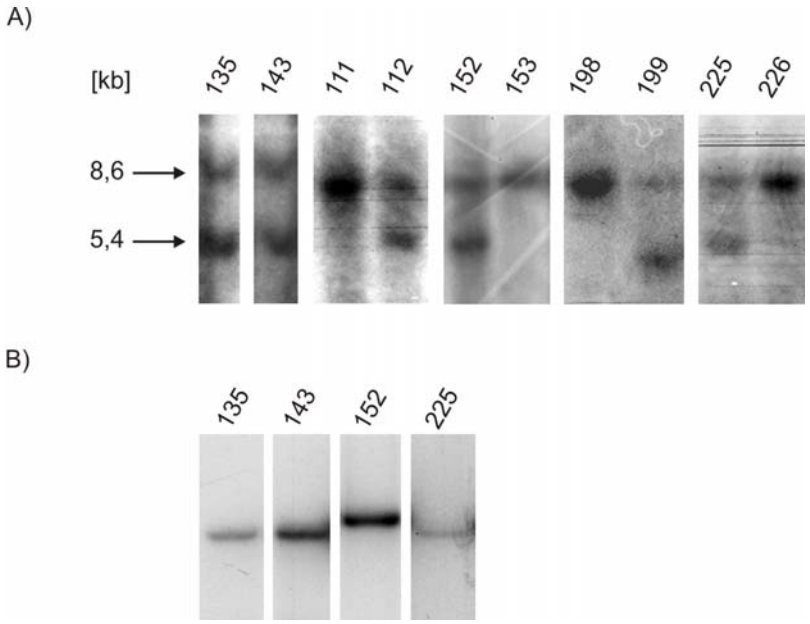


Abb. 2.2.3: **Genotypisierung verschiedener ES-Zell-Klone mittels Southern Blot und PCR.**
A) Identifizierung von ES Zellen mit mutiertem Testican-2 Allel (korrekte Integration des 3' Arms). Restriktionsspaltung der genomischen DNA mit Sac I und anschließender Southern Blot Analyse mit der externen Sonde. Das 8,6 kb große Fragment repräsentiert das Wildtyp Allel, das 5,4 kb große Fragment das mutierte Allel (siehe auch Abb. 2.2.2). In der Abbildung ist das Autoradiogramm der Analyse abgebildet.
B) Überprüfung der korrekten Integration des 5' Arms mittels PCR. Die ausgewählten Fragmente für den Klon 135, 143 und 225 wurden mit der Oligonukleotid Kombination III/b amplifiziert und entsprechen einer Größe von 8,4 kb, das Fragment für den Klon 152 wurde mit der Oligonukleotid Kombination I/c amplifiziert und entspricht einer Größe von 9,1 kb (Positionen der Oligonukleotide sind der Abb. 2.2.2 zu entnehmen). Für die Klone 112 und 199 konnte mit keiner der Oligonukleotid Kombinationen ein Produkt amplifiziert werden. Nach Trennung der Fragmente auf einem 0,8% Agarosegel wurde eine Southern Blot Analyse mit der internen Sonde durchgeführt (siehe Abb. 2.2.2). In der Abbildung ist das Autoradiogramm der Analyse abgebildet.

Die Überprüfung der korrekten Integration des 5' Armes des *Targeting*-Konstrukts mittels PCR lieferte für die ES-Zell-Klone 112 und 199 keine Fragmente. Für die anderen vier ES-Zell-Klone war es möglich, die zu erwartenden Fragmente zu amplifizieren. Nach Auftrennung in einem Agarosegel und Transfer der DNA auf eine Nitrocellulosemembran wurde die Membran mit der radioaktiv markierten internen Sonde hybridisiert (siehe *Abb. 2.2.3* B). Alle amplifizierten Fragmente hybridisierten mit der internen Sonde, was eine korrekte Integration des 5' Armes belegt.

2.2.4 Etablierung Testican-2 defizienter Mäuse

Die ES-Zell-Klone 135 und 143 wurden zur Herstellung chimärer Mäuse in Blastozysten des Mausstamms C57Bl/6 injiziert. Die Blastozysten wurden am Tag 3,5 post coitum (p.c.) aus den Uteri schwangerer Mäuse isoliert. In jede Blastozyste wurden 10-15 ES Zellen injiziert und nach Regeneration (1-2 h bei 37 °C) wurden 5-10 dieser Blastozysten ins Uterushorn von Leihmütter Mäusen (Tag 2,5 p.c.) implantiert. Die Leihmütter Mäuse stammen aus einem in unserem Institut etablierter Mischstamm aus BALB/c und C57Bl/6 Mäusen. Präparation der Blastozysten, Mikroinjektion der ES Zellen und der Blastozystentransfer wurden von Dr. Neil Smyth und Herrn Wieslaw Krzyzak (Zentrum für Molekulare Medizin Köln, ZMMK) durchgeführt.

Die aus diesen Blastozysten hervorgehenden chimären Mäuse besitzen vier genetische Eltern. Da die manipulierten ES Zellen aus dem Mausstamm 129/Ola hervorgegangen sind, welcher homozygot für das Agouti Gen ist (AA, helle Fellfarbe) und die Blastozysten selbst von Mäusen der Linie C57Bl/6 abstammen (aa, schwarze Fellfarbe), lassen sich die chimären Mäuse an ihrer gemischten Fellfarbe erkennen. Zur Überprüfung der Keimbahngängikeit der injizierten ES Zellen wurden männliche Chimäre mit Weibchen der C57Bl/6 Linie verpaart. Besitzen die Nachkommen eine braune Fellfarbe müssen sie heterozygot für das Agouti Gen sein, was eine Keimbahngängikeit der injizierten ES-Zell-Klone beweist. Statistisch sind 50% der Mäuse mit brauner Fellfarbe für das mutierte Testican-2 Allel heterozygot. Von den injizierten Klonen 135 und 143 waren nur die vom ES-Zell-Klon 135 abstammenden ES Zellen keimbahngängig. Die aus diesem ES Zellen hervorgehende Testican-2 defiziente Mauslinie wurde als T2-135 bezeichnet. Um einen einheitlichen genetischen Hintergrund zu erzeugen, wurde diese Linie bisher insgesamt sechs Mal mit C57Bl/6 Mäusen verpaart. Üblicherweise wurden dafür T2-135 heterozygote Männchen mit C57Bl/6 Wildtyp Weibchen verpaart. Da die manipulierten ES Zellen von einer männlichen Maus abstammen, aber auch das Y Chromosom der Mäuse vom C57Bl/6 Hintergrund stammen sollte, wurden einmal (bei der vierten Rückkreuzung) C57Bl/6 Wildtyp Männchen mit T2-135 heterozygoten Weibchen verpaart.

2.2.5 Genotypisierung von Mausschwanz DNA

Die genomischen DNA wurde aus Mausschwanz Biopsien 3-4 Wochen alter Mäuse präpariert. Analog der Genotypisierung der ES-Zell-DNA lässt sich das mutierte Allel vom Wildtyp Allel nach Restriktionsspaltung mit dem Enzym Sac I, anschließendem Southern Blot und Hybridisierung mit der radioaktiv markierten externen Sonde unterscheiden (siehe Abb. 2.2.5 A).

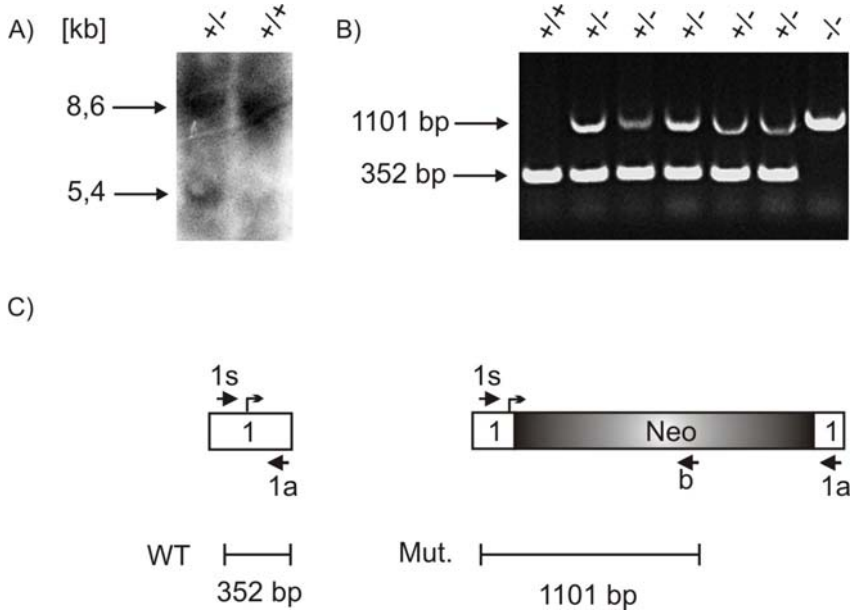


Abb. 2.2.5: **Genotypisierung von Mausschwanz DNA der Linie T2-135.**
A) Restriktionsspaltung der genomischen Mausschwanz DNA mit Sac I und anschließender Southern Blot Analyse mit der externen Sonde. Das 8,6 kb große Fragment repräsentiert das Wildtyp Allel, das 5,4 kb große Fragment das mutierte Allel (siehe auch Abb. 2.2.2 und 2.2.3). +/+ = homozygot für das Wildtyp Allel; +/- = heterozygot für das Wildtyp und das mutiertes Allel. In der Abbildung ist das Autoradiogramm der Analyse abgebildet.
B) Genotypisierung der Mausschwanz DNA mittels PCR. Elektrophoretische Auftrennung der PCR Produkte in einem 1% Agarosegel.
C) Schematische Darstellung des intakten Exon 1 (Wildtyp) bzw. des mutierten Exon 1 einschließlich der Position der für die PCR verwendeten Oligonukleotide und der daraus resultierenden Fragmentgrößen. 1 = Exon 1; 1s, 1a und b markieren die Position der verwendeten Oligonukleotide. WT = Wildtyp Fragment; Mut. = mutierte Fragment; Neo = Selektionskassette

Der Genotyp der Mäuse ist entweder homozygot für das Wildtyp Allel (+/+), heterozygot für das Wildtyp und das mutierte Allel (+/-) oder homozygot für das mutierte Allel (-/-). Der Nachteil einer Genotypisierung mittels Restriktionsspaltung, Southern Blot Analyse, Hybridisierung mit der externer Sonde und Exponierung der Röntgenfilme besteht darin, dass sie normalerweise zwischen sechs und sieben Tagen dauert und zudem eine vergleichsweise große Menge an DNA benötigt (bei 3-4 Wochen alten Mäusen etwa 30% von der Gesamtmenge) wird. Dies kann bei der

Analyse sehr junger Mäuse problematisch werden. Aus diesen Gründen wurde eine Genotypisierung mittels PCR etabliert. Die PCR wurde mit drei Oligonukleotiden pro Ansatz durchgeführt (siehe *Abb. 2.2.5 C*). Im Wildtyp Allel ergibt sich ein Fragment von 352 bp Größe und im mutierten Allel ein Fragment von 1101 bp Größe (siehe Abb. 2.2.5 B).

2.2.6 Nachweis der Testican-2 Defizienz auf RNA und Protein Ebene

Aus der Genotypisierung der ES Zell- und Mausschwanz DNA ist ersichtlich, dass im genomischen Testican-2 Lokus das intakte Wildtyp Gen durch das *Targeting*-Konstrukt ersetzt wurde. Dies ist aber noch kein Beweis für das Fehlen von Testican-2 spezifischer mRNA oder der Abwesenheit des Proteins. Zur Feststellung der Abwesenheit von Testian-2 mRNA wurden Northern Blot und RT-PCR Analysen durchgeführt. Das Fehlen von Testican-2 Protein sollte mittels Immunpräzipitation bewiesen werden.

Für die Northern Blot Analyse wurden je 2 µg Poly(A)$^+$ RNA aus dem Gehirn einer 25 Tage alten Wildtyp Maus (+/+) und eines gleichgeschlechtlichen Geschwistertieres ohne intakte Testican-2 Genkopie (-/-) auf einem denaturierendem Agarosegel elektrophoretisch getrennt. In *Abb. 2.2.6 A* (linkes Bild) ist zu sehen, dass etwa gleiche Mengen an mRNA aufgetragen wurden. Anschließend wurde die mRNA auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit einer radioaktiv markierten Testican-2 cDNA Sonde hybridisiert. Die Sonde markierte in der Wildtyp Kontrolle ein Transkript von 4 kb Größe, aber keines in der Spur, welche die mRNA des Geschwistertiers ohne intakte Genkopie enthält (siehe *Abb. 2.2.6 A*). Um selbst geringe Mengen von Testican-2 mRNA auszuschließen wurde mit der gesamt RNA aus dem Gehirn eines zweiten Geschwisterpaares (+/+, -/-) eine RT-PCR Reaktion durchgeführt. Mit den Oligonukleotiden Ex 1s (komplementär zu Exon 1) und Ex 10a (komplementär zu Exon 10), wurde ein Testican-2 spezifisches Fragment mit einer Größe von 1284 Basenpaaren amplifiziert. Wie in *Abb. 2.2.6 B* zu sehen ist, wurde dieses Fragment nur in der Wildtyp Maus amplifiziert. Weder RT-PCR noch Northern Blot Analysen detektierten Testican-2 spezifische mRNA in Mäusen ohne intakte Genkopie.

Aus Vorversuchen mittels Western Blot Analyse war bekannt, dass die Expression von Testican-2 im Gehirn gering ist (nicht gezeigte Ergebnisse). Um Testican-2 zu detektieren, sollte die sensitivere Methode der Immunpräzipitation gefolgt von Western Blot Analyse eingesetzt werden. Die Western Blot Analyse zeigte Testican-2 spezifische Banden nur für den Gewebeextrakt aus der Wildtyp Maus. Der oberen polydispersen Bande zwischen 70 und 110 kDa lässt sich die Proteoglykan

Form von Testican-2 zuordnen, bei der unteren polydispersen Bande zwischen 35 und 50 kDa handelt es sich vermutlich um das degradierte Proteoglykan. Die zwei apparenten Banden zwischen 40 und 45 kDa stellen vermutlich das nicht mit GAG Ketten komplexierte Testican-2 oder ebenfalls Abbauprodukte dar. Ein solches Bandenmuster ist aus Untersuchungen zur endogenen Expression von Testican-2 bekannt (Schnepp et al., 2005). Die in beiden Spuren vorhandene Bande bei ca. 50 kDa entspricht der vom Sekundärantikörper (Kaninchen IgG Antikörper aus dem Schwein) erkannten schweren Kette des zur Immunpräzipitation eingesetzten Antikörpers (affinitätsgereinigter Testican-2 Antikörper aus Kaninchen, siehe *Abb. 2.2.6 C*). Mit einer Tubulin Kontrolle wurde sichergestellt, dass in den beiden Gewebeextrakten etwa gleiche Mengen an Protein vorlagen.

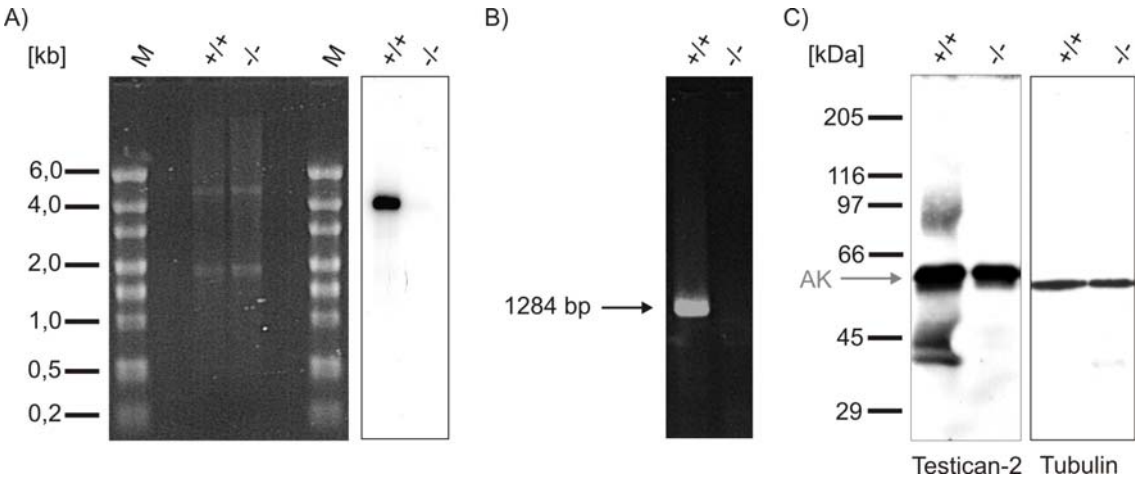


Abb. 2.2.6: **Nachweis einer tatsächlichen Testican-2 Defizienz auf RNA und Protein Ebene.**
A) Northern Blot: Analyse von 2 µg mRNA aus murinem Gehirngewebe 25 Tage alter Geschwistertiere. Linkes Bild: Elektrophoretische Auftrennung der RNA in einem denaturierenden Agarosegel (1,2%). Rechtes Bild: Hybridisierung des Northern Blots mit einer radioaktiv markierten Testican-2 cDNA. Es ist das Autoradiogramm der Analyse abgebildet. Belichtungzeit = 24 Stunden
B) RT-PCR auf RNA aus murinem Gehirngewebe mit Oligonukleotiden aus dem Bereich von Exon 1 und Exon 10 und elektrophoretische Auftrennung auf einem 1% Agarosegel.
C) Immunpräzipitation von Testican-2 aus Gehirnextrakten von adulten Wildtyp und Testican-2 defizienten Mäusen mit dem *rabbit-α-mouse* Testican-2 Antikörper. Der für die Immunpräzipitation verwendete Antikörper ist mit dem Erstantikörper in der Western Blot Analyse identisch. Bei den ca. 50 kDa großen Banden handelt es sich die schwere Kette (AK) des Testican-2 Antikörpers aus Kaninchen. Die Tubulin Kontrolle zeigt, dass in etwa gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden. Die Trennung der Proteine erfolgte in einem 4-15% SDS Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen.

2.2.7 Makroskopische Analyse Testican-2 defizienter Mäuse

Die in Kapitel 2.2.4 beschriebene Rückkreuzung (es wurden über sechs Generationen hetrozygote (+/-) Mäuse mit Wildtyp Mäusen der Linie C57Bl/6 verpaart) auf einen einheitlichen genetischen Hintergrund dauerte 1 Jahr und die sechste Rückkrezung

wurde vor kurzem beendet. Die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Untersuchungen wurden mit Mäusen durchgeführt, die noch nicht auf einen reinen genetischen Hintergrund zurückgekreuzt waren. Das Erbgut dieser Mäuse setzt sich somit aus dem Genom der Mauslinien C57Bl/6 und 129/Ola zusammen.

Kreuzungen zwischen heterozygoten Mäusen (+/-) führten zu 19 Würfen mit insgesamt 119 Nachkommen. Bei Kreuzungen zwischen heterozygoten Tieren gilt das Mendelsche Spaltungsgesetz und für den Genotyp der Nachkommen das Verteilungsverhältnis von 1 : 2 : 1 (+/+ : +/- : -/-). Die experimentell ermittelte Verteilung von 27 : 59 : 33 stimmt mit der zu erwartenden Verteilung von 30 : 60 : 30 nahezu überein. Nur zwei Mäuse starben innerhalb der ersten acht Wochen (je ein Wildtyp und Testican-2 defizientes Tier, fast alle heterozygoten Mäuse wurden in der Regel kurz nach der Genotypisierung getötet). Die zu erwartende Lebensdauer einer Zuchtmaus beträgt 1,5 Jahre. Im Oktober 2005 waren die fünf ältesten noch in der Zucht befindlichen Testican-2 defizienten Mäuse 1 Jahr alt. Testican-2 defiziente Mäuse sind folglich lebensfähig und zeigen keine reduzierte oder zumindest nicht signifikant reduzierte Lebenserwartung. Körpergewicht und –form waren bei allen Mäusen übereinstimmend. Es waren keine mit bloßem Auge erkennbaren Veränderungen von Testican-2 defizienten Mäusen gegenüber Wildtyp Tieren festzustellen. Verpaarungen von Testican-2 defizienten Mäusen (-/-) zeigten jedoch im Vergleich zur Verpaarung heterozygoter Mäuse (+/-) eine verminderte Fertilität. Die Auswertung mit Hilfe eines t-Tests für unabhängige Stichproben ergab (α = 0,05), dass der Unterschied signifikant ist (von Anja Niehoff, Sporthochschule Köln mit dem SPSS 12 für Windows (SPSS Inc. Chicago) durchgeführt). Die Anzahl an Mäusen innerhalb eines Wurfs war im statistischen Mittel um 35% reduziert (siehe Tab. 2.2.7).

(+/- x +/-) [n = 19]	**(-/- x -/-)** [n = 17]	**(-/- x +/+)** [n = 4]	**(+/+ x -/-)** [n = 4]
6,3 ± 0,5	4,1 ± 0,7	6,0 ± 1,8	6,8 ± 1,3

Tab. 2.2.7: **Vergleich der Anzahl an Mäusen innerhalb eines Wurfs aus Verpaarungen von heterozygoten und Testican-2 defizienten Mäusen.** Bei den angegebenen Verpaarungen steht der Genotyp des Weibchens immer links, der des Männchens immer rechts. Angegeben sind durchschnittliche Anzahl der Mäuse innerhalb eines Wurfs und der Standardfehler des Mittelwertes. n = Anzahl der Würfe

Kreuzungen von Testican-2 defizienten Männchen mit Wildtyp Weibchen führte in vier Verpaarungen zu Würfen von 3, 7, 8 und 9 Mäusen. Bei der Verpaarung von Wildtyp Männchen mit Testican-2 defizienten Weibchen zu Würfen von 1, 6, 8 und 9 Mäusen. Der Standardfehler des Mittelwertes ist bei nur vier Würfen groß (siehe Tab. 2.2.7). Die erkennbare Tendenz in diesen Verpaarungen hin zu den ermittelten Durchschnitts-

werten für die Verpaarung von heterozygoten Mäusen lässt aber vermuten, dass die Fertilität nur dann beeinträchtigt ist, wenn beide Elterntiere eine Testican-2 Defizienz aufweisen.

2.2.8 Morphologische und histologische Untersuchungen Testian-2 defizienter Mäuse

Für die morphologischen und histologischen Untersuchungen wurden ausschließlich gleichgeschlechtliche Geschwistertiere desselben Wurfs eingesetzt. Alle Tiere waren zum Zeitpunkt der Untersuchung acht Wochen alt.

Testican-2 defiziente Mäuse wurden zunächst auf makroskopische Veränderungen der inneren Organe untersucht. Von besonderem Interesse waren Gewebe, in denen während der Entwicklung und auch nach der Geburt Testican-2 exprimiert wird. Dazu gehören u.a. Herz, Gehirn, Lunge, Testis und die Nebenniere (Schnepp et al., 2005). Alle untersuchten Gewebe waren in ihrer Morphologie nicht von Wildtypgeweben zu unterscheiden. Um mögliche Veränderungen in Geweben Testican-2 defizienter Mäuse sichtbar zu machen, wurden Paraffinschnitte hergestellt, da diese in der Regel eine bessere Morphlogie der Organe garantieren. Empfindliche Strukturen werden durch die Kombination aus Paraformaldehyd (PFA) Fixierung und Paraffineinbettung jedoch zerstört. War dies der Fall, wurden zusätzlich Gefrierschnitte angefertigt. Strukturelle Unterschiede sollten mittels Hämatoxylin-Eosin (HE) oder Kresylechtviolett Färbungen (Gehirn) kenntlich gemacht werden. Zur Bestimmung einer Varianz in der Ausprägung eines Phänotyps in Testican-2 defizienten Mäusen wurden immer mindestens drei Paare von Geschwistertieren miteinander verglichen.

Histologische Untersuchungen von Testikeln:
Aus immunhistologischen Vorarbeiten war bekannt, dass Testican-2 in Testikeln mit Basalmembranen assoziiert. Kleinere Mengen des Proteins wurden in den Hodenkanälen detektiert und lassen sich entweder den Sertoli Zellen, den Spermatiden oder den Spermien zuordnen (Schnepp et al., 2005). In Paraffinschnitten von Testikeln sind alle Strukturen außerhalb der Hodenkanäle zerstört. Aus diesem Grund wurden zusätzlich Gefrierschnitte angefertigt. Die Auswertung der Bilder zeigte keine Unterschiede zwischen Testikeln von Wildtyp und Testican-2 defizienten Mäusen. Die Anzahl an Spermatogonien und Spermien scheint nicht signifikant verschieden (siehe *Abb. 2.2.8.1*). Verpaarungen von Testican-2 defizienten Männchen mit Wildtyp

Weibchen (siehe *Tab. 2.2.7*) lassen eine unbeeinträchtigte Fertilität vermuten und bestätigen damit dieses Ergebnis.

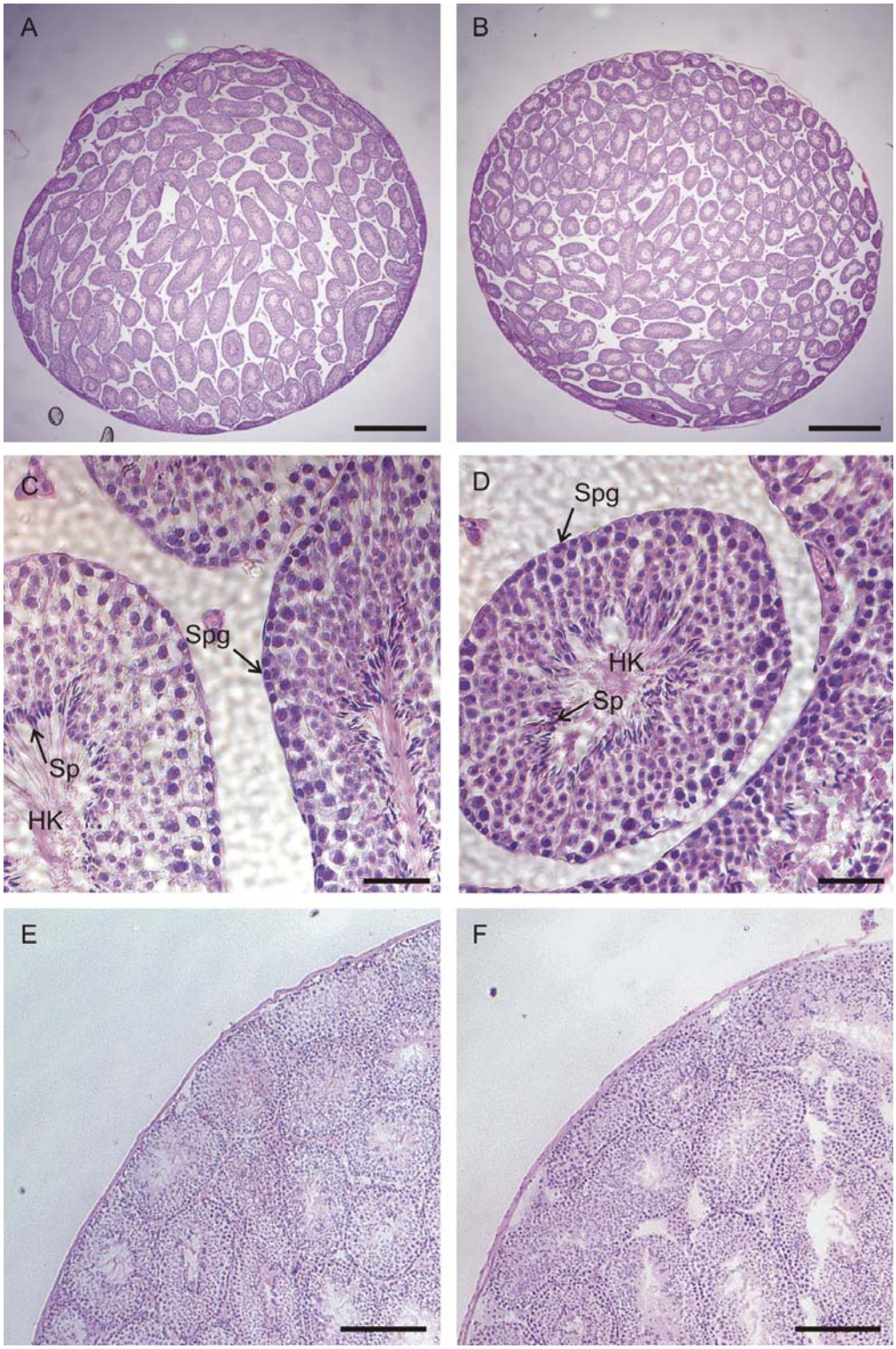


Abb. 2.2.8.1: **Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbungen von Testis Schnitten.**
Paraffin- (A-D) und Gefrierschnitte (E,F) von Testis einer Wildtyp (A,C,E) und einer Testican-2 defizienten Maus (B,D,F) in verschiedenen Vergrößerungen. HK = Hodenkanal, Spg = Spermatogonien, Sp = Spermien,. (A,B): Maßstab = 1 mm, (C,D): Maßstab = 25 µm, (E,F): Maßstab = 250 µm

Histologische Untersuchungen von Pankreas und Nebenniere:

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zur Expression von Testican-2 zeigten starke Signale in den endokrinen Anteilen von Pankreas und Nebenniere. In der Nebenniere sind die Signale auf die Medulla beschränkt. Im Pankreas finden sich Testican-2 spezifische Signale in den Langerhans Inseln. Immunhistologische Schnitte zeigen eine zelluläre Färbung und ein Vergleich mit HE gefärbten Schnitten lässt vermuten, dass neben den Insulin produzierenden β-Zellen auch die mehr an der Peripherie lokalisierten Glukagon produzierenden α-Zellen detektiert werden (Schnepp et al., 2005). In den Pankreas Schnitten war kein histologischer Unterschied zwischen Testican-2 defizienten Mäusen und vergleichbaren Wildtyp Mäusen zu erkennen (siehe *Abb. 2.2.8.2*, A-D). Die Medulla in Nebennieren Testican-2 defizienter Mäuse war in ihrer Histologie ebenfalls nicht von der aus Wildtyptieren zu unterscheiden (siehe *Abb. 2.2.8.2, E-H*).

Histologische Untersuchungen des Gehirns:

Testican-2 Transkripte konnten in fast allen Gehirnregionen detektiert werden (Vannahme et al., 1999). Untersuchungen mit affiniätsgereinigten Antikörpern zeigen eine vergleichbare Verteilung für das Testican-2 Protein (Schnepp et al., 2005). Übereinstimmend zeigen beide Methoden starke Signale im Hippocampus und in den Purkinje Zellen des Cerebellums. Die Gewebeschnitte wurden diesmal mit Kresylechtviolett gefärbt. Weder im Cerebellum noch im Hippocampus konnten signifikante Veränderungen festgestellt werden (siehe *Abb. 2.2.8.3*).

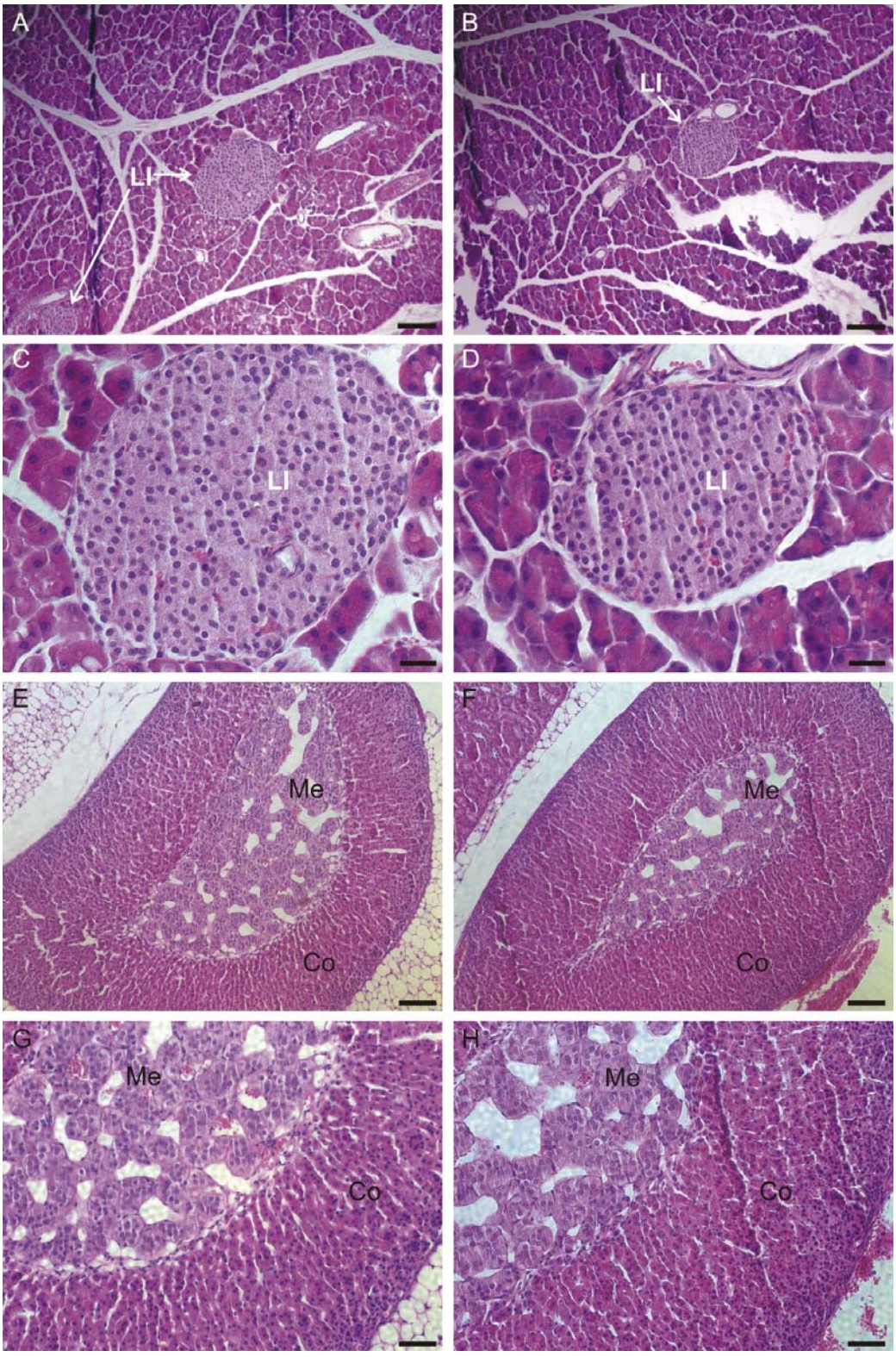


Abb. 2.2.8.2: **Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbungen von Pankreas und Nebennieren Schnitten.**
A-D: Histologische Paraffinschnitte je einer Pankreas aus einer adulten Wildtyp (A,C) und einer Testican-2 defizienten Maus (B,D) in verschiedenen Vergrößerungen. LI = Langerhans Insel
E-G: Histologische Paraffinschnitte je einer Nebenniere aus einer adulten Wildtyp (E,G) und einer Testican-2 defizienten Maus (F,H) in verschiedenen Vergrößerungen. Me = Medulla, Co = Cortex (A,B,E,F): Maßstab = 100 µm, (C,D): Maßstab = 25 µm, (G,H): Maßstab = 50 µm

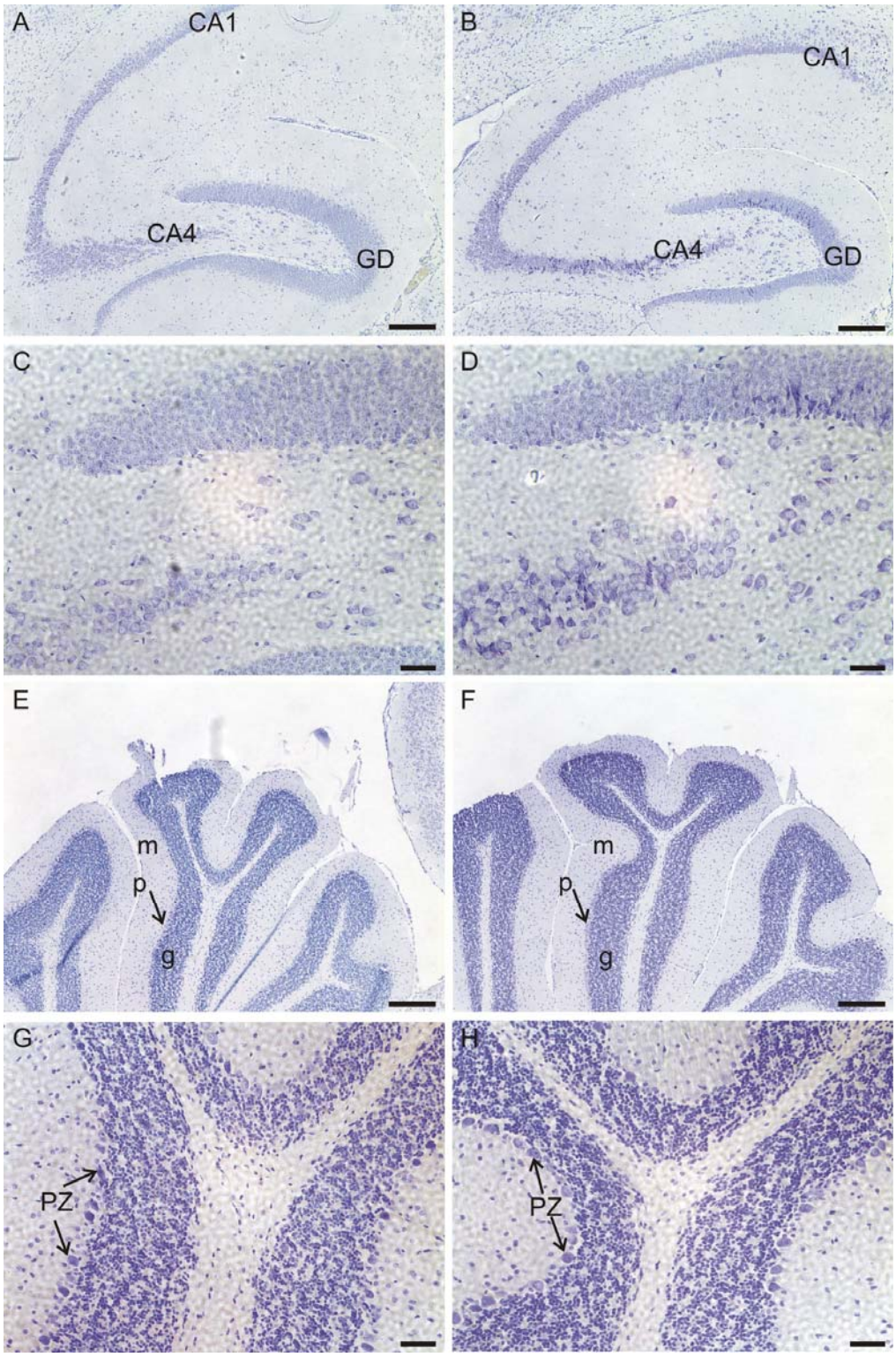


Abb. 2.2.8.3: **Kresylechtviolettfärbungen von Hippocampus und Cerebellum.**
A-D: Hippocampus einer adulten Wildtyp (A,C) und einer Testican-2 defizienten Maus (B,D) in verschiedenen Vergrößerungen. CA1/CA4 = zwei der vier Hippocampusfelder (CA1-CA4), GD = Gyrus dentatus.
E-G: Cerebellum einer Wildtyp (E,G) und einer Testican-2 defizienten Maus (F,H) in ver_ schiedenen Vergrößerungen. m = Molekularzellschicht, p = Purkinje Zellschicht, g = Granulärzellschicht, PZ = einzelne Purkinjezellen. (A,B,E,F): Balken = 250 µm, (C,D,G,H): Balken = 50 µm

Histologische Untersuchungen des Herzens:

Das Herz-Kreislauf-System versorgt den Organismus bereits in frühen Phasen der Entwicklung mit Nährstoffen und transportiert schädliche Abfallprodukte aus dem Stoffwechsel ab. Das Herz ist deshalb für die Entwicklung der Organe von entscheidender Bedeutung. Seine Entwicklung beginnt am Embryonaltag 8,5 (E 8,5). Einen Tag später (E 9,5) ist Testican-2 zum ersten Mal in der Herzanlage nachweisbar. Immunhistochemische Untersuchungen zeigen eine zellassoziierte Färbung des Herzmyokards, die während der gesamten Embryonalentwicklung hindurch aufrecht erhalten bleibt (Anke Schnepp, Dissertation). Hier sollte daher mittels HE Färbungen die Histologie von Herzen aus Wildtyp und Testican-2 defizienten Mäusen verglichen werden. Für eine bessere Übersicht wurden zunächst Sagittalschnitte angefertigt. Beide Herz Ventrikel aus Testican-2 defizienten Mäusen waren im Vergleich zu den Ventrikeln aus Wildtyp Tieren vergrößert (siehe *Abb. 2.2.8.4.1*). Zudem wirkte die den linken Ventrikel umschließende Herzwand im Vergleich dünner. Um auszuschließen, dass die vergrößerten Ventrikel auf eine unterschiedliche Schnittebene zurückzuführen sind oder es sich lediglich um einen individuell bedingten Unterschied handelt, wurden drei weitere Geschwisterpaare untersucht. Um die Schnitte besser vergleichen zu können, wurden diesmal Horizontalschnitte angefertigt. Da keiner der am Mikrotom erzeugten Schnitte verworfen wurde, war es möglich, histologische Schnitte aus nahezu identischen Regionen des Herzens miteinander zu vergleichen. Die in den Sagittalschnitten beobachteten Veränderungen waren auch in den Horizontalschnitten zu erkennen (siehe *Abb. 2.2.8.4. 1* C-F). Das Ausmaß der Vergrößerung ist in Herzen verschiedener Mäuse aber sehr unterschiedlich. Die den linken Ventrikel umschließende Herzwand ist in beiden abgebildeten Testican-2 defizienten Herzen um etwa 40% reduziert (*Abb. 2.2.8.4.1* D und F). Dagegen ist der rechte Ventrikel in *Abb. 2.2.8.4.1* D von dem des Wildtyp nicht zu unterscheiden, während der rechte Ventrikel des anderen Tieres stark vergrößert ist. Die den rechten Ventrikel umgebende Herzwand misst an ihrer dünnsten Stelle nur noch etwa 100 µm. Die Dicke des Myokards, welches die Ventrikel voneinander trennt ist in Testican-2 defizienten Mäusen hingegen unverändert.

Es muss an dieser Stelle gesagt werden, dass die Dicke der Herzwände abhängig von der Herzphase ist. Während der Ausstoßphase (Systole) ist die Herzwand dicker als während der Füllungsphase (Diastole). Es kann nicht ganz ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Veränderungen der linken Ventrikelwand darauf zurückzuführen sind. Der stark vergrößerte rechte Ventrikel in *Abb. 2.2.8.4.1* F, ist aber sicher auf andere Ursachen zurückzuführen.

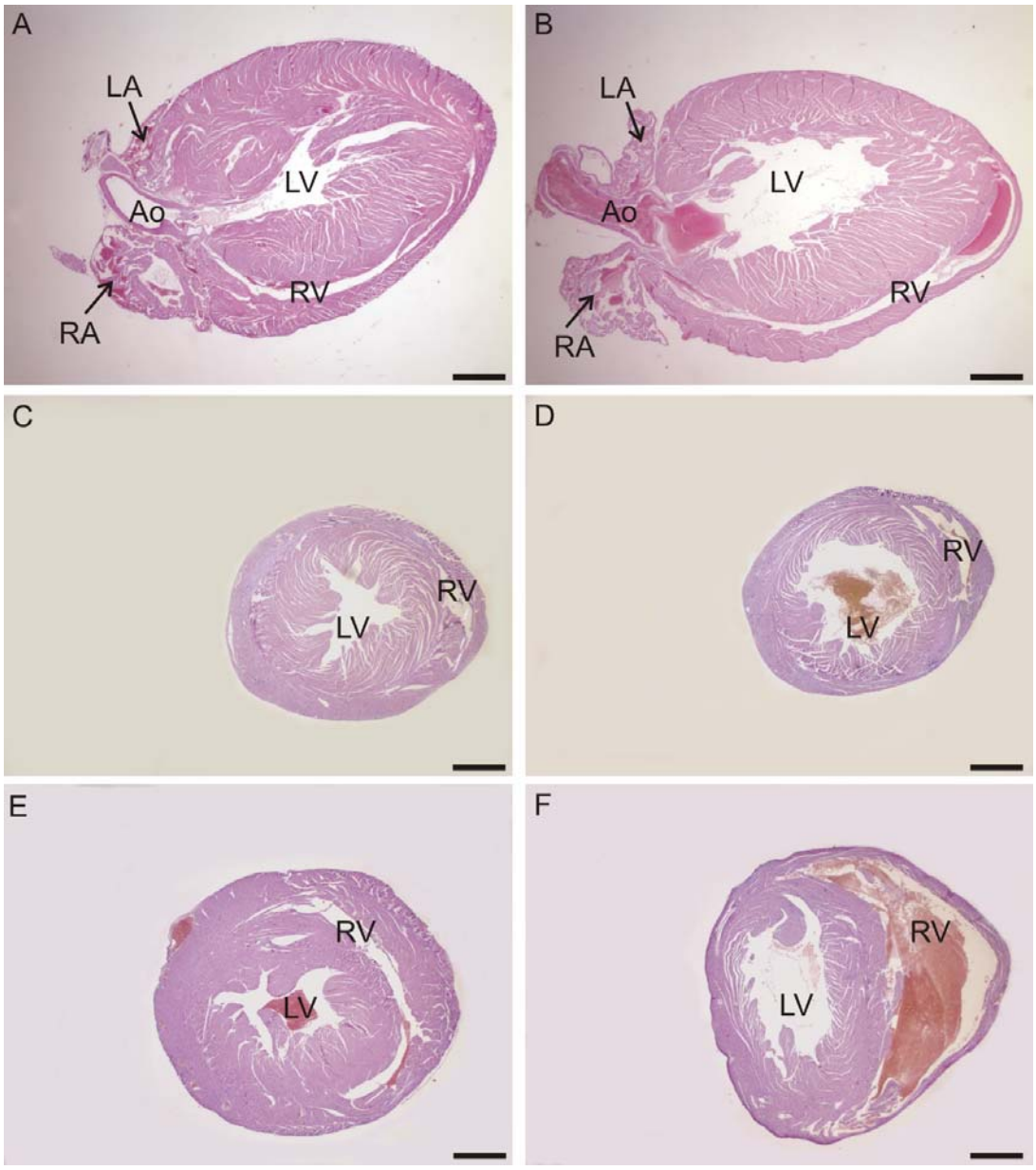


Abb. 2.2.8.4.1: **Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbungen des Herzens.**
A-F: Histologische Schnitte von Mäuseherzen aus Wildtyp (A,C,E) und Testican-2 defizienten Mäusen (B,D,F). Dargestellt sind Schnitte von insgesamt drei Geschwisterparen (A,B, C,D und E,F). Ao = Aorta, LA = linkes Atrium, LV = linker Ventrikel, RA = rechtes Atrium, RV = rechter Ventrikel, Maßstab = 1 mm, . A/B: Sagittal Schnitte, C-F: Horizontalschnitte

Das diesen Beobachtungen entsprechende Krankheitsbild wird als dilatierte Kardiomyopathie bezeichnet (*dilated cardiomyopathy,* DCM). Mögliche histologische Symptome eines solchen Krankheitsbildes sind myokardiale Fibrose (übermäßige Kollagen Einlagerungen zwischen den Myozyten) und der Verlust von Myofibrillen, was zu leeren Stellen im Cytoplasma der Myozyten führt (Davies, 2000). Aus diesem Grund wurden vergrößerte Aufnahmen von Herzwänden aus Testican-2 defizienten und Wildtyp Herzen aufgenommen und einige dieser Schnitte mit *Fast Green/ Sirius Red* gefärbt. Kollageneinlagerungen werden dabei rot, alle anderen Proteine grün gefärbt.

In *Abb. 2.2.8.4.2* sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen abgebildet. Keines der oben beschriebenen histologischen Symptome konnte beobachtet werden.

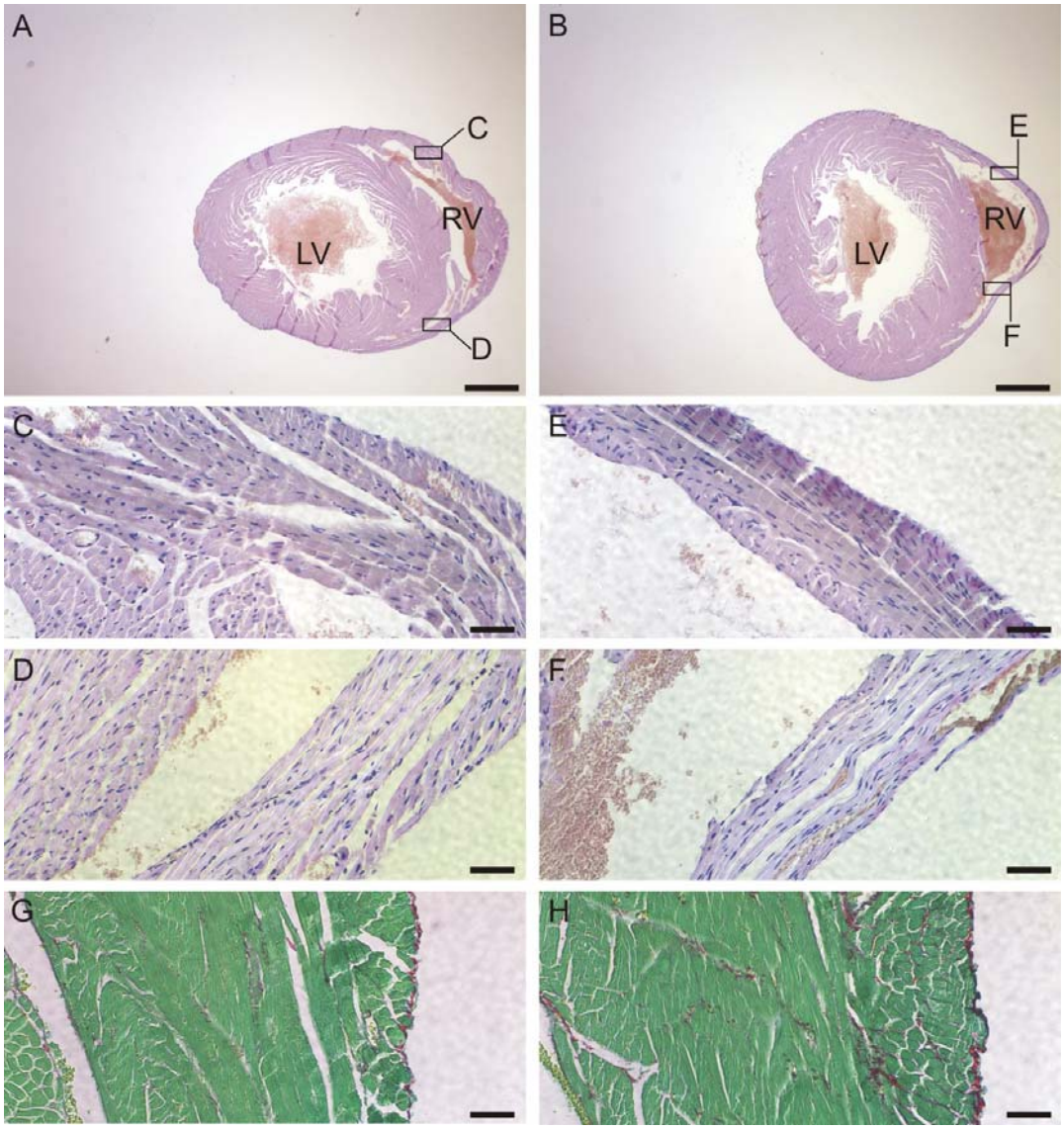


Abb. 2.2.8.4.2: **Hämatoxylin-Eosin (HE) und *Fast Green/ Sirius Red* Färbungen von Horizontalschnitten des Herzens.**
A-F: HE gefärbte Schnitte einer adulten Wildtyp (A, C, D) und einer Testican-2 defizienten Maus in verschiedenen Vergrößerungen. C,D und E,F sind jeweils vergrößerte Ausschnitte der Herzwand des rechten Ventrikels, wie er in A bzw. B abgebildet ist. LV = linker Ventrikel, RV = rechter Ventrikel, A/B: Maßstab = 1 mm, C-F: Maßstab = 50 µm
G,H: *Fast Green/ Sirius Red* gefärbte Schnitte einer adulten Wildtyp (G) und einer Testican-2 defizienten Maus. Maßstab = 50 µm

Histologische Untersuchungen der Lunge: Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen Testican-2 spezifische Signale in der Lunge ab postnatal Tag 1,5 (P 1,5). Damit ist die Lunge das einzig bekannte Organ, in dem Testican-2 erst nach der Geburt exprimiert wird.

Ob es in Lungen Testican-2 defizienter Mäuse signifikante Abweichungen zu Wildtyp Mäusen gibt, lässt sich nicht eindeutig beantworten. Während in Lungenschnitten einer Testican-2 defizienten Maus weniger alveolare Septen, und als Folge davon größere Alveolen gefunden werden (siehe *Abb. 2.2.8.5* D), sind die Alveolen der anderen Testican-2 defizienten Maus nicht signifikant unterschiedlich von den Lungen der Wildtyp Mäuse (siehe *Abb. 2.2.8.5*).

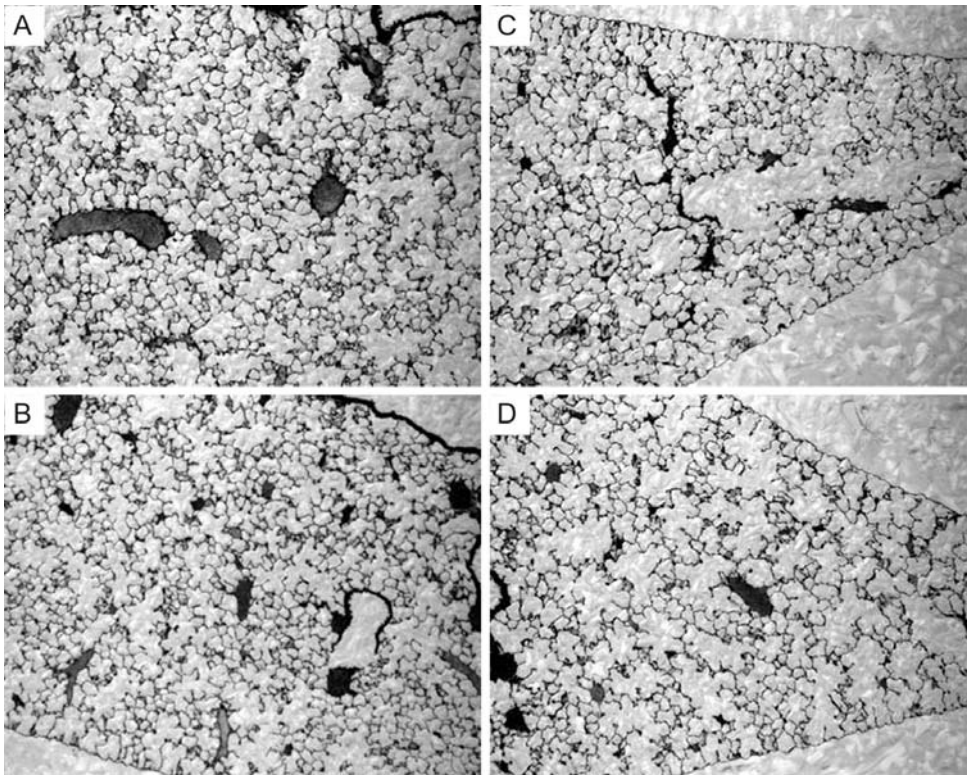


Abb. 2.2.8.5: **Histologische Lungenschnitte**
Dargestellt sind histologische Schnitte von je zwei Wildtyp (A,B) und zwei Testican-2 defizienten (C,D) Lungen aus adulten Mäusen in fünfacher Vergrößerung aufgenommen.

Die Lungenschnitte wurden von Dr. Johannes Schittny (Institut für Anatomie, Universität Bern) angefertigt.

2.3 SMOC-1 Interaktionsstudien

Mit Hilfe von Interaktionsstudien sollten mögliche Bindungspartner für SMOC-1 identifiziert werden. Da mit Ausnahme der follikulären Basalmembran SMOC-1 immer mit Basalmembranen assoziiert ist, sollten überwiegend Wechselwirkungen zwischen SMOC-1 und Basalmembrankomponenten untersucht werden. Dabei sollten mögliche Interaktionspartner einen ersten Hinweis auf die besondere Gewebeverteilung von SMOC-1 liefern. In der Einleitung wurde erwähnt, dass Proteine der BM-40 Familie gelegentlich ähnliche oder sich ergänzende Funktionen zu übernehmen scheinen. Eine Interaktion zwischen kooperierenden Proteinen scheint vor einem solchen Kontext sinnvoll. Aus diesem Grund sollten auch mögliche Interaktionen zwischen SMOC-1 und anderen Proteinen der BM-40 Familie untersucht werden.

2.3.1 Rekombinante Expression von SMOC-1

Die korrekte Faltung und posttranslationale Modifikation eines Proteins ist für Untersuchungen zu Wechselwirkungen mit anderen Proteinen wichtige Vorraussetzung. Um ein möglichst authentisches Protein zu erzeugen, wurde deshalb ein eukaryontisches Expressionssytem verwendet. Die mit einem modifiziertes pCEP-Pu/BM-40SP (Kohfeld et al., 1997) transfizierten und in dieser Arbeit eingesetzten HT1080 Zellen produzieren rekombinantes SMOC-1 (human) mit einem His-Hexapeptid, einem Myc-Epitop, und einer Schnittstelle für die Protease Faktor X an ihrem Aminoterminus. Das His-Hexapeptid dient der Aufreinigung von SMOC-1 über eine mit Nickel- oder Cobalt -Ionen beladene Affinitätsmatrix. Die transfizierten HT1080 Zellen lagen zu Beginn meiner Arbeit bereits vor (Christian Vannahme, Dissertation).

Nach dem Auftauen wurden die Zellen bis zur Konfluenz in Kultur genommen. Konfluente Zellen wurden in serumfreiem Medium weiter kultiviert und der Überstand jeden zweiten Tag geerntet. Zur Inaktivierung möglicher Proteasen wurde dem Medium nach der Ernte PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid) zugesetzt. Der gesammelte Überstand wurde über eine Affinitätsmatrix aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit einem linearen Imidazol Gradienten angeschlossen an einen Fraktionssammler. Das Imidazol verdrängt die über das His-Hexapeptid gebundenen Proteine von der mit Cobalt beladenen Affinitätsmatrix. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels Western Blot Analyse auf die Expression von SMOC-1 untersucht und die SMOC-1 enthaltenen Fraktionen gegen TBS dialysiert. Anschließend wurde die Homogenität mittels Coomassie Färbung überprüft. Der größte Anteil an rekombinantem SMOC-1 läuft als apparente 65 kDa Bande, ein kleinere Menge als eine um wenige kDa reduzierte Form.

Beide Banden werden auch im Immunoblot mit SMOC-1 Antiseren detektiert (siehe *Abb. 2.3.1*).

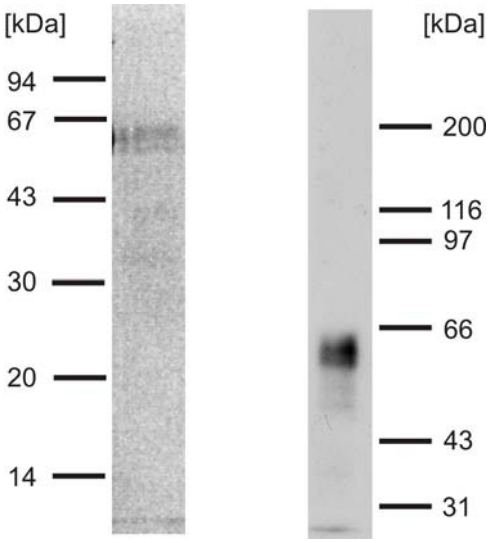


Abb. 2.3.1: **Gereinigtes rekombinates SMOC-1 aus HT1080 Zellen.**
Linkes Bild:Coomassie Färbung von 1 µg SMOC-1 unter reduzierenden Bedingungen auf einem 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt.
Rechtes Bild: Immunoblot von 10 ng rekombinantem SMOC-1 unter reduzierenden Bedingungen auf einem 8% SDS-PAGE aufgetrennt.

2.3.2 Potentielle Interaktionspartner für SMOC-1

Wie bereits erwähnt, wurden Komponenten der Basalmembran als potentielle Interaktionspartner vermutet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Interaktionen von SMOC-1 mit Laminin-1 aus EHS Tumoren (murin) (von Dr. Neil Smyth, Zentrum für Biochemie, Universität zu Köln, freundlicherweise zur Verfügung gestellt), rekombinantem Nidogen-1 (murin) mit einem His-Hexapeptid (von Anju Vasudevan, Zentrum für Biochemie, Universität zu Köln, freundlicherweise zur Verfügung gestellt), Collagen Typ IV aus humaner Placenta (Sigma) und verschiedenen rekombinaten Perlecanfragmenten (murin) (von Takako Sasaki, MPI Martinsried, freundlicherweise zur Verfügung gestellt) untersucht. Zudem wurden Interaktionen von SMOC-1 mit anderen Proteinen der BM-40 Familie (in unserer Arbeitsgruppe vorhanden) untersucht.

2.3.3 Interaktionsstudien mit dem Luminex System

Das Luminex System stellt eine rasche und Protein sparende Methode zur Feststellung von Protein-Protein Wechselwirkungen dar. Einer der Interaktionspartner bleibt dabei in Lösung, der andere wird an Polystyren-Beads gekoppelt, welche in einem bestimmten Mischungsverhältnis zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe enthalten (unter Verwendung verschiedener Mischungsverhältnisse in den Polystyren-Beads lassen sich auch mehrere Proteine gleichzeitig messen). Nach Inkubation der gekoppelten

Polystyren-Beads mit dem potentiellen Bindungspartner, werden letztere über Fluoreszenz gekoppelte Antikörper markiert. Die Messung erfolgt nur, wenn das Fluoreszenzsignal des Polystyren-Beads von der Photozelle detektiert wird. Die Intensität des Fluoreszenzsignals des Fluorochrom gekoppelten Antikörpers zu diesem Zeitpunkt entspricht dabei der Stärke der Bindung (angegeben in *response units*; RU). Dieser Umstand erlaubt eine Messung ohne vorherige Waschschritte.

In den Messungen wurde SMOC-1 über das His-Hexapeptid an Polystyren-Beads mit einer Ni-NTA Oberfläche gekoppelt (2 ng/ Datenmesspunkt) und mit einem potentiellen Interaktionspartner inkubiert. Die Liganden in Lösung wurden in der Regel über die Verwendung eines Primärantikörpers aus Kaninchen und eines gegen diesen Primärantikörper gerichteten Fluoreszenz gekoppelten Sekundär-antikörpers markiert. Bei Proteinen mit einem His-Hexapeptid wurden Anti-His Antikörper zur Markierung verwendet. Dies ist möglich, da Kontrollversuche mit SMOC-1 gekoppelten Polystyren-Beads und den Fluoreszenz gekoppelten Anti-His Antikörpern ergaben, dass das His-Hexapeptid des gekoppelten SMOC-1 nicht mehr vom Anti-His Antikörper erkannt werden kann (nicht gezeigte Ergebnisse). Um sicherzustellen, dass die eingesetzten Liganden nicht unspezifisch mit der Ni-NTA Oberfläche interagieren wurden ungekoppelte Ni-NTA Polystyren-Beads mit den potentiellen Interaktionspartnern inkubiert. Für zwei Perlecan Fragmente (PG III-2, PG V) war eine unspezifische Bindung zu beobachten. Die Ergebnisse der Interaktionsstudie zeigen aber, dass diese Fragmente nicht mehr oder sehr viel schwächer an die mit SMOC-1 gekoppelten Polystyren-Beads binden. Dies demonstriert eine Unzugänglichkeit der Ni-NTA Polystyren-Beads, sobald SMOC-1 an sie gekoppelt ist. Um einen Überblick zu bekommen, ob einer der potentiellen Interaktionspartner tatsächlich an SMOC-1 bindet, wurde jedes der Proteine (oder Proteinfragmente) zunächst nur in einer Konzentration gemessen. Wie in *Abb. 2.3.3.1* zu sehen ist, bindet Laminin-1 und das Perlecanfragment PIV-1 an die mit SMOC-1 gekoppelten Polystyren-Beads. Schwächere Wechselwirkungen waren mit Collagen IV, Nidogen-1 und dem Perlecanfragment PV zu erkennen (siehe *Abb. 2.3.3.1*). Von den getesteten Proteinen der BM-40 Familie (BM-40, SC1, TSC-36, Testican-1, -2, -3, SMOC-1 und -2) zeigte nur SMOC-2 eine schwache Interaktion mit SMOC-1 (nicht gezeigte Ergebnisse).

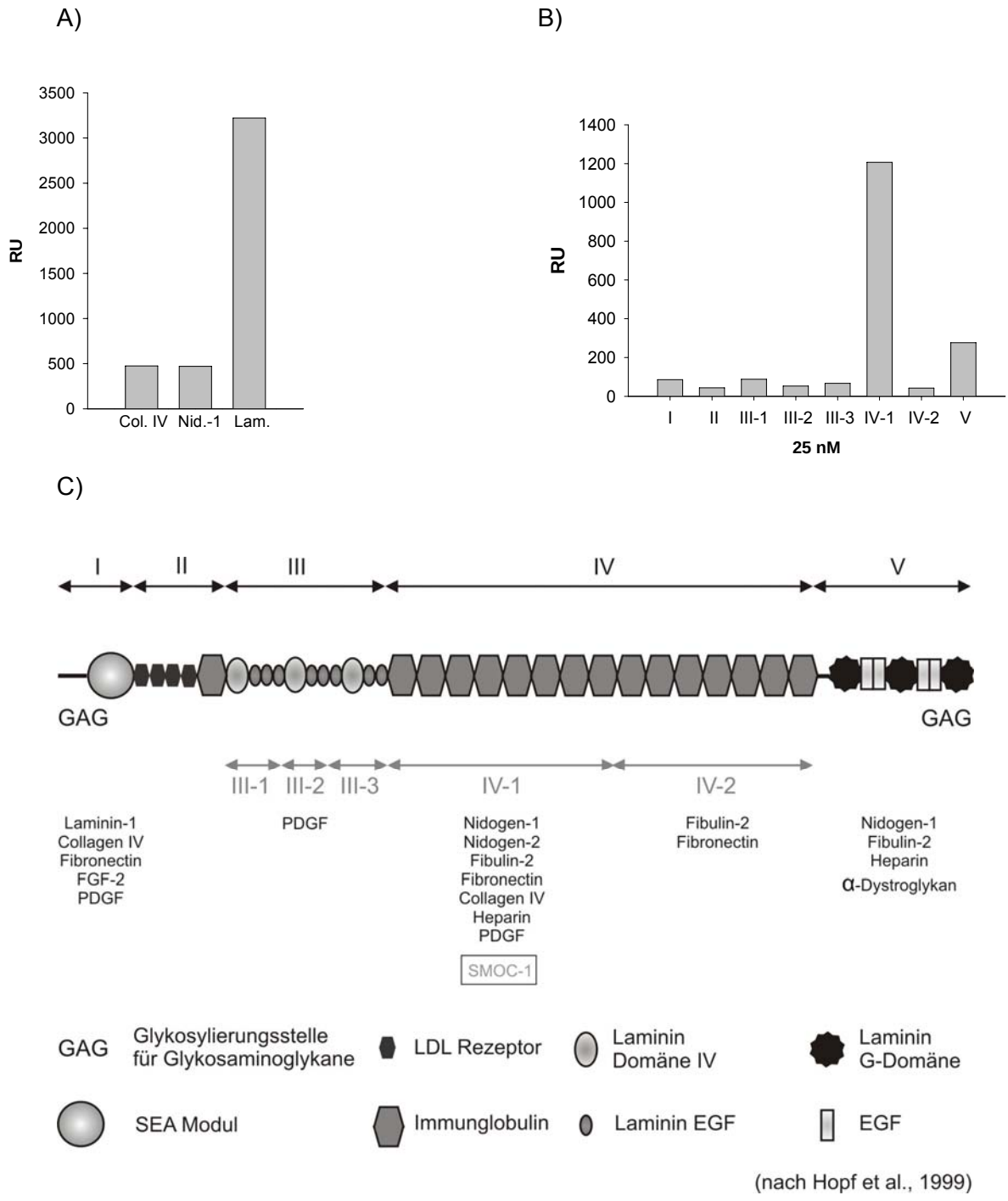


Abb. 2.3.3.1: **Interaktionsstudien von SMOC-1 mit verschiedenen Basalmembranproteinen im Luminex System**

A) Interaktionen zwischen verschiedenen Basalmembranproteinen und SMOC-1. Collagen IV (Col. IV) und Nidogen-1 (Nid.-1) wurden in einer Konzentration von 25 nM eingesetzt, Laminin-1 (Lam.) in einer Konzentration von 2,5 nM.
RU = *response units* (hier Intensität des Fluoreszenzsignals)
B) Interaktionen zwischen verschiedenen Perlecan Fragmenten und SMOC-1. Die Fragmente wurden immer in einer Konzentration von 25 nM eingesetzt.
RU = *response units* (hier Intensität des Fluoreszenzsignals)
C) Schematische Darstellung der einzelnen Domänen und der in B eingesetzten Fragmente von Perlecan. Anm.: Bei den Bezeichnungen hinter den einzelnen Modulen handelt es sich um Homologiebeschreibungen. SEA = *sea urchin sperm protein*, LDL = *low density lipoprotein*, G-Domäne = globuläre Domäne, EGF = *epidermal growth factor*. Bei der in der Bindungsstudie eingesetzten Domäne V handelt es sich um ein Glycosaminoglycan freies Fragment.

Im folgendem wurden die Interaktionen von SMOC-1 mit Laminin-1 und den Perlecanfragmenten PIV-1 und PIV-2 (als Negativkontrolle) auf ihre Konzentrationsabhängigkeit hin untersucht (siehe A*bb. 2.3.3.2*).

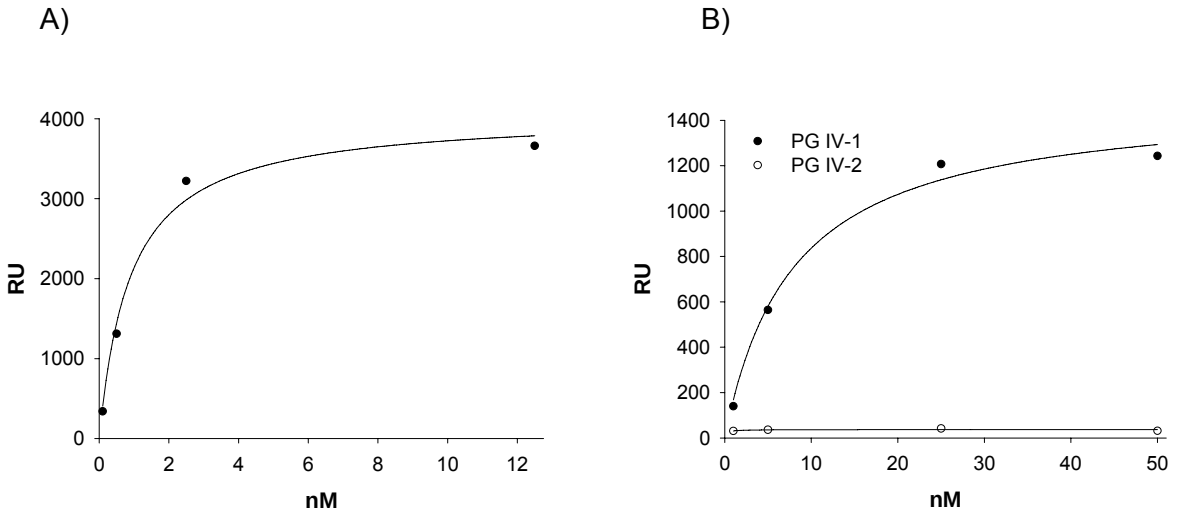


Abb. 2.3.3.2: **Nachweis der Interaktion von SMOC-1 mit Laminin-1 und dem Perlecanfragment PIV-1 im Luminex System.**
A) Interaktion von SMOC-1 mit Laminin-1.
B) Interaktionen von SMOC-1 mit dem aminoterminalen Fragment der Perlecan Domäne IV (PIV-1/ IG 2-9) und dem carboxyterminalen Fragment der Perlecan Domäne IV (PIV-2/ IG 10-15).
RU = *response units* (hier Intensität des Fluoreszenzsignals)

Für das Perlecanfragment PIV-2 konnte für keine Konzentration eine Bindung an SMOC-1 beobachtet werden. Die halbmaximale Sättigung der Interaktionen von SMOC-1 mit Laminin-1 und dem Perlecanfragment PIV-1 liegen im niedrigen nanomolaren Bereich. Eine genauere Bestimmung der Dissoziationskonstante wurde mit Hilfe des Sigma Plot Programms durchgeführt. Für die Bestimmung der Dissoziationskonstante wurde eine 1:1 Sättigung der Bindung angenommen, welche durch die Funktion RU = (RU_{max} * X)/ (K_D + X) beschrieben werden kann. Im Programm werden nun den experimentell ermittelten Werten für X (die experimentell eingesetzten Proteinkonzentrationen) und RU (die ermittelten *response units*) diejenigen RU_{max} und K_D Werte zugeordnet, die der obigen Funktion durch die gemessenen Werte am ehesten entsprechen. Die ermittelten K_D-Werte betragen 0,9 nM für die Bindung von SMOC-1 an Laminin-1 und 7,9 nM für die Interaktion von SMOC-1 mit dem Perlecanfragment PIV-1.

2.3.4 Interaktionsstudien mittels Oberflächen Plasmon Resonanz im BIACORE System

Die im Luminex System ermittelten Interaktionen von SMOC-1 mit Laminin-1 und dem Perlecanfragment PIV-1 sollten in einem zweiten unabhängigen Verfahren bestätigt werden. Bei der Oberflächen Plasmon Resonanz im BIACORE System wird die Intensität der Bindung als Massenzuwachs an einer Goldoberfläche gemessen. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die Interaktion zwischen dem auf der Goldoberfläche immobilisiertem Protein (Analyt) und einem zweiten Protein in Lösung (Ligand) in Echtzeit verfolgt werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Analyt (SMOC-1) kovalent an eine auf der Goldoberfläche fixierte Dextranmatrix gekoppelt (CM5 Sensorchip). Da von diesem System jeglicher Massenzuwachs an der Goldoberfläche gemessen wird (ungebundenes Protein, Salze), wurde als Negativkontrolle eine Chipoberfläche mit Amingruppen gesättigt. Der Massenzuwachs an dieser Oberfläche wird bei der Auswertung von allen anderen Chipoberflächen abgezogen. Auf drei der vier Chipoberflächen wurden unterschiedliche Mengen an SMOC-1 (gemessen in *response units* (RU)) gekoppelt (500 RU, 1000 RU, 1500 RU), die vierte Oberfläche diente als Kontrolle und die aktivierten Bindungsstellen auf dieser Oberfläche wurden mit Aminen abgesättigt. Anschließend folgte die Injektion der Proteine. Das Protein in Lösung wurde mit einer Flußgeschwinigkeit von 25 µl/ min (entspricht im verwendeten BIACORE 2000 Gerät einem etwa siebenfachen Volumenaustauschen/ Sekunde über der Chipoberfläche) und bei einer Temperatur von 25 °C injiziert (insgesamt 100 µl Proteinlösung bei anschließender Dissoziation für 200 Sekunden). Die zur Verfügung stehenden Mengen an Perlecanfragment PIV-1 reichten nur für insgesamt zwei Messungen mit Perlecankonzentrationen von 50 nM und 100 nM. Leider ließen beide Messungen aufgrund eines zu geringen Massenzuwachses an der Chipoberfläche keine Auswertung zu (nicht gezeigte Ergebnisse). Bei den Messungen mit Laminin (EHS) bestand das Problem darin, dass ab Konzentrationen von mehr als 3 nM abnorme Kurvenverläufe zu beobachten waren. Es wurde vermutet, dass dies auf Massentransportprobleme, bedingt durch die Größe des Laminin Moleküls, zurückzuführen ist. Die Erhöhung der Flußgeschwindigkeit und die Verwendung von geringeren Mengen gekoppelten SMOC-1 (250 RU) auf der Chipoberfläche sollten dieses Phänomen verhindern. Dies gelang leider nicht. Wie in *Abb. 2.3.4* zu sehen ist kommt es aber bereits bei Laminin (EHS) Konzentrationen von 3 nM auf der mit SMOC-1 gekoppelten Oberfläche zu einem Massenzuwachs, der auf Interaktionen von SMOC-1 und Laminin (EHS) zurückzuführen ist.

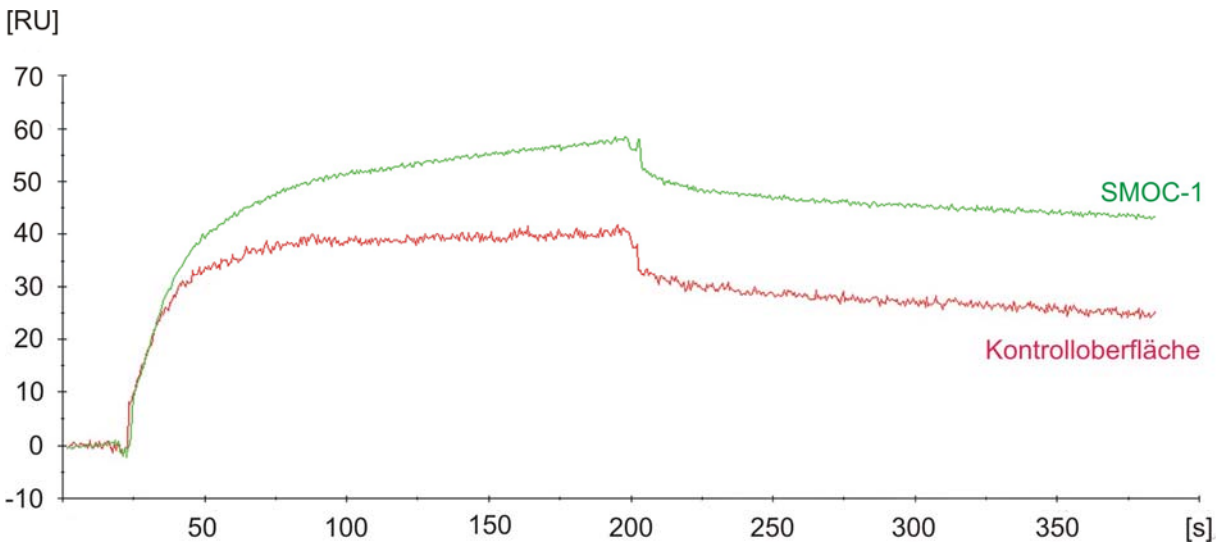


Abb. 2.3.4: **Sensogram einer Oberflächen Plasmon Resonanz der Interaktionen von Laminin (EHS) mit gekoppeltem SMOC-1**
Laminin wurde in einer Konzentration von 3 nM über die mit 500 RU gekoppelte Chipoberfläche geleitet.

Obwohl die mittels der Oberflächen Plasmon Resonanz ermittelten Daten keine Analyse der Kinetik dieser Interaktionen zuließen, wurde in den Messungen (PIV-1 und Laminin-1) immer nur auf den SMOC-1 gekoppelten Oberflächen Massenzuwachs beobachtet.

3. Diskussion

3.1 Inaktivierung des Testican-2 Gens in der Maus

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels homologer Rekombination das murine Testican-2 Gen inaktiviert. Dazu wurde zunächst eines der beiden Testican-2 Allele in embryonalen Stammzellen (ES Zellen) dahingehend verändert, dass unmittelbar 3' des codierten Translationsstartpunktes (ATG) eine Selektionskassette eingeführt wurde. ES Zellen mit dem mutiertem Testican-2 Lokus wurden in Blastozysten eines anderen Mausstammes injiziert und die daraus entstehenden Mäuse (Chimäre aus den Mausstämmen 129/Ola und C57Bl/6) auf Keimbahngängigkeit der manipulierten ES Zellen hin überprüft. Von den zwei injizierten ES-Zell-Klonen war einer keimbahn-gängig. Die Mäuse der F1 Generation dienten der Generierung Testican-2 defizienter Tiere. Die Abwesenheit von Testican-2 wurde auf RNA und Protein Ebene nachgewiesen und Testican-2 defiziente Mäuse auf Unterschiede zu Wildtyp Mäusen untersucht. Parallel dazu wurden zur Verminderung der biologischen Varianz, welche in gemischten genetischen Hintergründen (hier 129/Ola und C57Bl/6) größer ist, bisher sechs Rückkreuzungen heterozygoter Mäuse mit C57Bl/6 Wildtyp Mäusen durchgeführt.

3.1.1 Makroskopische Analyse Testican-2 defizienter Mäuse

Da immer gleichgeschlechtliche Testican-2 defiziente (-/-) und Wildtyp Mäuse (+/+) aus einem Wurf miteinander verglichen werden sollten, wurden Verpaarungen heterozygoter Mäuse (+/-) durchgeführt. Bei Kreuzungen zwischen heterozygoten Tieren gilt das Mendelsche Spaltungsgesetz und für den Genotyp der Nachkommen das Verteilungsverhältnis von 1 : 2 : 1 (+/+ : +/- : -/-). Die experimentell ermittelte Verteilung von 27 : 59 : 33 stimmt mit der zu erwartenden Verteilung von 30 : 60 : 30 nahezu überein. Damit kann eine Letalität Testican-2 defizienter Embryonen ausgeschlosen werden. Alle geborenen Mäuse waren voll lebensfähig. Körpergewicht und -form waren übereinstimmend und es waren keine offensichtlichen Veränderungen in Testican-2 defizienten Mäusen erkennbar. Verpaarungen von Mäusen, die für das mutierte Allel homozygot (-/-) waren, wiesen in statistischen Untersuchungen jedoch im Vergleich zu den Verpaarungen von heterozygoten Mäusen (+/-) eine um 35 % verminderte Fertilität auf. Die Anzahl der Mäuse innerhalb eines Wurfs aus Kreuz-

ungen Testican-2 defizienter Männchen mit Wildtyp Weibchen und umgekehrt lassen vermuten, dass die Fertilität nur dann beeinträchtigt ist, wenn beide Elterntiere eine Testican-2 Defizienz aufweisen. Da aber bisher nur je vier Verpaarungen mit Mäusen, bei denen jeweils nur ein Elternteil für Testican-2 defizient ist, durchgeführt wurden, sind zur Bestätigung (oder Widerlegung) dieser Vermutung weitere Verpaarungen nötig. Da aufgrund der experimentell ermittelten Verteilung der Heterozygoten Verpaarungen eine Letalität der Embryonen ausgeschlossen werden kann, wäre eine verminderte Fertilität nur im Falle einer Testican-2 Defizienz bei beiden Elterntieren überraschend. Beispiele für einen solchen Phänotyp sind aber beschrieben. Eine verminderte Fertilität beider Geschlechter ist beispielsweise in Mäusen mit einer gehirnspezifischen Insulin Rezeptor Defizienz (NIRKO Mäuse) zu beobachten. In den männlichen Mäusen ist eine verminderte Spermatogenese zu beobachten, bei den weiblichen Mäusen ist die Follikelreifung beeinträchtigt. Dieser Effekt wird einer Disregulierung des luteinisierenden Hormons (LH) zugeschrieben (Brüning et al., 2000). Ob die beeinträchtigte Fertilität in Testican-2 defizienten Mäusen eine vergleichbare Ursache hat, ist nicht zu sagen. Interessanterweise zeigen immunhistologische Untersuchungen zur Insulin-Rezeptor Verteilung in der Hypophyse (Unger und Lange, 1997) eine große Übereinstimmung mit immunhistologischen Färbungen für Testican-2 (Schnepp et al., 2005). In beiden Fällen sind starke zelluläre Färbungen in der Pars Intermedia und vereinzelte zelluläre Signale in der Pars Distalis (Adeohypophyse) zu beobachten. Bei einer angenommenen Co-Lokalisation beider Proteine in der Hypophyse wäre eine funktionelle Verbindung dieser Moleküle denkbar. Immunhistologische Doppelfärbungen könnten eine tatsächliche Co-Lokalisation bestätigen oder widerlegen. Beeinträchtigte Fertilität nur im Falle einer Testican-2 Defizienz beider Elterntiere ließe sich auch darauf zurückführen, dass Testican-2 Bestandteil von Körperflüssigkeiten (weiblichen und männlichen) ist, für die ein Fruchtbarkeit fördernder Einfluss belegt ist. Anhand von *in vitro* Experimenten ist z.B. gezeigt, dass Heparansulfat Proteoglykane aus boviner Follikelflüssigkeit entscheidend an der Kapazitation (Endreifung der Spermien im weiblichen Genitaltrakt) von Spermien beteiligt sind (Therien et al., 2005). Die Aktivität der Xylosyltransferase, dem Initiatorenzym der Proteoglykansynthese, ist in der Follikelflüssigkeit größer als in allen anderen Körperflüssigkeiten (Götting et al, 2002b). Außerdem sind für Glykosaminoglykane aus der Follikelflüssigkeit akrosomreaktionsfördernde Eigenschaften nachgewiesen (Reyes et al., 1984). Auch in männlichen Genitalsekreten haben Glykosaminoglykane einen entscheidenden Einfluss auf die Fertilität. So zeigte sich in Experimenten zur Analyse der Xylosyltransferaseaktivität in humaner Samenflüssigkeit gesunder und infertiler Männer, dass die Aktivität des Enzyms in der Gruppe der

infertilen Männer reduziert war (Götting et al, 2002a). Offensichtlich haben Proteoglykane in solchen Körpeflüssigkeiten Einfluss auf die Fertilität. Wäre Testican-2 Bestandteil sowohl männlicher als auch weiblicher fertilitätsfördernder Körperflüssigkeiten, würde nur ein geringer Einfluss von Testican-2 auf die fertilitätsfördernden Eigenschaften erklären, warum in Verpaarungen mit nur einem Testican-2 defizienten Tier keine beeinträchtigte Fertilität zu beobachten war, in Verpaarungen mit zwei defizienten Mäusen aber doch. Ob Testican-2 in solchen Körperflüssigkeiten vorkommt, müsste noch untersucht werden. In diesem Zusammenhang ist jedoch interessant, dass Testican-1 ursprünglich als Chondroitinsulfat/ Heparansulfat Proteoglykan aus humaner Samenflüssigkeit isoliert wurde (Alliel et al., 1993).

3.1.2 Morphologische und histologische Analyse Testican-2 defizienter Mäuse

Der makroskopischen äußeren Anaylse der Maus folgten Untersuchungen zur Morphologie und Histologie der inneren Organe. Dabei wurden immer Organe gleichgeschlechtlicher Geschwistertiere acht Wochen alter Mäuse verglichen. Die Morphologie der Organe war in Testican-2 defizienten Tieren nicht von der aus Organen von Wildtyp Mäusen zu unterscheiden. Die reduzierte Fertilität in den Verpaarungen von Testican-2 defizienten Mäusen ließ vermuten, dass in histologischen Schnitten von Testikeln Veränderungen gefunden werden könnten. Die Anzahl an Spermatogonien und Spermien schien aber nicht signifikant verschieden, was aber auch nicht unbedingt ein sicheres Anzeichen für eine beeinträchtigte Fertilität wäre. So zeigen Mäuse, die für den Transkriptionsfaktor Creb3l4 defizient sind zwar eine reduzierte Spermienanzahl aber keine beeinträchtigte Fertilität (Adham et al., 2005). Untersuchungen zur Motilität, Morphologie oder Geschwindigkeit von Spermien würden die Frage nach der Ursache für die geringere Geburtenrate in den Verpaarungen Testican-2 defizienter Mäuse weiter eingrenzen. Da aber nur wenige Daten zu den Verpaarungen mit nur einem Testican-2 defizienten Elternteil vorliegen (je vier Verpaarungen), sollten solche Experimente bis zur Ermittlung von gesicherten Daten in diesen Verpaarungen zurückgestellt werden.

Die Histologie von Pankreas und Nebenniere war in Testican-2 defizienten Mäusen ebenfalls nicht verändert. Physiologische Unterschiede wie ein veränderter Hormonspiegel im Plasma können durch solche Untersuchungen natürlich nicht ausgeschlossen werden. Immunhistologische Untersuchungen zeigten Testican-2 in Pankreas und Nebenniere assoziiert mit Zellen (Schnepp et al., 2005), so dass eine Interaktion mit membrangebundenen Molekülen möglich erscheint. Für Betaglykan,

einem Chondroitinsulfat/ Heparansulfat Proteoglykan wird beispielsweise eine Funktion als Co-Rezeptor der Inhibin vermittelten FSH (*follicle stimulating hormone*) Sekretion in der Hypophyse vermutet (Chapman und Woodruff, 2003). Möglicherweise übernimmt Testican-2 eine ähnliche Funktion. Die Tatsache, dass Testican-2 nicht auf ein einzelnes endokrines Organ oder bestimmte Zellen beschränkt ist, macht eine Eingrenzung möglicher Rezeptoren aber schwierig.

Allen Testicanen gemeinsam ist ihre breitflächige Expression im Gehirn. Untersuchungen mittels Testican-2 spezifischen Antikörpern detektieren Signale u.a. im Cerebellum und im Hippocampus (Schnepp et al., 2005). Histologische Untersuchungen mittels Kresylechtviolettfärbungen von Hippocampus und Cerebellum zeigten keine signifikanten Unterschiede. Aus *in vitro* Experimenten ist bekannt, dass die Zugabe von Testican-2 zu primären Cerebellumzellen das Neuritenwachstum dieser Zellen inhibiert (Schnepp et al., 2005). Einen ähnlichen Effekt hat Testican-1 auf Neuroblastomzellen (N2a) (Marr et al., 2003). Vorausgesetzt, Testican-2 hätte auch *in vivo* einen inhibierenden Einfluss auf das Auswachsen von Axonen, könnte ein Fehlen von Testican-2 z.B. zu Wegfindungsdefekten führen. Für eine detailliertere Analyse könnten Axone mittels immunhistologischen Neurofilamentfärbungen sichtbar gemacht werden, wodurch sich mögliche Unterschiede z.B. in der Faszikulierung von Axonen darstellen ließen. Würden nur einzelne Zellen fehlen oder wäre lediglich die Struktur einzelner Zellen verändert, müssten aufwendigere elektronenmikroskopische Untersuchungen angestrebt werden.

Die Lunge ist das einzig bekannte Organ, in dem Testican-2 erst nach der Geburt exprimiert wird (Schnepp et al., 2005). *Micro-Array* Untersuchungen zu Expressionsprofilen von alveolaren Typ I und Typ II Zellen aus Ratten zeigten Testican-2 Transkripte als diejenigen mit dem größten Unterschied zwischen beiden Zelltypen. BM-40 gehörte ebenfalls zu der kleinen Gruppe von Genen, die in alveolaren Typ I Zellen deutlich stärker transkribiert werden (Gonzales et al., 2005). Alveolare Typ I Zellen bilden etwa 95% – 97% der Lungenoberfläche (beim Menschen sind dies etwa 70 m^2). Die Zellen sind mit einem Durchmesser von bis zu 100 µm sehr groß, aber so flach, dass nur der Kern und der perinukleare Raum im Lichtmikroskop erkannt werden können. Diese Zellen sind entscheidend am Gasaustausch und an der Flüssigkeits Homöostase der Lunge beteiligt (zur Übersicht siehe Williams, 2003). Anhand der Lungenschnitte Testican-2 defizienter Mäuse ließ sich leider keine eindeutige Aussage zu einer veränderten Lungenhistologie treffen. Während in Lungenschnitten einer Testican-2 defizienten Maus weniger alveolare Septen, und als Folge davon größere

Alveolen gefunden wurden, sind die Alveolen einer anderen Testican-2 defizienten Maus unverändert. Die Analyse zusätzlicher Mäuse könnte auch hier klären, ob es sich bei den beobachteten Unterschieden lediglich um eine natürliche Varianz handelt, oder ob vergrößerte Alveolen nur in Testican-2 defizienten Tieren gefunden werden. Zudem ist denkbar, dass eine Testican-2 Defizienz in der Lunge mit zunehmendem Alter der Maus größere Auswirkungen zeigt. Aus diesem Grund sollen zusätzlich Lungenschnitte älterer Mäuse angefertigt werden.

Das stärkste Testican-2 Signal überhaupt findet sich am Embryonaltag 9,5 (E 9,5) in der Herzanlage. Die Expression bleibt bis kurz nach der Geburt stark und ist auf das Myokard beschränkt (Anke Schnepp, Dissertation). Am Embryonaltag 9,5 beginnen die komplexen Umorganisierungs Prozesse, die mit der Bildung eines vier Kammer Herzens ihren Abschluss finden. Ein Protein, welches für die Entwicklung des Herzens von einem primitiven Herzkanal (E 8,0) hin zu einem Herz, bei dem bereits die Atrien und die primitiven Ventrikel erkennbar sind (E 9,5) von offensichtlicher Bedeutung ist, ist ADAM 10 (*a disintegrin and metalloproteinase 10*). ADAM 10 ist eine Transmembranprotease, die unter anderem BACE1 (*β-site APP-cleaving enzyme 1, β-secretase*) auf der extrazellulären Seite spaltet (*shedding*) (Hussain et al., 2003). Durch *shedding* werden Ectodomänen von Transmembranproteinen (z.B. BACE1) freigesetzt. ADAM 10 defiziente Mäuse sterben (u.a.) aufgrund von Defekten im kardiovaskulären System am Embryonaltag 9,5 (E 9,5). Offensichtlich kommt es dabei zu einem Stillstand in der Herzentwicklung, da die Morphologie der Herzen in den 9,5 Tage alten Embryonen in etwa der von Herzen aus acht Tage alten Embryonen (E 8,0) entspricht (Hartmann et al., 2002).

In histologischen Schnitten zeigten alle untersuchten Herzen Testican-2 defizienter Mäuse dilatierte Ventrikel. Zudem war die den linken Ventrikel umschließenden Herzwand um etwa 40 % dünner. In einer von insgesamt vier untersuchten Testican-2 defizienten Mäusen war zudem der rechte Ventrikel extrem vergrößert und die umschließende Herzwand sehr dünn. Es muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die Dicke der Herzwände im Gewebeschnitt auch abhängig von der Herzphase zum Zeitpunkt der Gewebe Einbettung ist. Während der Ausstoßphase (Systole) ist die Herzwand dicker als während der Füllungsphase (Diastole). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die in den Testican-2 defizienten Herzen beobachteten Veränderungen der linken Ventrikelwand auf die Herzphase zurückzuführen sind. Der stark dilatierte rechte Ventrikel und die extrem dünne Herzwand dieses Ventrikels in einem der untersuchten Herzen sind aber sicher nicht nur auf die Herzphase zurückzuführen. Das diesen Beobachtungen ent-

sprechende Krankheitsbild wird als dilatierte Kardiomyopathie bezeichnet (*dilated cardiomyopathy,* DCM). Myokardiale Fibrose und der Verlust von Myofibrillen, zwei mögliche histologische Symptome dieses Krankheitsbildes, wurden bei den untersuchten Mäusen nicht festgestellt. Solche Symptome nehmen üblicherweise mit zunehmendem Alter des Herzens an Schwere zu, so dass das Fehlen zweier möglicher histologischer Symptome in acht Wochen alten Mäusen eine DCM nicht ausschließt. Aus diesem Grund sollen in naher Zukunft Herzen aus älteren Mäusen (> 1 Jahr) auf einen histologischen Phänotyp untersucht werden.

Die Ursachen für eine dilatierte Kardiomyopathie sind vielfältig und die Morpholgie und Histologie sehr heterogen. Nicht selten aber ist eine DCM mit einem Defekt in der Lunge kombiniert. Caveolin (ein intrazelluläres Protein der Plasmamembran, das z.B. mit dem Insulin-Rezeptor und verschiedenen Wachstumsfaktor Rezeptoren interagiert) defiziente Mäuse beispielsweise entwickeln eine dilatierte Kardiomyopathie in beiden Ventrikeln. Der rechte Ventrikel ist dabei besonders stark vergrößert und gleichzeitig hypertroph, was zu einem erhöhten Arteriendruck in der Lunge (pulmonare Hypertension) führt (Zhao et al., 2002). Interessanterweise gehörte Caveolin ebenso wie Testican-2 und BM-40 zu der kleinen Gruppe von Genen, deren Transkription in alveolaren Typ I Zellen deutlich stärker ist als in alveolaren Typ II Zellen (Gonzales et al., 2005). Dilatierte Kardiomyopathie (DCM) und pulmonale Hypertension sind für Caveolin defiziente Mäuse belegt (Zhao et al., 2002). Die hier vorliegende Arbeit gibt Hinweise auf eine DCM und auch auf einen möglichen Lungendefekt in Testican-2 defizienten Mäusen. Berücksichtigt man die Tatsache, dass Testican-2 und Caveolin Transkripte zu einer kleinen Gruppe von Genen gehören, deren Expression in alveolaren Typ I Zellen sich deutlich von der in alveolaren Typ II Zellen unterscheidet, scheint ein funktioneller Zusammenhang von Testican-2 und Caveolin in einigen Geweben möglich. Da es sich bei Testican-2 um ein extrazelluläres Protein handelt und bei Caveolin um ein intrazelluläres Molekül, ist eine direkte Interaktion allerdings nicht vorstellbar.Mit der im vorigen Kapitel getroffenen Vermutung einer Co-Lokalisation von Testican-2 mit Insulin-Rezeptoren ließe sich eine funktionelle Verbindung von Testican-2 und Caveolin in bestimmten Geweben aber in Einklang bringen. Caveolin befindet sich in größeren Mengen in den so genannten Caveolae (cholesterolreiche Einstülpungen der Plasmamembran). Wie bereits erwähnt, interagiert Caveolin mit Insulin Rezeptoren. Interaktionen von Caveolin mit dem Insulin Rezeptor stabilisieren und/oder stimulieren diesen, was zu einer Aktivierung von Signalwegen führen kann, die die Aufnahme von Glucose über Glut 4 Rezeptoren anregen (zur Übersicht siehe Ishikawa et al., 2005). Interessanterweise wird das Krankheitsbild der dilatierten Kardiomyopathie häufig von einer myokardialen

Insulinresistenz begleitet (zur Übersicht siehe Shah und Shannon, 2003). Eine dilatierte Kardiomyopathie ist ja auch in Testican-2 defizienten Tieren wahrscheinlich, so dass eine funktionelle Verbindung (Signalweg) von Testican-2 und Caveolin über den Insulin Rezeptor vielleicht die vorhandenen Ähnlichkeiten in der Histologie von Caveolin defizienten und Testican-2 defizienten Mäusen erklären könnte.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit für die dilatierten Ventrikel in Testican-2 defizienten Mäusen ließe sich aus der funktionalen Verbindung von Testicanen mit MMP-2 herleiten. Wie in der Einleitung erwähnt, interagieren Testican-1 und -3 mit den membranständigen Metalloproteinasen MT1-MMP und MT3-MMP und verhindern dadurch die Aktivierung von MMP-2 (Gelatinase A). Matrixmetalloproteinasen sind Ca^{2+} - und Zn^{2+} - abhängige Proteasen des extrazellulären Raums, die über die Abspaltung eines aminoterminalen Propeptides aktiviert werden. Die Zn^{2+}-Bindung ist dabei für die Aktivität des Enzyms entscheidend. Die inhibitorische Wirkung von Testican-1 und -3 auf die Aktivierung von MMP-2 durch MT1-MMP und MT3-MMP kann durch Testican-2 aufgehoben werden (Nakada et al., 2003). Auf MMPs und MMP Inhibitoren lassen sich viele Änderungen der Herzfunktion und Entwicklung zurückführen. So zeigen Patienten mit dilatierter Kardiomyopathie eine reduzierte mRNA und Protein Expression für MMP Inhibitoren (TIMP-1 und TIMP-3, *tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -3*) und eine erhöhte Expression an MMP-1, -2, -9 und MT1-MMP (zur Übersicht siehe Kassiri und Khokha, 2005). TIMP-1 und TIMP-3 defiziente Mäuse entwickeln nach vier bzw. sechs Monaten dilatierte Kardiomyopathie (Roten et al., 2000; Fedak et al., 2004). Darüber hinaus konnte in TIMP-3 defizienten Mäusen ab einem Lebensalter von 18 Monaten eine deutliche Vergrößerung der Alveolen beobachtet werden (Leco et al., 2001). Damit zeigen TIMP-3 defiziente Mäuse einen Lungenphänotyp, der in milderer Form auch in einer der Testican-2 defizienten Lungen beobachtet wurde. Interessanterweise wurde in einer in unserem Institut durchgeführten *Micro-Array* Untersuchung TIMP-3 mRNA als eine von insgesamt neun unterschiedlich exprimierten mRNAs identifiziert, deren Expression in Gehirnen 25 Tage alter Testican-2 defizienter Mäuse geringer war als in Gehirnen von Wildtyp Mäusen (Tamara Mankart, persönliche Mitteilung). Es muss allerdings gesagt werden, dass es sich hierbei lediglich um eine Reduzierung von 14% handelt (alle neun identifizierten RNAs waren nur geringfügig reduziert). Andererseits könnte ein lokal begrenzter stärkerer Unterschied in der Expression, z.B. in einer einzelnen Gehirnregion, durch die Verwendung der gesamten RNA eines Gehirns maskiert werden. Eine weitere Gemeinsamkeit von Testican-2 und TIMP-3 ergibt sich aus der Analyse von Glioblastomzellen. In solchen Zellen nimmt die Expression von Testican-2 mRNA (und anderer Testican mRNA) mit steigendem Tumorgrad ab (Nakada et al.,

2003). Ein ähnlicher Effekt wird auch für die Expression von TIMP-3 in Glioblastomzellen beobachtet (Nakamura et al., 2005). Eine mögliche funktionelle Verbindung zwischen diesen beiden Proteinen macht eine Untersuchung auf eine mögliche Interaktion von Testican-2 mit TIMP-3 interessant, vor allem wenn man berücksichtigt, dass für TIMP-3 eine Bindung an sulfatierte Heparansulfat Proteoglykane beschrieben ist (Yu et al., 2000).

Da bisher nur je vier Herzen von Testican-2 defizienten und Wildtyp Mäusen miteinander verglichen wurden und in diesen eine deutliche Varianz in der Ausprägung des Phänotyps deutlich wurde, müssten zur Ermittlung des Schweregrads einer dilatierten Kardiomyopathie in Testican-2 defizienten Mäusen weitere Herzen verglichen werden. Zum jetzigen Zeitpunkt lässt sich keine statistisch signifikante Aussage zur Häufigkeit des stark erweiterten rechten Ventrikels treffen. Darum sollen zusätzlich funktionale Studien in Form eines Elektrokardiogramms durchgeführt werden (Kooperation mit Prof. T. Schneider, Zentrum für Physiologie, Medizinische Fakultät der Universität zu Köln). Außerdem sollen Proteine aus Testican-2 defizienten Herzen auf einen verstärkten Ubiquitinierungsgrad, einem häufig auftretendem molekularen Phänotyp dilatierter Herzen (in Tier und Mensch) (Weekes et al., 2003), untersucht werden. Für ein wirkliches Verständnis der Funktion und der Einordnung von Testican-2 in ein biologisches Modell unabdingbar ist die Identifizierung zellulärer Rezeptoren oder sekretierter Interaktionspartner. TIMP-3 oder der Insulin-Rezeptor wären hier interessante Kandidaten.

3.2 Mögliche Bedeutung des Exons 2 im Testican-2 Gen

Allen Testicanen gemeinsam ist ein nur neun Basenpaare großes Exon (Mikro-Exon), welches für die drei Aminosäuren Glu-Val-Glu codiert (EVE). Diese Aminosäuren liegen in der am stärksten konservierten Region der aminoterminalen Domäne aller Testicane. Die Suche nach Mikro-Exons (Exons $\leq$ 25 bp) im humanen Genom zeigt, dass unter den insgesamt 425 gefundenen Mikro-Exons (Volfovsky et al., 2003) keines ist, welches eine den Testicanen identische Sequenzinformation (für das Tripeptid EVE) enthält (wurde mit Hilfe der *supplemental table 4* aus Volfovsky et al., 2003 überprüft). Es stellte sich die Frage, ob ein Muster in der Expression der beiden Testican Isoformen gefunden werden kann. Aus früheren Arbeiten (Detlef Heep, Diplomarbeit; Sandra Röll, Dissertation) ist bekannt, dass dieses Mikro-Exon im Testican-1 und -3 Gen alternativ gespleisst wird. Untersuchungen zur Expression der Testican-1 Isoformen im Gehirn von Mäusen lassen vermuten, dass das Spleissen unabhängig vom Entwicklungsalter der Maus ist (Sandra Röll, Dissertation). Die

Mehrzahl der murinen und humanen Testican-1 und Testican-3 mRNA Sequenzen in der Datenbank stammen aus Geweben neuronalen Ursprungs. In neuronalen Geweben und in humanen Geweben nicht-neuronalen Ursprungs finden sich jeweils beide Isoformen von Testican-1 und -3. In den murinen EST Klonen aus nicht neuronalen Geweben hingegen fehlt das Exon immer, was auf eine gewebespezifische Expression der Isoformen in der Maus hindeutet. Finden sich in neuronalen Geweben immer beide Isoformen, entsprechen zumindest in der Maus alle Testican-1 und -3 EST Klone aus nicht-neuronalen Geweben immer der Isoform ohne das Mikro-Exon. Da in der Datenbank aber insgesamt nur fünf murine EST Klone aus Geweben nicht-neuronalen Ursprungs veröffentlicht sind (für Testican-1 und -3 zusammen), ist das Fehlen des Exons in diesen Sequenzen nicht zwangsläufig signifikant.

In dieser Arbeit sollte experimentell anhand von RT-PCR Untersuchungen und zusätzlich über Datenbanksuche ermittelt werden, ob dieses Exon im Testican-2 Gen ebenfalls alternativ gepleisst wird. Die in der Datenbank gefundenen EST Klone enthielten bis auf eine Ausnahme immer das Exon 2. Bei der Isoform ohne Exon 2 handelt es sich um eine humane mRNA, die aus einem adulten Gewebe-Pool isoliert wurde (sechs Gehirne, eine Lunge und ein Testikel). Es kann also keine Aussage gemacht werden, ob es sich hier um eine mRNA Sequenz neuronalen Ursprungs handelt oder nicht. Die in dieser Arbeit durchgeführten RT-PCR Untersuchungen mit murinen und humanen Geweben lieferten keine Testican-2 Isoform ohne Exon 2. Eine beständige Integration eines solch kleinen Exons ist eher verwunderlich, da es aufgrund der geringen Größe zu sterischen Problemen zwischen den Faktoren kommt, die die individuellen Spleissstellen erkennen. Als Folge davon wird über ein solches Exon häufig hinweg gespleisst, weshalb es oft nicht Bestandteil der mRNAs ist. Wichtige Ursache für die Integration solch kleiner Exons sind das Spleissen fördernde Sequenzabschnitte in unmittelbarer Umgebung der Exons. Solche funktionalen Spleissstellen sind allgemein leider wenig konserviert (Black, 2000). In humanen Intronsequenzen konnte eine etwa 50 Nukleotide große GC-reiche Region identifiziert werden, in der das Trinukleotid GGG viermal häufiger vorkommt, als es dem statistischen Mittel entspräche. Dieses Trinukleotid lässt sich zur Consensus Sequenz (A/U)GGG erweitern und fördert die Funktionalität von 5' gelegenen Spleissstellen (Donor Spleissstelle). Diesen G-reichen Sequenzwiederholungen werden Funktionen auf der Stufe der Spleißosom-Montage zugesprochen. Versuche mit Tropomyosin prä-mRNA aus Hühnchen zeigen, dass dieses Motiv die Integration eines alternativ gespleißten Exons fördert (Sirand-Pugnet et al., 1995). Sequenzvergleiche der unmittelbaren Umgebung des Mikro-Exons in humanen und murinen Testicanen zeigen, dass im humanen und murinen Testican-2 Gen solche Stellen existieren. In

den anderen Testicanen hingegen kommen sie nicht vor (siehe Anhang 2). Das Fehlen solcher Sequenzmotive unmittelbar 3' des Mikro-Exons im Testican-1 und -3 Gen sind möglicherweise die Ursache dafür, dass für Testican-1 und -3 mehr Isoformen ohne das Mikro-Exon gefunden werden als für Testican-2. Für Testican-2 wurde in keinem der untersuchten Gewebe und nur in einem humanen EST Klon aus der Datenbank die Isoform ohne Exon 2 (EVE) gefunden.

Zur Bestimmung einer möglichen Funktion dieses Exons wurden Testican-2 Isoformen mit und ohne Exon 2 (± EVE) in eukaryontischen Zellen exprimiert. Die biochemische Charakterisierung beider Isoformen zeigte, dass in der Matrixfraktion humaner Fibrosarcomzellen (HT1080 Zellen) für die Variante, die Exon 2 (+ EVE) enthielt, zwei Banden detektiert wurden, die es in der Matrixfraktion der Deletionsmutante nicht gab. Die größere der beiden zusätzlichen Banden war etwa 88 kDa groß und entsprach damit einem im Bereich der drei Aminosäuren EVE gespaltenen Testican-2-GFP Fusionsprotein. Aufgrund der Ähnlichkeit mit der Consensus Sequenz (E[G/L/E/S]E) der Spaltsstelle für das Enzym Aggrecanase 1 (ADAMTS-4) (Tortorella et al., 2000; Nakamura et al., 2000) wurden proteolytische Spaltungen aller Testicane mit diesem Enzym durchgeführt. Keines der Testicane wurde von diesem Enzym gespalten. Ein weiterer potentieller Kandidat für die Testican-2 Spaltung im Sequenzberich des Tripeptids EVE könnte die bereits erwähnte BACE1 sein. Bei der Suche nach optimalen Substraten für dieses Enzym, welches das Transmembranprotein APP (*amyloid precursor protein*) auf extrazellulärer Seite spaltet, stellte sich heraus, dass synthetische Peptide aminoterminal der drei Aminosäuren EVE besonders effektiv gespalten werden (Tomasselli et al., 2003). Die erweiterte Consensus Sequenz (*SEISY*-↓-EVE-*FR*) zeigt aber wenig Homologie zu der Region um diese drei Aminosäuren in den drei Testicanen (*WN[R/K]FRD*-EVE-*DDY*). Diese Tatsache macht eine Spaltung der Testicane durch dieses Enzym aber nicht unmöglich. Proteine werden durch BACE1 auch dann prozessiert, wenn nur ein Teil der Sequenz zum Consensus homolog ist. So wird z.B. das vom Ubiquitin abgeleitete Dekapeptid KTITL-↓-EVEPS von diesem Enzym gespalten, wenn auch weniger effektiv (Tomasselli et al., 2003). Ob die in den HT1080 Zellen beobachtete Spaltung der Isoform mit EVE auf BACE1 zurückzuführen ist, lässt sich schwer einschätzen, da keine Informationen zur Expression dieser Protease in HT1080 Zellen erhältlich sind und eine Spaltung von Testican-2 durch BACE1 bisher auch noch nicht experimentell untersucht wurde.

Mindestens so interessant wie die Bestimmung der nativen Protease ist die Frage nach der biologische Relevanz einer Spaltung in dem Bereich der drei Aminosäuren (EVE). Wie bereits erwähnt, interagieren Testican-1 und -3 mit den

membranständigen Metalloproteinasen MT1-MMP und MT3-MMP und verhindern so die Aktivierung von MMP-2. Die inhibitorische Wirkung von Testican-1 und -3 auf die Aktivierung von MMP-2 kann durch Testican-2 aufgehoben werden. Dabei wurde die antagonistische Wirkung von Testican-2 auf Testican-1 und -3 auch für eine Testican-2 Deletionsmutante (Δ 89) nachgewiesen, die nur die ersten 89 Aminosäuren des Proteins (einschließlich des Signalpeptids) enthält (Nakada et al., 2001; Nakada et al., 2003). Ohne Signalpeptid handelt es sich dabei um ein Fragment, welches aminoterminal von EVE 41 Aminosäuren und carboxyterminal 21 Aminosäuren aufweist. Die Sequenz dieses Fragments ist in Testican-2 aus Maus und Mensch stark konserviert (siehe Anhang 1). Sollte die antagonistische Funktion von einem der stark konservierten Bereiche aminoterminal der drei aminosäuren EVE erfüllt werden, würde eine Spaltung in unmittelbarer Nähe der drei Aminosäuren den Verlust der antagonistischen Funktion zur Folge haben. Welche Funktion dieses Exon in Testican-1 und -3 besitzen könnte, ist damit allerdings noch unklar. Der hohe Konservierungsgrad der unmittelbaren Sequenzumgebung um das vom Mikro-Exon codierte Tripeptid EVE in Testicanen verschiedener Spezies belegt eine evolutiv frühe Etablierung dieser Sequenz. Dies macht eine Spaltung in diesem Bereich auch für die anderen Testicane wahrscheinlich. Experimente mit den entsprechenden Testican-3 Isoformen (± EVE) in HT1080 Zellen konnten diese Vermutung aber nicht bestätigen (Daniel Hechler, Diplomarbeit).

3.3 Interaktionen von SMOC-1 mit Basalmembranproteinen

Basalmembranen sind üblicherweise zwischen 40 und 120 nm dick und bestehen aus einer überschaubaren Anzahl struktureller Komponenten (Kollagen IV, verschiedene Laminine, Nidogen-1 (Entactin), Perlecan). Sie trennen Zellen oder Zellverbände vom sie umgebenden Bindegewebe und übernehmen neben strukturellen auch viele regulatorische Funktionen. Aus Vorarbeiten war bekannt, dass SMOC-1 in fast allen untersuchten Geweben integraler Bestandteil der Basalmembran ist. Nur in der follikulären Basalmembran der Ovarien konnte kein SMOC-1 detektiert werden. Dafür ist SMOC-1 in diesem Gewebe Bestandteil der Zona Pellucida (Glashaut), einer die Oocyte umschließenden Schicht aus Glykoproteinen, die über Interaktionen mit dem Spermium u.a. die Akrosomreaktion auslöst und damit einen entscheidenden Einfluss auf die Befruchtung hat. In dieser Arbeit wurde anhand von Bindungsstudien mit dem Luminex System eine Interaktion von SMOC-1 mit Laminin-1 und einem aminoterminalen Fragment der vierten Perlecandomäne (PIV-1) gezeigt. Die Bindung

ist in beiden Fällen stark und die Dissoziationskonstanten liegen im niedrigen nanomolaren Bereich. Die Bindung von SMOC-1 an Laminin-1 und das Perlecanfragment PIV-1 wurde anschließend mittels Oberflächen Plasmon Resonanz im BIACORE System untersucht. Die Interaktionen konnten bestätigt werden, der Massenzuwachs an der Goldoberfläche war aber für eine kinetische Analyse der Bindung in beiden Fällen zu gering. Beim Perlecanfragment PIV-1 lag dies daran, dass nur geringe Mengen des Proteins zur Verfügung standen. Bei den Messungen mit Laminin-1 bestand das Problem darin, dass ab Konzentrationen von mehr als 3 nM abnorme Kurvenverläufe zu beobachten waren. Dies wurde auf Massentransportprobleme an der Chipoberfläche zurückgeführt. Solche Probleme lassen sich oft durch eine Erhöhung der Flussgeschwindigkeit im BIACORE System und einer Reduzierung der immobilisierten Menge an Protein (hier SMOC-1) auf der Chipoberfläche beheben. Leider führten beide Maßnahmen im Falle der Interaktion von SMOC-1 mit Laminin-1 zu keinem Erfolg.

Es stellt sich die Frage nach der biologischen Bedeutung der für SMOC-1 beobachteten Interaktionen mit Laminin-1 und Perlecan. Zudem ist interessant, ob das Fehlen von SMOC-1 in der follikulären Basalmembran auf eine Abwesenheit von Interaktionspartner in der follikulären Basalmembran zurückgeführt werden kann. Die strukturelle Zusammensetzung der follikulären Basalmebran ist abhängig vom Reifegrad des Follikels. In allen Reifestadien (primordial, preantral, antral) vorhandene Komponenten sind Kollagen IV (α1, α2) und die Laminin Ketten α1, β2 und γ1. Interessanterweise konnte das aus diesen Ketten zusammengesetzte Laminin-3 Molekül bisher nicht in der follikulären Basalmembran gefunden werden (zur Übersicht siehe Rodgers et al., 2003). Für SMOC-1 wurde eine Bindung an Laminin-1 gezeigt. SMOC-1 bindet folglich entweder an eine der Laminin-1 Ketten (α1, β1, γ1) oder es bindet an das zusammengesetzte Laminin-1 Molekül. Da bisher kein zusammengesetztes Laminin Molekül in der follikulären Basalmembran gefunden wurde und die β1-Kette des Laminin nur für einen kurzen Zeitraum im preantralen Follikel exprimiert wird, würde eine Bindung von SMOC-1 an die β1-Kette des Laminin-1 oder nur an zusammengesetzte Laminin Molekül die Abwesenheit in der follikulären Basalmembran erklären. Da in preantralen und antralen Follikeln aber Perlecan exprimiert wird (zur Übersicht siehe Rodgers et al., 2003), ist die fehlende Präsenz von SMOC-1 in der follikulären Basalmembran nicht durch fehlenden Interaktionspartnern zu erklären. In *Abb. 1.4.2* sind die wichtigsten strukturbildenden Komponenten der Basalmembran schematisch dargestellt. Ein Netzwerk aus Kollagen IV wird über das Adaptermolekül Nidogen (Entactin) mit einem Lamininnetzwerk verknüpft. Zusätzliche Stabilität erhält dieses Netzwerk über Interaktionen zwischen Perlecan und Laminin-1. Die Perlecan

Laminin Interaktionen werden über die Heparansulfat Ketten der Perlecan Domäne I und V und dem Aminoterminus der Laminin α1-Kette vermittelt (Ettner et al., 1998). Für SMOC-1 konnten starke Interaktionen mit zwei dieser Komponenten gezeigt werden. Dabei interagiert SMOC-1 mit Laminin-1 und einem aminoterminalen Fragment der vierten Perlecandomäne (PIV-1). Da SMOC-1 (bindet PIV-1) und Laminin-1 (bindet PI und PV) nicht um die gleiche Bindungsstelle im Perlecan konkurieren, wäre SMOC-1 ein geeignetes Adaptermolekül für eine zusätzliche Verknüpfung des Laminin-netzwerks an Perlecan. Sollte SMOC-1 tatsächlich eine strukturelle Funktion in der Basalmembran übernehmen, würde man erwarten, dass es dort in großen Mengen vorkommt. Über die Menge an SMOC-1 in Basalmembranen ist bisher noch nichts bekannt. Eine solche Adapterfunktion vorausgesetzt, könnte das Fehlen von SMOC-1 in der follikulären Basalmebran erklären. Da dort beständig nur eines (Perlecan) der von SMOC-1 verbundenen Moleküle (Perlecan und Laminin-1) vorkommt, könnte das Fehlen eines durch den Adapter (SMOC-1) verbundenen Moleküls (Laminin-1) auch die Abwesenheit des Adapters (SMOC-1) selbst erklären. Die Aufklärung der zellulären Herkunft (Follikel, Granulosa- oder Thecazellen) von SMOC-1 in den Ovarien könnte erklären, warum SMOC-1 nicht an das in der follikulären Basalmembran vorhandene Perlecan bindet, sondern als integraler Bestandteil der Zona Pellucida gefunden wird.
Regulatorische Aufgaben wie für BM-40 beschrieben, wären für SMOC-1 ebenfalls denkbar. Allerdings gibt es zum jetzigen Zeitpunkt keinerlei Hinweise auf eine solche Funktion.

3.4 Ausblick

Die in dieser Arbeit dokumentierten Daten geben erste Hinweise auf eine mögliche Bedeutung von Testican-2 *in vivo* (Fertilität, Herzentwicklung, Größe der Alveolen). Notwendige Folgeuntersuchungen zum Schweregrad der Erkrankung anhand von histologischen Schnitten und funktionale Tests sollen folgen. Mögliche funktionale Verbindungen zu anderen Proteinen wurden genannt. Da es zu Beginn meiner Arbeit keinerlei Anhaltspunkte zur Funktion von Testican-2 *in vivo* gab und das Protein eine breite Gewebeverteilung aufweist, wurde ein in die Breite angelegter experimenteller Versuchsablauf gewählt. Makroskopischen und morphologischen Untersuchungen schlossen sich histologische Untersuchungen der inneren Organe an. Aus diesem Grund fehlen bisher detailliertere Analysen (physiologische Veränderungen, molekularer Phänotyp) einzelner Organe. Solche Untersuchungen sollen aber folgen. Dabei sind in erster Linie die Gewebe interessant, für die bereits histologische Veränderungen vermutet werden (Herz, Lunge, Gonaden). Da die Mäuse der ersten F1

Generation einen gemischten genetischen Hintergrund besitzen (129/Ola und C57Bl/6) wurden die Mäuse zur Verminderung der Varianz bisher sechs Mal mit C57Bl/6 Mäusen zurückgekreuzt. Die in den dilatierten Herzen beobachteten Unterschiede im Schweregrad des Krankheitsbildes sind eventuell auf eine solche Varianz zurückzuführen. Dass die Mäuse auf den C57Bl/6 Hintergrund zurückgekreuzt werden und nicht auf den Mausstamms 129/Ola hängt mit geplanten verhaltensbiologischen Tests zusammen. Da Testican-2 auch in vielen Gehirnregionen vorkommt, ist ein Verhaltensphänotyp in Testican-2 defizienten Mäusen denkbar. Da Mäuse des Stamms 129, von welchem die manipulierten ES Zellen abstammen, ein im Vergleich zu C57B/6 Mäusen schlechtes räumliches Lernvermögen aufweisen, werden für Verhaltensstudien bevorzugt C57Bl/6 Mäuse eingesetzt (Gerlai, 1996). Aus diesem Grund wurden die Mäuse mit gemischtem genetischem Hintergrund auf den reinrassigen Hintergrund des Mausstamms C57Bl/6 zurückgekreuzt.

Eine Problematik bei der Analyse defizienter Mäuse besteht darin, dass biologische Funktionen oft von mehreren Proteinen wahrgenommen werden. Eine Kompensation der Funktion von Testican-2 durch eines der anderen Testicane ist vorstellbar. Wie in der Einleitung erwähnt, ist die Inaktivierung des Testican-2 Gens in der Maus Teil eines Projekts, bei dem alle drei Testicane inaktiviert werden sollen. Dies ermöglicht neben der Analyse der einfach defizienten Tiere auch die Aufdeckung der Funktionen, die von mehr als einem der Proteine übernommen werden. Ein Beispiel für eine von mehreren nah verwandten Proteinen übernommene Funktion stellt die aus drei Mitgliedern bestehende Tyro-3 Rezeptorfamilie (Tyrosin Kinasen) dar. Die Inaktivierung von einem oder zwei der Gene führte zu keinem erkennbaren Phänotyp. Nach Inaktivierung aller drei Gene waren die Mäuse nicht mehr in der Lage, reife Spermien zu produzieren (Lu et al., 1999). Testican-1 und Testican-3 defiziente Mäuse wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits generiert (Sandra Röll, Dissertation) und mit der Generierung von Testican-1/ Testican-3 doppelt defizienten Mäusen wurde begonnen.

4. Material und Methoden

4.1 Material

Die Chemikalien hatten die Qualität *pro analysis* und wurden, falls nicht anders angegeben von den Firmen Merck, Fluka, Sigma, Gibco™ oder Roche bezogen. Alle eingesetzten Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs bezogen. Zum Ansetzen aller Lösungen wurde entionisiertes Wasser aus einer Reinstwasseranlage von Millipore verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Methoden bei Raumtemperatur durchgeführt.

4.1.1 Puffer

Nicht aufgeführte Puffer werden im Kaptel Methoden beschrieben oder sind Verdünnungen bzw. Gemische aus den hier angegebenen Puffern.

PBS:
8,4 mM Na_2HPO_4
1,5 mM NaH_2PO_4
137 mM NaCl
2,7 mM KCl
Einstellen des pH-Wertes von 7,4 mit HCl

TBS:
50 mM Tris/HCl, pH 7,4
150 mM NaCl
Einstellen des pH-Wertes von 7,4 mit HCl

TBS/ NP-40:
150 mM NaCl
50 mM Tric/ HCl ph 7,4
2 mM EDTA
1% NP-40
Proteinaseinhibitor (*Complete*, Roche)
(1 Tablette in 2 ml H_2O gelöst und 1:25 eingesetzt)

TE:
10 mM Tris-Cl; pH 8,0
1 mM EDTA

10 x TBE:	890 mM Tris-Cl, pH 7,5
	890 mM Borsäure
	50 mM EDTA
20 x SSC:	3 M NaCl
	300 mM Na_3 Citrat
	Einstellen des pH-Wertes von 7,0 mit HCl
Depurinierungslösung (GS0):	250 mM HCl
	1,5 M NaCl
Denaturierungslösung (GS1):	500 mM NaOH
	1,5 M NaCl
Neutralisierungslösung (GS2):	500 mM Tris-Cl
(pH 8,0)	1,5 M NaCl
20 x SSPE:	3 M NaCl
	200 mM NaH_2PO_4*$2H_2O$
	20 mM EDTA
Formamid-Mix:	5 x Denhardt's
	1,5 % (w/v) SDS
	50 % (v/v) Formamid
	5 % (v/v) SSPE
Prähybridisierungslösung:	Formamid-Mix + 200 µg/ ml *salm sperm* DNA
Hybridisierungslösung:	Formamid-Mix + 100 µg/ ml *salm sperm* DNA
Oligo-Hybridisierungslösung:	5 x Denhardt's
	7 x SSC (pH 7,0)
	5 mM $NaPO_4$
	+ 200 µg/ ml *salm sperm* DNA

DNA-Probenpuffer (10x): 80 % (w/v) Glycerin
0,1 % (w/v) Bromphenolblau
0,1 % (w/v) Xylencyanol
10 mM Tris/HCl pH 8,0
50 mM EDTA

RNA-Probenpuffer (10x): 50% Glycerin
0,4 % (w/v) Bromphenolblau
1 mM EDTA

2 x Probenpuffer (Proteine): 50 % (w/v) Glycerin
2 % SDS
0,5 % Bromphenolblau
50 mM Tris/ HCl pH 6,8
(reduzierend: + 4 % (v/v) β-Mercaptoethanol

Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris/ HCl
(SDS Page) 192 mM Glycin
0,1 % (w/v) SDS

1 x Blotpuffer (Proteine): 50 mM Borsäure pH 8,5
10 % Methanol

4.1.2 Kulturmedien und Zellen

LB Medium: 1 % (w/v) NaCl
0,5 % (w/v) Hefe Extrakt
1,5 % (w/v) Pepton

Bakterien: *Escherichia coli* (DH5α: *end*A1, *syr*A96, *hds*R17(rk^-m mk^+), *sup*E44, *thi*-1, *rec*A1, *rel*A1, (Δ*lac-pro*AB), (F', *tra*D36, *pro*AB, *lac*I^q ZΔM15))

Zellkulturmedium (Standard): DMEM (high Glucose)
10% (v/v) FCS
2 mM Glutamin
je 100 U/ ml Penicillin und Streptomycin

C2F3 Zellen:	DMEM (high Glucose) 20% (v/v) FCS 2 mM Glutamin je 100 U/ ml Penicillin und Streptomycin
NG108 Zellen:	DMEM (high Glucose) 10% (v/v) FCS 2 mM Glutamin 1 x HAT *Media Supplement* je 100 U/ ml Penicillin und Streptomycin
ES Zell Medium:	DMEM (*high Glucose*) 20% *serum replacement* 1 mM β-Mercaptoethanol 1 x MEM (*non essentiel amino acids*) 1 mM Na-Pyruvat 2 mM Glutamin 1500 U/ ml LIF je 100 U/ ml Penicillin und Streptomycin
2x Einfriermedium:	33 ml des entsprechenden Zell Mediums 10 ml DMSO 7 ml FCS bzw. *serum replacement* (ES Zell Kultur)

4.1.3 Weitere Verbrauchsmaterialien

Agarose:	SeaKem® (Biozym); NuSieve 3:1 (BMA, Rockland, USA)
Plasmide:	pBluescript II (KS) (+) (Stratagene) pEGFP-N1 (Clontech) pCEP-Pu (Kohfeldt et al, 1997) (+ N-terminalem His_6-Myc-Faktor X)

Oligonukleotide:

Ex 1s	5'-AAGTGCATCTGCTAACCAGG-3'
Ex 1a	5'-CCAGTGCTTAATCTTGCCGC-3'
Ex 10a	5'-ATGCGTGTGCCGGTCAGC-3'
mEx 1s (EVE)	5'-CGGCAATTTCATGGAGGACG-3
mEx 3a (EVE)	5'-TCCTTGCTGATTGTCTTCCC-3
hEx 1s (EVE)	5'-CAATTTCATGGAGGACGAGC-3'
hEx 3a (EVE)	5'-CATCTCCTTGCTGATTGTCC-3'
I (5'-Arm)	5'-GATACAAGCTACAGGCATCTGGGAAGAGG-3'
II (5'-Arm)	5'-AATGGTCAACCAGGGTCCACAGTGTCTACC-3'
III (5'-Arm)	5'-CTGCCTTCCTCTTAAAGGTGGATACTGACC-3'
Neo/ a	5'-TGCTAAAGCGCATGCTCCAGACTGCCTTGG-3'
Neo/ b	5'-ATTGCATCAGCCATGATGGATACTTTCTGG-3'
Neo/ c	5'-AGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGG-3'
5' (s)	5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'
3' del (a)	5'-AGCTCTTGATGTAATCATCGTCTCGGAAGCGGTTC-3'
5' del (s)	5'-GAACCGCTTCCGAGACGATGATTACATCAAGAGCT-3'
3' mut (a)	5'-GGTGGATCCGCCCAGATGTAGCCTCCATC-3'

Proteasen/ Inhibitoren: Proteinase K (Sigma)
Trypsin (Gibco^{TM})
Trypsininhibitor (Gibco^{TM})
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)

Luminex Materialien: N52 Polystyren Beads Ni-NTA
Penta His Alexa Fluor 532 Antikörper
goat anti rabbit Alexa 532 Antikörper
(Qiagen)

Antikörper: *rabbit-anti-mouse* Testican-2 (affinitätsgereinigt, siehe Anke Schnepp, Dissertation)
swine-anti-rabbit IgG-HRP (*horse raddish peroxidase*) (DakoCytomation)

ECL:	100 mM Tris/ HCl pH 8,5	
(*enhanced chemo-*	1,25 mM Luminol	
luminescence Lösung)	225 nM Cumarin	
	0,03% H_2O_2	
Radiochemikalien:	[α-^{32}P] dCTP	110 TBq/ mmol
	[γ-^{32}P] ATP	110 TBq/ mmol
	(Hartmann Analytic)	

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Isolierung genomischer DNA aus ES Zellen und Mausschwanzbiopsien

Die ES Zellen zur DNA Gewinnung wurden auf murinen embryonalen Fibroblasten in DMEM Standardmedium kultiviert. Vor der DNA Präparation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS (*Phosphate Buffer Saline*) gewaschen. Anschließend wurden die ES Zellen in 300 µl Lysis Puffer (10 mM Tris pH 8,0/ 10 mM EDTA pH 8,0/ 10 mM NaCl/ 0,5% (v/v) N-Laurylsarcosin/ 4 mg/ ml Proteinase K(frisch zugesetzt)) aufgenommen und in einem 1,5 ml Reagiergefäß ü/N bei 60 °C im Wasserbad inkubiert. Die DNA-haltige Lösung wurde mit dem gleichen Volumen eines Phenol/ Chloroform (1:1) Gemischs versetzt und durchmischt. Das Gemisch wurde für 1 min. bei höchster Drehzahl in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und die obere Phase abgenommen. Dieser Schritt wure ein zweites Mal wiederholt. Anschließend wurde die obere Phase nochmals abgenommen und mit einem äquivalenten Volumen an Chloroform versetzt. Das Ganze wurde wieder durchmischt, zentrifugiert und die obere Phase mit einem 2,5 fachen Volumen Ethanol gefällt. Die Fällung wurde für 5 min. bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann für 10 Minuten bei maximaler Drehgeschwindigkeit zentrifugiert. Das DNA Pellet wurde in 70% Ethanol gewaschen, unter den gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert und der Ethanol abgegossen. Anschließend wurde das Pellet in 50 µl H_20 aufgenommen und etwaige Ethanolreste in einem Heizblock bei 60 °C verdampft. Für die Genotypisierung mittels Restriktionsanalyse und Southern Blot wurde jeweils 15 µl dieser DNA eingesetzt. Für die Genotypisierung mittels der PCR 3 µl DNA.

Für die DNA Gewinnung aus Mausschwanzbiopsien wurden etwa 0,5 cm Mausschwanzspitze in 500 µl Lysis Puffer (100 mM Tris pH 8,0/ 5 mM EDTA pH 8,0/ 200 mM NaCl/ 0,2% SDS (w/v)/ 0,6 mg/ ml Proteinase K) in einem 1,5 ml Reagier-

gefäß ü/N bei 60 °C im Wasserbad inkubiert. Die DNA Gewinnung erfolgte analog der DNA Gewinnung aus ES Zellen. Im Unterschied zu den ES Zellen wurde die DNA jedoch in 100 µl Volumen H_2O aufgenommen. Die eingesetzten DNA Mengen entsprechen denen der Genotypisierung der ES Zell DNA.

4.2.2 Native Gelelektrophorese

Je nach gewünschtem Auftrennungsbereich wurden unterschiedliche Mengen Agarose in 1 x TBE Puffer aufgekocht und unter Rühren auf etwa 50 °C abgekühlt. Der noch flüssigen Agarose wurde Etidiumbromid zugegeben (Endkonzentration von 0,5 µg EtBr/ ml Gel). Nach Überschichtung des Gels mit Laufpuffer (1x TBE) wurde die DNA in 1x Probenpuffer in einer horizontalen Gelkammer bei Spannungsstärken von 3,5 V/ cm getrennt. Die Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente wurde durch parallel aufgetragene Marker-DNA (kb-Leiter) bestimmt. Die Trennung der RT-PCR Produkte zur Darstellung des alternativen Spleissens von Exon 2 erfolgte in einem 4% Agarosegel (NuSieve 3:1) und bei einer Spannung von 17 V/ cm im Kühlraum bei 4 °C. Alle 10 Minuten wurde dabei der erwärmte Laufpuffer ausgewechselt.

4.2.3 Southern Blot Analyse

Dieses Verfahren beschreibt den Transfer von DNA aus Gelen auf Membranen. Das ursprünglich im Gel erhaltene Trennmuster bleibt dabei erhalten. Vor dem Southern Blot wird das Agarosegel zusammen mit einem Lineal fotografiert. Dies ist nötig, damit den auf der Membran markierten Fragmente später die DNA-Größen zugeordnet werden können. Der Vorgang der Southern Blot Analyse kann in drei Schritte unterteilt werden (Southern, 1975):

1. Vorbehandlung des Gels
2. Transfer der DNA aus dem Gel auf die Membran
3. Fixierung der DNA auf der Membran

Im ersten Schritt wurde das Gel für 15 Minuten in GS0 Lösung auf einem Schüttler geschwenkt. Hierbei depuriniert die DNA, wodurch sie sich später leichter aus dem Gel löst. Zur Denaturierung der DNA wurde das Gel für etwa 30 Minuten in GS1 Lösung geschwenkt und danach nochmals für 5 Minuten in GS2 Lösung, was die einzelsträngige DNA neutralisiert. Im zweiten Schritt wird die DNA mit Hilfe der Southern-Blot Apparatur auf eine Trägermembran (Roti-Nylon Plus, Roth) transferiert. Der Transfer der DNA erfolgte aufgrund von Kapillarkräften in 20 x SSC für einen Zeitraum von16 Stunden. Anschließend wurde die Membran kurz in 2 x SSC gewaschen und anschließend getrocknet.

4.2.4 Radioaktive Markierung von DNA

Radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA:

Die radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem *Ladderman™ Labelling* Kit (Takara Shuzo Co. Ltd.). Dieses Kit verlangt den Gebrauch von [α-^{32}P]dCTP. Nicht in die DNA eingebaute Nukleotide wurden von der markierten DNA mit Hilfe einer Nick-G50 Säule (Pharmacia) nach Angaben des Herstellers chromatographisch getrennt. Die markierte doppelsträngige DNA wurde durch Aufkochen denaturiert und der Hybridisierungslösung zugesetzt.

Endmarkierung von Oligonukleotiden:

Jeweils 5 pmol nicht phosphorylierter Oligonukleotide wurden mit Hilfe der T4 Polynukleotidkinase unter Verwendung von [γ-^{32}P] ATP an ihrem 5'-Ende markiert.

Standardansatz:	5 pmol Oligonukleotid
	1,5 µl 10 x T4 Polynukleotidkinase Puffer
	2,5 µl [γ-^{32}P]ATP (1MBq)
	1,0 µl T4 Polynukleotidkinase
	ad 15 µl H_2O

Dieser Ansatz wird für 30 Minuten bei 37° C im Wasserbad inkubiert und anschließend an die radioaktive Markierung direkt zu der Hybridisierungslösung gegeben.

4.2.5 Hybridisierung membrangebundener DNA oder RNA mit radioaktiv markierten Sonden

Allgemein:

Mit Prähybridisierungslösung wurden die freien Bindungskapazitäten auf der Membran abgesättigt. Anschließend wurde die Membran in 10 ml Hybridisierungslösung mit einer radioaktiv markierten Sonde über Nacht inkubiert (42 °C).

Hybridisierung mit radioaktiv markierter DNA:

Die Hybridisierung erfolgte in Glasröhren bei 42° C mit 10 ml Hybridisierunglösung (bzw. Oligohybidisierungslösung bei endmarkierten Oligonukleotiden) in einem Hybridisierungsofen. Anschließend wurde die Membran in mehreren Schritten gewaschen. Die Waschlösung hatte dabei immer eine Temperatur von 65 °C. Es wurde immer eine SSC haltige Waschlösungen mit 0,1% SDS (w/v) verwendet. Dabei wurde der Anteil an SSC nach jedem Waschschritt so lange gesenkt (von 5 x SSC bis maximal 0,1 x SSC), bis die Membran etwa 10-20 gezählte Impulse/ Sekunde aufwies.

Um ein Gefühl für den Fortschritt der Arbeit zu bekommen, wurde zwischen den Einzelschritten die verbrauchte Waschlösung und die Membran mit dem Geiger-Müller Zähler auf ihre Radioaktivität hin vermessen. Zum Schluß wurde die Membran in eine Haushaltsfolie eingewickelt, in einer Röntgenkassette fixiert und ein Röntgenfilm aufgelegt. Bei der Genotypisierung von genomischer DNA wurde zwischen zwei und vier Tagen exponiert. Bei der radioaktiven Markierung von PCR Produkten mittels endmarkierten Oligonukleotiden aufgrund größerer Mengen der zur Probe komplementären DNA auf der Membran nur zwischen 5 und 30 Minuten.

4.2.6 Isolierung von Gesamt RNA aus Geweben

Das frisch präparierte Gewebe wurde auf Trockeneis schockgefroren, in einem zehnfachen Volumen eisgekühltem Trizol (Invitrogen) aufgenommen und mit einem Gewebe Homogenisator (TH-220, OMNI International) homogenisiert (ca. 1-2 Minuten). Nach 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden 0,2 ml Choroform/ ml Trizol dazugegeben, das Gemisch geschüttelt und erneut für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation für 15 Minuten bei 15000 g (4 °C) wurde die obere wässrige Phase in ein Reagiergefäß überführt und 0,5 ml Isopropanol/ ml Trizol dazugegeben. Nach Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde erneut für 15 Minuten bei 15000 g (4 °C) zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in einem Milliliter 75% Ethanol resuspendiert und für 5 Minuten bei 15000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet an der Luft getrocknet und zum Schluss in 100 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Die nicht sofort verwendete RNA wurde in einer Ehanolfällung (80%) bei -80 °C gelagert.

4.2.7 Isolierung von mRNA aus Gesamt RNA

Die mRNA wurde aus Gesamt RNA (siehe Kapitel 4.2.7) nach Herstellerangaben mit dem Oligotex® mRNA MidiKit (Qiagen) präpariert.

4.2.8 Denaturierende Gelelektrophorese

Dazu wurden 0,9 g Agarose mit 7,5 ml 10 x MOPS Puffer (20 mM MOPS/ 50 mM NaAcetat pH 7,0) und 54,1 ml DEPC-Wasser aufgekocht und auf 60 °C heruntergekühlt. Anschließend wurden noch 13,4 ml Formaldehydlösung hinzu gegeben, das Gel in eine horizontale Gelkammer gegossen und mit Laufpuffer (6% Formaldehyd/ 1 mM EDTA in MOPS Puffer pH 7,0) überschichtet. Die RNA Proben wurden in Probenpuffer (1 Volumen RNA + 2,8 Volumen Master-Mix (100 µl Formamid/ 40 µl Formaldehyd/ 30 µl MOPS (10x)/ 2 µl EtBr)) für 15 Minuten bei 60 °C denaturiert,

anschließend für 2 Minuten auf Eis gestellt und mit 10 x RNA Blaumarker versetzt. Das Gemisch wurde in einem 1,2 % Agarsegel elektrophoretisch getrennt. Als Marker wurde eine *High Range RNA Ladder* (SM0421, Fermentas) eingesetzt.

4.2.9 Northern Blot Analyse

Der Transfer der DNA auf die Nylonmembran (Hybond-N, Amersham) erfolgte analog dem Southern Blot Verfahren. Die RNA auf der noch feuchten Membran wurde mittels UV Licht kovalent an diese gebunden. Die Hybridisieung erfolgte mit radioaktiv markierter DNA wie in 4.2.5 beschrieben.

4.2.10 Reverse Transkription

Ausgehend von 2 µg Gesamt RNA wurde mittels Oligonkleotiden, die kurz vor ihrem 3' Ende eine Abfolge von 30 Thyminen hintereinander aufweisen (Oligo-dT-Primer) und dem Enzym Reverse Transkiptase (Superscript II, Invitrogen) polyadenylierte mRNA in DNA umgeschrieben. Dazu wurden 2 µg RNA zusammen mit 25 µM Oligo-dT-Primern mit DEPC Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12 µl aufgefüllt, für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert und direkt für 2 Minuten auf Eis gestellt. Dem Reaktionsansatz wurden 100 *Units* Reverse Transkriptase, 4 µl Superscript Puffer (5x), 40 Units µl RNase Inhibitor (Roche), 40 mM dNTPs (je 10 mM dATP, dGTP, sCTP, dTTP (Amersham) und 2 µl 0,1% DTT zugesetzt. Anschließend wurde für 50 Minuten bei 42 °C inkubiert, das Enzym durch einen Hitzeschock (10 Minuten bei 72 °C) inaktiviert und die cDNA bei -20 °C verwahrt.

4.2.11 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR lassen sich unter Verwendung geeigneter Oligonukleotide *in vitro* spezifische DNA Fragmente amplifizieren. In dieser Arbeit wurden insgesamt drei (A-C) verschiedene PCR Ansätze verwendet.

A) Genotypisierung genomischer Mausschwanz DNA im Bereich von Exon 1:

3 µl DNA
5 µl Taq-Puffer (10x)
5 µl 0,2% Gelatine
2 µl W1 (Gibco)
2 µl dNTPs (je 10 mM)
1 µl DMSO
0,6 µl Ex1s Oligonukleotid (60 pM)
0,6 µl Neo/b Oligonukleotid (60 pM)
0,2 µl Ex 1a Oligonukleotid (20 pM)
1,0 µl Taq-Polymerase (3,5 Units)
ad 50 µl ddH_2O

B) Genotypisierung genomischer ES Zell DNA (Integration des 5' Arms):

3 µl DNA
5 µl Expand-Polymerase Puffer 1 (10x)
2 µl dNTPs (je 10 mM)
0,6 µl *sense* Oligonukleotid (I $\vee$ II $\vee$ III, siehe *Abb. 2.2.2*)
0,6 µl antisense Oligonukleotid (a $\vee$ b $\vee$ c, siehe *Abb. 2.2.2*)
0, 4 µl Expand-Polymerase (1 *Unit*)
ad 50 µl ddH_2O

C) *In vitro* Mutagenese und Amplifikation von spezifischen cDNA Sequenzen:

1 µl DNA
5 µl Taq-Polymerase Puffer (10x)
5 µl 0,2% Gelatine
2 µl W1 (Gibo)
2 µl DMSO
2 µl dNTPs (je 10 mM)
0,6 µl *sense* Oligonukleotid
0,6 µl *antisense* Oligonukleotid
1 µl Taq-Polymerase (3,5 *Units*)
ad 50 µl ddH_2O

Es wurden zwei verschiedene Temperaturprogramme angewandt, die sich für die entsprechenden PCRs (A-C) in der Synthesetemperatur, Synthesedauer und der Temperatur für die Bindung der Oligonukleotide unterscheiden.

1) Gradienten PCR (A/B)	1)	95 °C	3 Minuten
	2)	95 °C	30 Sekunden
	3)	57 °C	30 Sekunden
	4)	72 °C (A)/ 68 °C (B)	1 Minute/ 700 Nukleotide (nt)
	5)	zurück zu 2 (9x) Schritt 3 -0,5 °C/ Zyklus	
	6)	95 °C	30 Sekunden
	7)	52 °C	30 Sekunden
	8)	72 °C bzw. 68°C	1 Minute/ 700 Nukleotide (nt)
	9)	zurück zu 6 (24x) Schritt 8 +10 Sekunden/ Zyklus	
	10)	72 °C/ 68 °C	40 Minuten
	11)	6 °C	bis zur Verwendung
2) Standard PCR (C)	1)	95 °C	3 Minuten
	2)	95 °C	30 Sekunden
	3)	variabel *	30 Sekunden
	4)	72 °C	1 Minute/ 700 Nukleotide (nt)
	5)	zurück zu 2 (30x bei cDNA Amplifikation/ *in vitro* Mutagenese variabel, siehe nächstes Kapitel)	
	6)	72 °C	10 Minuten
	7)	6 °C	bis zur Verwendung

* Die Bindungstemperatur lag immer 4 °C unter der berechneten Schmelztemperatur des Oligonukleotids mit der geringeren Schmelztemperatur.

4.2.12 *In vitro* Mutagenese

Zur Generierung der verschiedenen Testican-2 Isoformen (mit Exon 2 bzw. ohne Exon 2) wurde eine *in vitro* Mutagenese mittels PCR angewandt. Das exprimierte Testican-2 sollte mit GFP (*green fluorescent protein*) fusioniert sein. Damit ein solches Fusionsprotein entstehen kann, ist es notwendig, das Stopcodon des nach der Expression aminoterminal gelegenen Proteins zu mutieren. Die Testican-2-GFP Konstrukte sollten über eine EcoR I und eine BamH I Restriktionsschnittstelle in den Expressionsvektor (pEGFP-N!, Clontech) kloniert werden.

Für die Mutagenese wurde der Testican-2 cDNA Klon 21#1 verwendet. Das Insert befindet sich flankiert von zwei EcoR I Schnittstellen im Klonierungsvektor pBS(KS) und enthält neben dem kompletten codierenden Bereich auch Teile der 5' und 3' nicht codierenden Region. Mutation und Amplifikation der Zielsequenz wurden in drei voneinander getrennten Schritten durchgeführt (siehe Abb. 4.2.12). Die verwendeten Oligonukleotide waren bis auf die gewünschten Veränderungen zur verwendeten Testican-2 cDNA Vorlage komplementär. Das nur neun Basenpaare große Exon 2 wurde in zwei voneinander unabhängigen Reaktionen deletiert. Die verwendeten Oligonukleotide 5' del (s) und 3' del (a) sind, bis auf das Exon 2 selbst, dem Bereich um dieses Exon herum komplementär. Das Oligonukleotid 5' (s) ist auf seiner ganzen Länge komplementär zur Sequenz des Testican-2 cDNA Klons 21#1 und das Oligonukleotid 3' mut (a) enthält das mutierte Stopcodon und die Erkennungssequenz für das BamH I Restriktionsenzym.

In einer ersten Reaktion wurde mittels der Oligonukleotide 5' (s) und 3' del (a) ein 456 bp großes Fragment generiert, welches die 5' gelegene EcoR I Schnittstelle und die cDNA Sequenz inklusive der ersten 19 bp von Exon 3, aber exklusive Exon 2 enthält (siehe Abb. 4.2.12 B). In einer parallel durchgeführten Reaktion wurde mittels der Oligonukleotide 5'del(s) und 3'mut(a) ebenfalls Exon 2 deletiert und ein 1098 bp großes Fragment erzeugt, welches die cDNA Sequenz 3' der letzten 16 bp von Exon 1 sowie das mutierte Stop Codon einschließlich der am 3' Ende eingefügten BamH I Schnittstelle enthält. Beide Konstrukte sind in einem Bereich von 35 bp (19 +16) komplementär (siehe Abb. 4.2.12 B). Um die gewünschten Fragmente vom im Reaktionsgemisch vorliegenden Ursprungsklon (cDNA Klon 21#1) zu trennen, wurden beide PCR Produkte auf einem 1% Agarosegel elektrophoretisch getrennt, die gewünschten Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert. Zur Generierung der gewünschten Volllänge Sequenz wurden in einem dritten Ansatz beide entstandenen Fragmente mehrfach (5x) hitzedenaturiert und jeweils an ihrem 3' Ende verlängert.

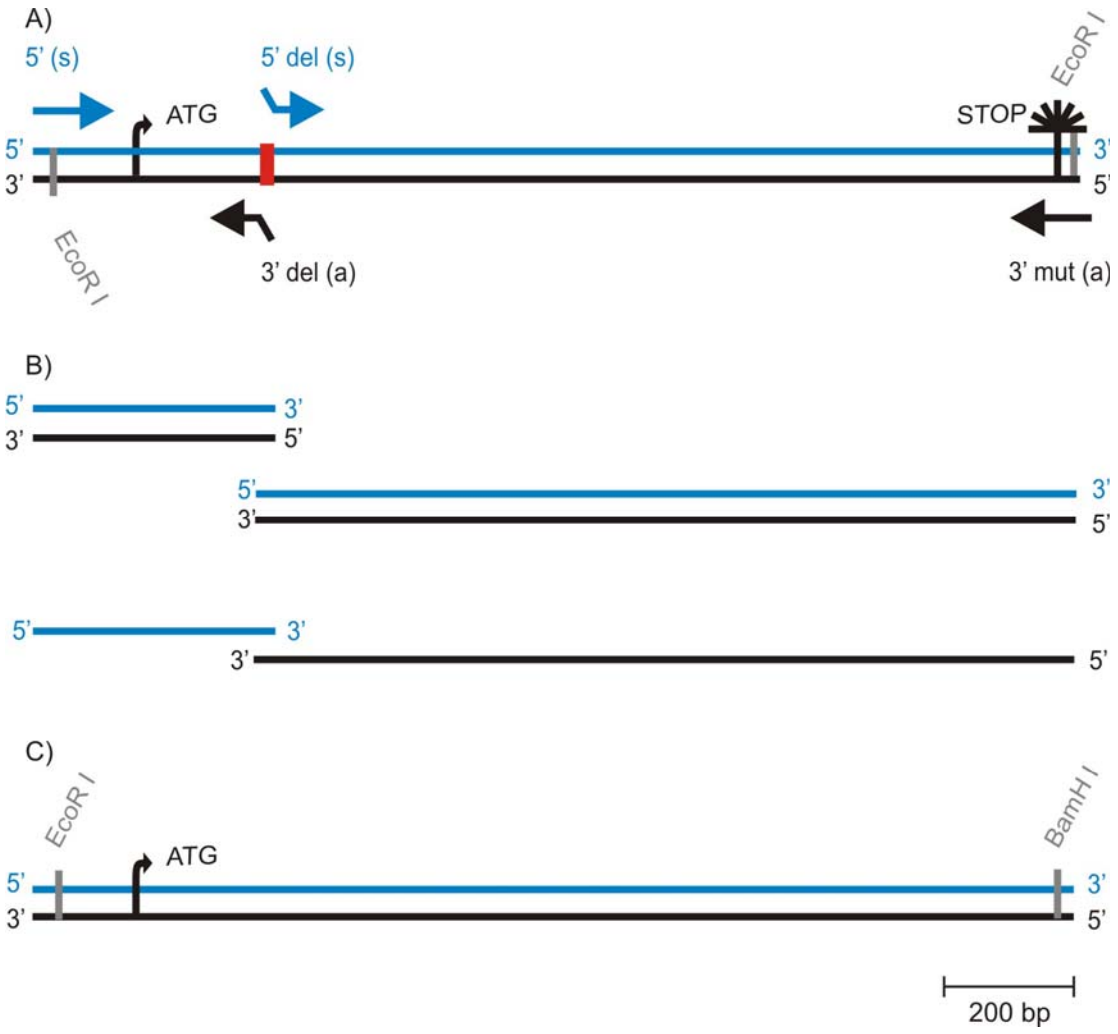


Abb. 4.2.12: **Deletion des neun Basenpaare großen Exons 2 im murinen Testican-2 cDNA Klon 21#1.** A) Übersichtsgrafik des murinen Testican-2 cDNA Klons 21# 1 einschließlich der für die Deletion von Exon 2 verwendeten Olignukleotide. Der codierende (*sense*) Strang ist blau, der nicht codierende Strang schwarz dargestellt. Die schwarzen Balken markieren die Position der EcoR I Schnittstellen. Die orange Box markiert die Position von Exon 2. ATG = Translationsstart, STOP = Position des Stop Codon, 5' (s), 3' del (a). 5' del (s) und 3' mut (a) markieren die Position der Oligonukleotide [(s) steht hierbei für *sense*, (a) für *antisense*]. Dass nur neun Basenpaare große Exon 2 und die Oligonukleotide sind zur besseren Erkennung vergößert dargestellt.
B) In der oberen Grafik sind die beiden PCR Produkte aus A abgebildet, in der unteren Grafik die in einer dritten Reaktion eingesetzten Fragmente.
C) Endprodukt mit deletiertem Exon 2, mutiertem Stop Codon und eingefügter BamH I Schnittstelle

Zwei wichtige Vorraussetzungen zur Verlängerung von Nukleotidsequenzen sind eine freie 3' Hydroxylgruppe (OH) zur Knüpfung der Phosphodiesterbindung mit der 5' Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids und ein komplementärer Strang als Vorlage für die Synthese. Da nur für zwei der abgebildeten vier DNA Stränge beide Bedingungen erfüllt sind, werden nur die in Abb. 4.2.12 B unten abgebildeten Fragmente verlängert. Anschließend wurden die Oiligonukleotide 5' (s) und 3' mut (a) hinzugegeben und in 20 Zyklen die gewünschte Zielsequenz amplifiziert.

Die das Exon 2 enthaltene Testican-2 cDNA wurde in einem Einschritt Verfahren mit den beiden Oligonukleotiden 5' (s) und 3' mut (a) hergestellt.
Nach erneuter Reinigung der Fragmente in einem 1% Agarosegel wurden die Zielsequenzen eluiert und mittels Sequenzanalyse sichergestellt, dass keine ungewollten Mutationen entstanden sind. Anschließend wurden beide Sequenzen über die Restriktionsschnittstellen EcoR I und BamH I in das Expressionsplasmid peGFP-N1 kloniert. Nach Vermehrung der Plasmide in Bakterien und anschließender Aufreinigung der Plasmid DNA wurden beide Konstrukte erneut auf ungewollte Mutationen hin sequenziert. Die Analyse ergab, dass keine zusätzlichen Mutationen eingeführt wurden.

4.2.13 Isolierung von DNA

Die DNA wurde mit Hilfe des *Nuclo Spin Plus Kit* (Machery-Nagel) nach Herstellerangaben isoliert.

4.2.14 DNA Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden vom Zentrum für molekulare Medizin Köln (ZMMK) durchgeführt. Zur Sequenzierung von Plasmid DNA wurden 300 ng *Template* DNA und 10 pmol Primer eingesetzt.

4.3 Proteinchemische Methoden

4.3.1 Proteinaufreinigung aus Zellkulturüberständen

Die mit dem modifizierten pCEP-Pu/ BM-40SP Plasmid transfizierten Fibrosarcomzellen (HT1080) produzieren rekombinantes SMOC-1 (human) mit einem His-Hexapeptid, einem Myc-Epitop und einer Schnittstelle für die Protease Faktor X an ihrem Aminoterminus. Vor der Aufreinigung des Zellkulturüberstandes wurde diesem Harnstoff zugesetzt (bis zu einer Konzentration von 2 M Hartnstoff) und der pH auf 8,0 eingestellt. Anschließend wurden gröbere Unreinheiten mittels Filtration und Zentrifugation entfernt. Über das His-Hexapeptid wurde das rekombinante SMOC-1 über eine mit Cobalt -Ionen beladene Talon-Matrix (Clontech) gereinigt. Eine Säule wurde mit 10 ml Talon-Matrix nach Herstellerangaben befüllt und regeneriert. Mit Hilfe einer Peristaltik Pumpe wurde der Zellkulturüberstand mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/ Minute auf die Säule geladen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Imidazol Gradienten (0 – 250 mM), der die über das His-Hexapeptid gebundenen Proteine von der mit Cobalt beladenen Talon-Matrix verdrängt und auf Fraktionen (5 ml/ Fraktion) verteilt.

4.3.2 Proteinaufreinigung aus Matrixfraktionen von Zellen

Nach der Abnahme des Überstands wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,5 ml 0,5% Triton X-100 in 0,5 M HCl/ Kulturplatte überschichtet. Die Zellen und die Matrix wurden mit einem *Cell-Scraper* (Greiner Bio One) abgeschabt. Dieses Gemisch wurde in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (10 Minuten bei 1000 g) und der Überstand (Matrixfraktion) vorsichtig abgenommen. Damit keine Zellen mit in den Überstand aufgenommen werden, wurde der Überstand nicht komplett abgenommen (bis etwa 3 mm über dem Zellpellet).

4.3.3 Proteinextraktion aus Gehirnen

Die Gehirne wurden unmittelbar nach der Präparation in einem fünffachen Volumen eisgekühltem TBS/NP-40 Puffer aufgenommen und auf Eis mit einem Glas-Homogenisator bis zur Homogenität zerkleinert. Nach 60 Minuten Inkubation auf Eis wurde das Homogenat für 30 Minuten bei 21000 g (4 °C) zentrifugiert und der

Überstand abgenommen. Für die Immunpräzipitation wurden 500 µl des Überstandes verwendet.

4.3.4 Immunpräzipitation

Zunächst wurden 2 µg Anti-Testican-2 Antikörper aus Kaninchen an 30 µl Protein A-Agarose (Roche) gekoppelt (1 Stunde bei 4 °C). Nicht gebundene Antikörper wurden durch viermaliges Waschen mit 1 ml TBS entfernt. Parallel dazu wurden 500 µl Gehirnextrakt (siehe 4.2.4) mit 30 ml Protein A-Agarose inkubiert (auf dem Schüttler, 4 Stunden bei 4 °C) um Proteine, die unspezifisch an die Protein A-Agarose binden zu entfernen (*preclearing*). Nachdem die Protein A-Agarose Beads aus dem *preclearing* abzentrifugiert wurden (1 Minute bei 1000 g, 4 °C), wurde der Überstand über Nacht mit der Protein A-Agarose, an die Anti-Testican-2 Antikörper gekoppelt worden waren, bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Protein A-Agarose Beads aus der Immunpräzipitation drei Mal mit 1 ml TBS/ 0,5% NP-40 gewaschen und nach Zentrigugation (1 Minute bei 1000 g) in 40 µl 1 x Probenpuffer (reduzierend) aufgekocht (5 Minuten bei 100 °C). Der gesamte Ansatz wurde in einem SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert.

4.3.5 Proteinfällung

Alle Proteine wurden mittels TCA (Trichloressigsäure) gefällt. Dazu wurde jeweils 1 Volumen Protein in Lösung mit ¼ Volumen TCA (50%) und 0,1 % Triton-X-100 versetzt, für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 30 Minuten bei 15000 g (4 °C) zentrifugiert. Die Fällung (Pellet) wurde in 1 ml eiskaltem Aceton gewaschen, erneut für 10 Minuten bei 15000 g zentrifugiert, das Pellet anschließend an der Luft getrocknet und in 40 µl 1 x Probenpuffer aufgekocht (5 Minuten bei 100 °C).

4.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteine durchliefen in einer diskontinuierlichen SDS PAGE zunächst ein großporiges Sammelgel (4%, pH 6,8). An der Grenzschicht zum Trenngel (4%-15%, pH 8,8) sammeln sich die Proteine und laufen anschließend als scharfe Bande in das Trenngel ein. Im Trenngel werden sie ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Die Gelmatrix wurde aus einer Acrylamid/ Bisacrylamid Mischung hergestellt und mittels Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin (TEMED) polymersisiert. Die Elektrophorese erfolgte unter Wasserkühlung bei konstanter Stromstärke von 25 mA im Sammelgel und 30 mA im Trenngel (50 - 60 Minuten) im Elektrophoreselaufpuffer. Zur Abschätzung der Proteinmassen der Probe wurden

Eichproteine (HMW Marker (Fluka) bzw. LMW Marker (Pharmacia Biotechn)) parallel mit aufgetragen.

4.3.7 Western Blot Analyse

Die Proteine wurden ihrem Trennmuster entsprechend elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran (Protran NC, Schleicher & Schüll) übertragen. Die Übertragung wurde in einer Blot Kammer (Höfer) bei 4 °C über Nacht bei 100 mA (oder für 1 Stunde bei 400 mA) in 1 x Blotpuffer durchgeführt. Anschließend wurde die Membran kurz in H_2O gewaschen und für 10 Minuten in 0,2 % Ponceau S Lösung (Serva) gefärbt. Nach mehrmaligen kurzen Waschschritten in H_2O wurden die Markerbanden (HMW bzw. LMW) auf der Membran gekennzeichnet und die Membran in TBS entfärbt. Freie Bindungsstellen auf der Membran wurden durch 5% Milchpulver/ TBS blockiert. Anschließend wurde die Membran mit einem für das jeweilige Protein (SMOC-1 bzw. Testican-2) spezifischen Primärantikörper (1:400 für den affinitätsgereinigten Anti-Testican-2-Antikörper aus Kaninchen; 1:2000 für das Anti-SMOC-1-Antiserum aus Kaninchen) in 5% Milchpulver/TBS über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS/ 0,1% Tween 20 erfolgte die Inkubation mit dem Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen IgG-HRP aus dem Schwein). Nach erneutem Waschen in TBS/ 0,1% Tween 20 (3x) wurden die Banden mittels Chemilumineszenz Lösung (ECL) auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

4.3.8 Coomassie Färbung

Das Polyacrylamid Gel wurde für 30 Minuten in der Färbelösung (*0,125 % Coomassie Brilliant Blue R250* in 50 % Methanol, 5% Essigsäure) auf dem Schüttler inkubiert und anschließend solange in 70 % Methanol/10 % Essigsäure entfärbt, bis die Markerbanden klar zu erkennen waren. Dabei wurde die Entfärbelösung mehrmals gewechselt und durch frische Entfärbelösung ersetzt.

4.3.9 Konzentrationsbestimmungen von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem *BCAssay* der Firma Interchim nach Herstellerangaben.

4.4 Zellkulturarbeiten

4.4.1 Transfektion und Kultur von Zellen

HT1080, NG108 und C2F3 Zellen mit dem modifizierten pCEP-Pu/BM-40SP (Kohfeld et al., 1997) bzw. dem peGFP-N1 wurden mittels Lipofektion mit *FuGene* (Roche) nach Herstellerangaben entweder transient (NG108, C2F3) oder stabil (linearisiertes Plasmid/ HT1080) transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurde im Falle der stabil transfizierten Zellen (HT1080 Zellen) mit 0,4 µg/ ml Puromycin selektioniert.

4.4.2 Transfektion und Kultur von ES Zellen

Vor der Elektroporation der Zellen wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Die ES Zellen einer Ø 10 cm Zellkulturschale wurden trypsinisiert, 5 Minuten bei 200 g abzentrifugiert, in 9 ml PBS/ 25 nM NaCl aufgenommen und anschließendmit 30 µg des linearisierten *Targeting*-Konstrukts für 5 Minuten inkubiert. In einer Elektroporationsküvette (Bio-Rad, Elektrodenabstand 0,4 cm) wurde mit 500 µF und 230 V in einem *GenePulser* (Bio-Rad) elekroporiert. Nach der Elektroporation wurden die ES Zellen in ES Zell Medium resuspendiert und auf Kulturschalen (vier Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm) mit embryonalen Fibroblasten ausplattiert. Nach 24 Stunden wurde für 7 – 9 Tage mit 350 µg G418/ ml ES Zell Medium selektioniert. Die G418 resistenten ES-Zell-Klone wurden unter dem Mikroskp mit Hilfe einer Eppendorf Pipette isoliert, auf 96 Lochplatten überführt und für 5 – 7 Minuten mit 50 µl Trypsinlösung (0,05 %) bei 37 °C inkubiert, durch vorsichtiges Pipettieren vereinzelt und anschließend 25 µl Trypsininhibitor (10 mg/ ml) dazugegeben. Die ES Zellen wurden auf vorbereitete 24 Loch Platten (embryonale Fibroblasten in 800 µl ES Zell Medium/ Loch) überführt und auf diesen expandiert. Anschließend wurden zwei Drittel der Zellen eines jeden Klons bei -80°C eingefroren. Das verbleibende Drittel wurde zur Gewinnung genomischer DNA erneut expandiert. Nach Präparation der genomischen DNA wurden die Klone genotypisiert.

4.4.3 Präparation von embryonalen Fibroblasten

12 bis 14 Tage alte Embryonen eines Neomycin resistenten Mausstamms (CD1/ Neo) wurden aus dem Uterus entnommen und nach Entfernung von Kopf und Eingeweiden

wurde der Embryo mit einer sterilen Rasierklinge zerkleinert. Der Zellbrei von 10 Embryonen wurde in 10 ml serumfreiem Medium (DMEM Standard ohne FCS) aufgenommen und mit 1 ml Trypsin (0,5%) versetzt und für 10 Minuten im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 5 ml serumfreier Medienüberstand (enthält die vereinzelten Zellen) abgenommen und mit 5 ml Standardmedium versetzt. Die Zellen wurden kurz zentrifugiert und in Standardmedium kultiviert. Den im serumfreien Medium verbliebenen Zellen (5 ml) wurden 5 ml PBS und 0,5 ml Typsin (0,5 %) zugegeben und die oben geschilderte Prozedur wiederholt. Dies geschah so lange, bis sich der Gewebebrei vollständig in einzelne Zellen aufgelöst hatte. Die vereinzelten Zellen wurden für 2 Tage kultiviert und anschließend in Einfriermedium eingefroren. Dabei wurde eine konfluente 15 cm durchmessende Zellkulturschale auf fünf Einfrierröhrchen verteilt.

4.5 Histologische Methoden

4.5.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Die frisch präparierten Gewebe wurden vor der Einbettung in den Block kurz in der Einbettlösung (Tissue-Tek®, Sakura) vorinkubiert und dann in einem Block auf Trockeneis in Einbettlösung tiefgefroren. Die Blöcke wurden bis zur Verwendung bei - 80 °C gelagert. Die Schnitte wurden in einem Kryostat (CM3050, Leica) mit der vom Hersteller für das jeweilige Gewebe empfohlenen Temperatur (z.B. Testis -17 °C) angefertigt. Die 8 µm dicken Schnitte wurden auf Objektträger überführt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Vor den histologischen Färbungen wurden die Schnitte für 15 Minuten in Fixierlösung (2 % Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4) inkubiert und zum Schluss für 5 Minuten in PBS und für 1 Minute in $H_2O_{dest.}$ überführt.

4.5.2 Herstellung von Paraffinschnitten

Die frisch präparierten Mausgewebe wurden zunächst für 1 Stunde in Fixierlösung (4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4) inkubiert. Anschließend wurden die Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 70 %, 90 %, 96 % und 100 % (2x) Ethanol) getrocknet, dann zwei Mal in Xylol und zum Schluss in flüssigem Paraffin (65 °C) inkubiert. Nach dem Paraffinbad wurden die Gewebe in Einweg Plastik Blöcke überführt, mit flüssigem Paraffin überdeckt und so lange auf einer Kühlplatte (4 °C) belassen, bis alles Paraffin fest war. Die Blöcke wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Die 8 µm Schnitte wurden im Mikrotom (HM355S, Mikrom) angefertigt, auf Objektträger übertragen und anschließend für 12 Stunden auf Heizplatten (42 °C) geglättet. Vor den histologischen Färbungen wurden die Schnitte entparaffiniert. Dazu wurden sie zweimal in Xylol (je 10 Minuten) und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (100 % (2x), 96 %, 90 %, 70 % und 50% Ethanol, je 2 Minuten) inkubiert. Zum Schluss wurden die Schnitte für 5 Minuten in PBS und für 1 Minute in $H_2O_{dest.}$ überführt.

4.5.3 Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE Färbung)

Die Schnitte wurden wie folgt gefärbt:

Hämatoxylin Lösung	3 Minuten
Leitungswasser	1 Minute
HCl-Alkohol	10 Sekunden
Leitungswasser	10 Minuten (fließend)
$H_2O_{dest.}$	10 Sekunden
Eosin	3 Minuten
70 %, 90%, 96 % Ethanol	je 2 Minuten
100% Ethanol	2 x 2 Minuten
Xylol	2 x 5 Minuten

Anschließend wurden die Schnitte in Einschlussmittel (DPX, Fluka) eingedeckelt und über Nacht getrocknet.

4.5.4 Kresylechtviolett Färbung

Die Schnitte wurden zunächst für 30 Minuten in Kresylechtviolett Lösung (0,1 g Kresylviolett, 1,63 g Natriumacetat, 2,88 ml Eisessig auf 300 ml mit $H_2O_{dest.}$ auffüllen, kurz erhitzen und filtrieren) bei 60 °C inhubiert, dann je 3 x kurz (nur 1-2 Sekunden !) in 96 % und 100% Ethanol gewaschen und anschließend für 2 x 10 Minuten in Xylol inkubiert. Zum Schluss wurden die Schnitte in Einschlussmittel (DPX *Mountant for histology*, Fluka) eingedeckelt und über Nacht getrocknet.

4.5.5 *Fast Green*/ *Sirius Red* Färbung

Die Schnitte wurden für 30 Minuten in 1,3 % Picrinsäure Lösung (mit 0,1% *Fast Green*/ *Sirius Red*) inkubiert, anschließend kurz (!) in 50 % Ethanol gewaschen (H_20 entfärbt *Fast Green*), dann jeweils für 10 Sekunden in 70 %, 90 % und 96 % Ethanol inkubiert, für 2 x 2 Minuten in 100 % Ethanol überführt und abschließend für 2 x 10 Minuten in Xylol inkubiert. Die Schnitte wurden in Einschlussmittel (DPX, Fluka) eingedeckelt und über Nacht getrocknet.

4.6 Bindungsstudien

4.6.1 Das Luminex System

Alle im folgendem geschilderten Inkubationsschritte werden aufgrund der Fluorochrome im Dunkeln durchgeführt. Pro Ansatz (1 Loch einer 96 Loch Platte) wurde 1 µl homogene Bead-Suspension eingesetzt. Anschließend wurde pro Ansatz 1 µl SMOC-1 (His-Hexapeptid markiert) in Lösung (20 ng/ µl) zugegeben, kurz gevortext und für 3 Stunden bei 4 °C inkubiert. Anschließend werden die Beads mit 6000 g für 5 Minuten zentrifugiert und in 500 µl Reaktionspuffer (10 mM HEPES/ 150 mM NaCl/ 2 mM $CaCl_2$/ 1% BSA pH 7,4) insgesamt vier Mal gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Beads in 20 µl Reaktionspuffer/ Ansatz aufgenommen und für 5 Minuten gevortext. Alle Experimente wurden auf einer 96 Loch Platte durchgeführt. Die 96 Loch Platte wurde zuvor mit Reaktionspuffer blockiert (100 µl/ Loch). Pro Ansatz wurden 20 µl der gekoppelten Bead Suspension und 20 µl des potentiellen Interaktionspartners für 1 Stunde inkubiert. Nach einer Stunde wurde der Primärantikörper in einem Volumen von 10 µl/ Ansatz hinzu gegeben (in verschiedenen Verdünnungen, da die Konzentration des Sekundärantikörpers immer gleich bleibt und bei einer Überdosierung mit Primärantikörper die Fluorochrom gekoppelten Sekundärantikörper fast ausschließlich an ungebundene Primärantikörper binden würden). Anschließend wird der Sekundärantikörper (da nur Erstantikörper aus Kaninchen verwendet wurden, war dies immer ein Alexa 532 gekoppelter Anti-Kaninchen IgG-Anikörper aus Ziege) in einem Volumen von 10 µl/ Ansatz hinzugegeben und wieder für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde im Luminex System gemessen (siehe *Abb. 4.6.1*). Sobald die Photozelle im Luminex System das vom Bead emittierte Licht detektiert, wird die Intensität des Fluoreszenzsignals, welches vom Fluorochromfarbstoff des Sekundärantikörpers stammt gemessen. Die Intensität der Bindung entspricht somit einer relativen Immunfluoreszenz. In Abb. 4.6.1 rechts sind die drei möglichen Meßzustände schematisch dargestellt. Von oben nach unten ist eine Interaktion des gekoppelten Poteins mit dem Interaktionspartner in Lösung gezeigt, darunter ein nur durch die zufällige Nähe zum Bead detektiertes Signal (= Hintergrund) und im untersten Bild ein Nullsignal (keine Bindung). Der Hintergrund wird in einem Reaktionsansatz ohne Interaktionspartner in Lösung ermittelt und von den gemessenen Werten abgezogen.

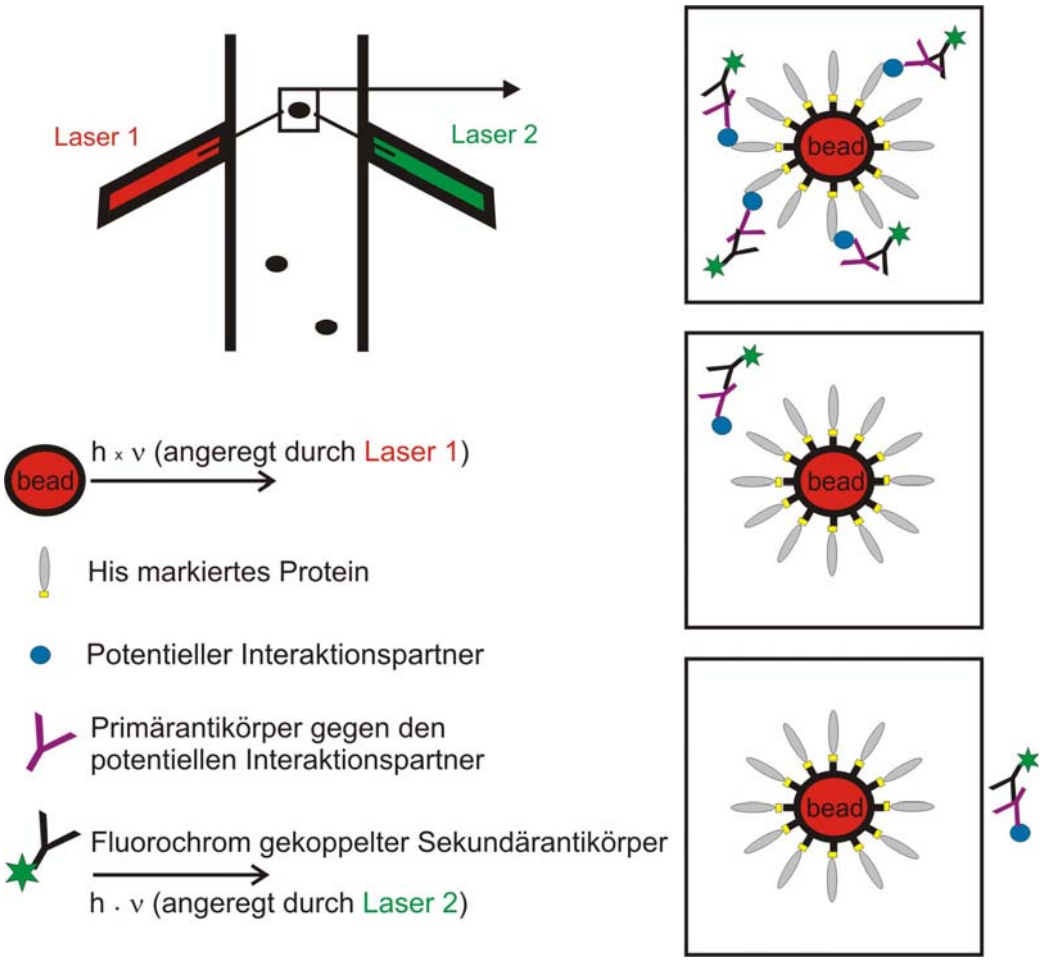


Abb. 4.6.1: **Funktionsprinzip des Luminex Systems**
Das Luminex System misst, sobald die Photozelle das vom Polystyren-Bead (bead) emittiere Signal empfängt. Die Intensität des Fluoreszenzsignals des Fluorochrom gekoppelten Antikörpers entspricht dabei der Bindungsstärke. Rechts sind die drei Messzustände aufgezeigt. Oben: Situation einer Interaktion des gekoppelten Proteins mit dem Bindungspartner in Lösung (Bindung). Mitte: Einzelne markierte Proteine in Lösung befinden sich zufällig in unmittelbarer Umgebung des bead (Hintergrund). Unten: Kein Signal, da kein Fluorochrom gekoppelten Antikörper in unmittelbarer Umgebung des bead vorhanden.

4.6.2 Oberflächen Plasmon Resonanz im BIACORE System

Die Messungen erfolgten in einem BIACORE 2000 bei einer Temperatur von 20 °C. Die Auswertung erfolgte mit der *BIAevaluation software* (3.2).

Vor jeder Messung bzw. Kopplung wurde das System im Laufpuffer bzw. Kopplungspuffer äquilibriert und erst nachdem sich eine konstante Basislinie einstellte, gemessen bzw gekoppelt. Der pH des Kopplungspuffers (hier 10 mM Natrimacetat pH 5,0) sollte kleiner als der isoelektrische Punkt des Proteins sein, da im Vortest das Protein über ionische Wechselwirkungen an der Chipoberfläche aufkonzentriert wird. Im Vortest wurde SMOC-1 mit 5 µl/ Minute über die nicht-aktivierte CM5 Sensochipoberfläche geleitet. Die Proteinlösung wurde so verdünnt, dass nach 35 µl Injektion die Basislinie ein etwa 1000 RU (*response units*, 1 RU entspricht 1 pg Protein)

erhöhtes SPR (*surface plasmon resonance* Signal) Signal aufwies. Für Laminin Interaktionen wurde auch eine geringere Konzentration gekoppelt (250 RU, ebenfalls in 35 µl). Die Verdünnung des Proteins dient der gleichmäßigen Kopplung auf der Chipoberfläche. Die so ermittelte Konzentration wurde dann für die Kopplung verwendet. Dafür wurde die Oberfläche mit 35 µl 0,05 M NHS/ 0,2 M EDC (N-Hydroxysuccinimide/ 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)Carbodiimid, BIACORE) bei einer Flussgeschwindigkeit von 5 µl/ Minute aktiviert, anschließend 35 µl SMOC-1 in das System injiziert und zum Schluß mit 35 µl 1 M Ethanolamin pH 8,5 restliche Bindungsstellen blockiert. Nach der Kopplung wurde das System im Laufpuffer (20 mM HEPES/ 150 mM NaCl/ 2 mM $CaCl_2$/ 0,005 % P20, pH 7,4) äquilibriert und verschiedene Konzentrationen des Interaktionspartners bei einer Flussgeschwindigkeit von 25 µl/ Minute injeziert. Für die Laminin Interaktion wurde zudem bei 50 µl/ Minute gemessen. Die eingesetzten Proteinkonzentrationen lagen zwischen 1 nM und 500 nM. Das verwendete Injektionsvolumen betrug zwischen 50 und 175 µl, die Dissoziationszeit zwischen 180 und 400 Sekunden.

5. Zusammenfassung

Testicane (Testican-1, -2, und –3) sind Proteoglykane, die aufgrund ihrer Domänenstruktur der BM-40 Familie sekretierter, Calcium bindender Proteine zugeordnet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mäuse generiert, in denen das Gen für Testican-2 mittels homologer Rekombination inaktiviert wurde. Die Tiere sind lebensfähig und unterscheiden sich weder in Körpergewicht und –form noch hinsichtlich der Morphologie der inneren Organe von Wildtyp Mäusen. Allerdings ist die Fertilität Testican-2 defizienter Mäuse vermindert. So führen Verpaarungen zweier Testican-2 defizienter Tiere zu signifikant kleineren Würfen als Verpaarungen, in denen nur ein Elterntier homozygot für das mutierte Allel ist, oder Verpaarungen von heterozygoten Tieren. Die Histologie von Testikeln, Gehirnen, Bauchspeicheldrüsen und Nebennieren war in Testican-2 defizienten Mäusen nicht von der aus Wildtyp Mäusen zu unterscheiden. Im Herz, im dem Testican-2 schon in frühen Embryonalstadien exprimiert wird, waren in Testican-2 defizienten Mäusen dilatierte Ventrikel und dünnere Herzwände zu beobachten. Ein solcher Phänotyp entspricht dem Krankheitsbild einer dilatierten Kardiomyopathie. In der Lunge gibt es ebenfalls Hinweise auf eine veränderte Histologie in Form vergrößerter Alveolen.

Außerdem wurde die Expression und mögliche Funktion eines Mikro-Exons untersucht, das in allen Testicanen für die drei Aminosäuren Glu-Val-Glu (EVE) in der Testican spezifischen aminotermianlen Domäne kodiert. Es konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu Testican-1 und –3 für Testican-2 sowohl im Mensch als auch in der Maus fast ausschließlich Isoformen mit diesem Exon existieren. Rekombinante Expression beider Isoformen in eukaryontischen Zellen und anschließende biochemische Analyse weisen auf eine Funktion der EVE Sequenz als proteolytische Spaltstelle hin. Die Natur der verantwortlichen Protease ist bisher unbekannt.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit mit SMOC-1 ein weiteres Mitglied der BM-40 Familie untersucht. SMOC-1 ist ein Glykoprotein und wurde in Vorarbeiten als integraler Bestandteil fast aller Basalmembranen identifiziert. Deshalb wurden gezielt Interaktionen von SMOC-1 mit anderen Basalmembranproteinen untersucht. Im Luminex System konnte Laminin-1 und das Perlecanfragment PIV-1 als Interaktionspartner ermittelt werden. Beide Interaktionen wurden mittels Oberflächen Plasmon Resonanz bestätigt.

Literaturverzeichnis

Adham, I. M., Eck, T. J., Mierau, K., Muller, N., Sallam, M. A., Paprotta, I., Schubert, S., Hoyer-Fender, S., and Engel, W. (2005): Reduction of spermatogenesis but not fertility in Creb3l4-deficient mice. *Mol Cell Biol* **25**, 7657-7664

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

Barker, T. H., Framson, P., Puolakkainen, P. A., Reed, M., Funk, S. E., and Sage, E. H. (2005): Matricellular homologs in the foreign body response: hevin suppresses inflammation, but hevin and SPARC together diminish angiogenesis. *Am J Pathol* **166**, 923-933

Basu, A., Rodeck, U., Prendergast, G. C., and Howe, C. C. (1999): Loss of insulin-like growth factor I receptor-dependent expression of p107 and cyclin A in cells that lack the extracellular matrix protein secreted protein acidic and rich in cysteine. *Cell Growth Differ* **10**, 721-728

Black, D. L. (2000): Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology. *Cell* **103**, 367-370

Bocock, J. P., Edgell, C. J., Marr, H. S., and Erickson, A. H. (2003): Human proteoglycan testican-1 inhibits the lysosomal cysteine protease cathepsin L. *Eur J Biochem* **270**, 4008-4015

Bonnet, F., Perin, J. P., Charbonnier, F., Camuzat, A., Roussel, G., Nussbaum, J. L., and Alliel, P. M. (1996): Structure and cellular distribution of mouse brain testican. Association with the postsynaptic area of hippocampus pyramidal cells. *J Biol Chem* **271**, 4373-4380

Bornstein, P., and Sage, E. H. (2002): Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 608-616

Bradshaw, A. D., Puolakkainen, P., Dasgupta, J., Davidson, J. M., Wight, T. N., 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**, 949-955

Brüning, J. C., Gautam, D., Burks, D. J., Gillette, J., Schubert, M., Orban, P. C., Klein, R., Krone, W., Muller-Wieland, D., and Kahn, C. R. (2000): Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* **289**, 2122-2125

Busch, E., Hohenester, E., Timpl, R., Paulsson, M., and Maurer, P. (2000): Calcium affinity, cooperativity, and domain interactions of extracellular EF-hands present in BM-40. *J Biol Chem* **275**, 25508-25515

Chapman, S. C., and Woodruff, T. K. (2003): Betaglycan localization in the female rat pituitary: implications for the regulation of follicle-stimulating hormone by inhibin. *Endocrinology* **144**, 5640-5649

Charbonnier, F., Chanoine, C., Cifuentes-Diaz, C., Gallien, C. L., Rieger, F., Alliel, P. M., and Perin, J. P. (2000): Expression of the proteoglycan SPOCK during mouse embryo development. *Mech Dev* **90**, 317-321

Charbonnier, F., Perin, J. P., Roussel, G., Nussbaum, J. L., and Alliel, P. M. (1997): [Cloning of testican/SPOCK in man and mouse. Neuromuscular expression perspectives in pathology]. *C R Seances Soc Biol Fil* **191**, 127-133

Claeskens, A., Ongenae, N., Neefs, J. M., Cheyns, P., Kaijen, P., Cools, M., and Kutoh, E. (2000): Hevin is down-regulated in many cancers and is a negative regulator of cell growth and proliferation. *Br J Cancer* **82**, 1123-1130

Davies, M. J. (2000): The cardiomyopathies: an overview. *Heart* **83**, 469-474

De, S., Chen, J., Narizhneva, N. V., Heston, W., Brainard, J., Sage, E. H., and Byzova, T. V. (2003): Molecular pathway for cancer metastasis to bone. *J Biol Chem* **278**, 39044-39050

Debnath, J., Mills, K. R., Collins, N. L., Reginato, M. J., Muthuswamy, S. K., and Brugge, J. S. (2002): The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini. *Cell* **111**, 29-40

Dziadek, M., Paulsson, M., Aumailley, M., and Timpl, R. (1986): Purification and tissue distribution of a small protein (BM-40) extracted from a basement membrane tumor. *Eur J Biochem* **161**, 455-464

Ettner, N., Gohring, W., Sasaki, T., Mann, K., and Timpl, R. (1998): The N-terminal globular domain of the laminin alpha1 chain binds to alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins and to the heparan sulfate-containing domains of perlecan. *FEBS Lett* **430**, 217-221

Fedak, P. W., Smookler, D. S., Kassiri, Z., Ohno, N., Leco, K. J., Verma, S., Mickle, D. A., Watson, K. L., Hojilla, C. V., Cruz, W., Weisel, R. D., Li, R. K., and Khokha, R. (2004): TIMP-3 deficiency leads to dilated cardiomyopathy. *Circulation* **110**, 2401-2409

Felicetti, F., Bottero, L., Felli, N., Mattia, G., Labbaye, C., Alvino, E., Peschle, C., Colombo, M. P., and Care, A. (2004): Role of PLZF in melanoma progression. *Oncogene* **23**, 4567-4576

Funk, S. E., and Sage, E. H. (1993): Differential effects of SPARC and cationic SPARC peptides on DNA synthesis by endothelial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol* **154**, 53-63

Girard, J. P., and Springer, T. A. (1995): Cloning from purified high endothelial venule cells of hevin, a close relative of the antiadhesive extracellular matrix protein SPARC. *Immunity* **2**, 113-123

Göhring, W., Sasaki, T., Heldin, C. H., and Timpl, R. (1998): Mapping of the binding of platelet-derived growth factor to distinct domains of the basement membrane proteins BM-40 and perlecan and distinction from the BM-40 collagen-binding epitope. *Eur J Biochem* **255**, 60-66

Gongidi, V., Ring, C., Moody, M., Brekken, R., Sage, E. H., Rakic, P., and Anton, E. S. (2004): SPARC-like 1 regulates the terminal phase of radial glia-guided migration in the cerebral cortex. *Neuron* **41**, 57-69

Gonzalez, R., Yang, Y. H., Griffin, C., Allen, L., Tigue, Z., and Dobbs, L. (2005): Freshly isolated rat alveolar type I cells, type II cells, and cultured type II cells have distinct molecular phenotypes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **288**, L179-189

Götting, C., Kuhn, J., Brinkmann, T., and Kleesiek, K. (2002a): Xylosyltransferase activity in seminal plasma of infertile men. *Clin Chim Acta* **317**, 199-202

Götting, C., Kuhn, J., Tinneberg, H. R., Brinkmann, T., and Kleesiek, K. (2002b): High xylosyltransferase activities in human follicular fluid and cultured granulosa-lutein cells. *Mol Hum Reprod* **8**, 1079-1086

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**, 4503-4507

Hambrock, H. O., Nitsche, D. P., Hansen, U., Bruckner, P., Paulsson, M., Maurer, P., and Hartmann, U. (2003): SC1/hevin. An extracellular calcium-modulated protein that binds collagen I. *J Biol Chem* **278**, 11351-11358

Hartmann, D., de Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lubke, T., Lena Illert, A., von Figura, K., and Saftig, P. (2002): The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet* **11**, 2615-2624

Hartmann, U., and Maurer, P. (2001): Proteoglycans in the nervous system--the quest for functional roles in vivo. *Matrix Biol* **20**, 23-35

Hennings, H., Holbrook, K., Steinert, P., and Yuspa, S. (1980): Growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture: effects of extracellular calcium. *Curr Probl Dermatol* **10**, 3-25

Hohenester, E., Maurer, P., and Timpl, R. (1997): Crystal structure of a pair of follistatin-like and EF-hand calcium-binding domains in BM-40. *Embo J* **16**, 3778-3786

Hussain, I., Hawkins, J., Shikotra, A., Riddell, D. R., Faller, A., and Dingwall, C. (2003): Characterization of the ectodomain shedding of the beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 (BACE1). *J Biol Chem* **278**, 36264-36268

Iruela-Arispe, M. L., Vernon, R. B., Wu, H., Jaenisch, R., and Sage, E. H. (1996): Type I collagen-deficient Mov-13 mice do not retain SPARC in the extracellular matrix: implications for fibroblast function. *Dev Dyn* **207**, 171-183

Ishidoh, K., and Kominami, E. (1995): Procathepsin L degrades extracellular matrix proteins in the presence of glycosaminoglycans in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **217**, 624-631

Ishikawa, Y., Otsu, K., and Oshikawa, J. (2005): Caveolin; different roles for insulin signal? *Cell Signal* **17**, 1175-1182

Johnston, I. G., Paladino, T., Gurd, J. W., and Brown, I. R. (1990): Molecular cloning of SC1: a putative brain extracellular matrix glycoprotein showing partial similarity to osteonectin/BM40/SPARC. *Neuron* **4**, 165-176

Kassiri, Z., and Khokha, R. (2005): Myocardial extra-cellular matrix and its regulation by metalloproteinases and their inhibitors. *Thromb Haemost* **93**, 212-219

Kohfeldt, E., Maurer, P., Vannahme, C., and Timpl, R. (1997): Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican. *FEBS Lett* **414**, 557-561

Kretsinger, R. H., and Nockolds, C. E. (1973): Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *J Biol Chem* **248**, 3313-3326

Kupprion, C., Motamed, K., and Sage, E. H. (1998): SPARC (BM-40, osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* **273**, 29635-29640

Leco, K. J., Waterhouse, P., Sanchez, O. H., Gowing, K. L., Poole, A. R., Wakeham, A., Mak, T. W., and Khokha, R. (2001): Spontaneous air space enlargement in the lungs of mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3). *J Clin Invest* **108**, 817-829

Liapis, H., Flath, A., and Kitazawa, S. (1996): Integrin alpha V beta 3 expression by bone-residing breast cancer metastases. *Diagn Mol Pathol* **5**, 127-135

Lu, Q., Gore, M., Zhang, Q., Camenisch, T., Boast, S., Casagranda, F., Lai, C., Skinner, M. K., Klein, R., Matsushima, G. K., Earp, H. S., Goff, S. P., and Lemke, G. (1999): Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis. *Nature* **398**, 723-728

Madar-Shapiro, L., Pasmanik-Chor, M., Vaccaro, A. M., Dinur, T., Dagan, A., Gatt, S., and Horowitz, M. (1999): Importance of splicing for prosaposin sorting. *Biochem J* **337 (Pt 3)**, 433-443

Marr, H. S., and Edgell, C. J. (2003): Testican-1 inhibits attachment of Neuro-2a cells. *Matrix Biol* **22**, 259-266

Mason, I. J., Taylor, A., Williams, J. G., Sage, H., and Hogan, B. L. (1986): Evidence from molecular cloning that SPARC, a major product of mouse embryo parietal endoderm, is related to an endothelial cell 'culture shock' glycoprotein of Mr 43,000. *Embo J* **5**, 1465-1472

Maurer, P. (2002): SPARC. *In Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*, **5 Vol**., (Ed.) John Wiley & Sons, Inc., John Wiley & Sons, pp 2961-2965

Meh, P., Pavsic, M., Turk, V., Baici, A., and Lenarcic, B. (2005): Dual concentration-dependent activity of thyroglobulin type-1 domain of testican: specific inhibitor and substrate of cathepsin L. *Biol Chem* **386**, 75-83

Murphy-Ullrich, J. E. (2001): The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *J Clin Invest* **107**, 785-790

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**, 3364-3369

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**, 8896-8902

Nakamura, H., Fujii, Y., Inoki, I., Sugimoto, K., Tanzawa, K., Matsuki, H., Miura, R., Yamaguchi, Y., and Okada, Y. (2000): Brevican is degraded by matrix metalloproteinases and aggrecanase-1 (ADAMTS4) at different sites. *J Biol Chem* **275**, 38885-38890

Nakamura, M., Ishida, E., Shimada, K., Kishi, M., Nakase, H., Sakaki, T., and Konishi, N. (2005): Frequent LOH on 22q12.3 and TIMP-3 inactivation occur in the progression to secondary glioblastomas. *Lab Invest* **85**, 165-175

O'Brien, L. E., Jou, T. S., Pollack, A. L., Zhang, Q., Hansen, S. H., Yurchenco, P., and Mostov, K. E. (2001): Rac1 orientates epithelial apical polarity through effects on basolateral laminin assembly. *Nat Cell Biol* **3**, 831-838

Puolakkainen, P. A., Brekken, R. A., Muneer, S., and Sage, E. H. (2004): Enhanced growth of pancreatic tumors in SPARC-null mice is associated with decreased deposition of extracellular matrix and reduced tumor cell apoptosis. *Mol Cancer Res* **2**, 215-224

Reyes, R., Carranco, A., Hernandez, O., Rosado, A., Merchant, H., and Delgado, N. M. (1984): Glycosamineglycan sulfate as acrosomal reaction-inducing factor of follicular fluid. *Arch Androl* **12**, 203-209

Rodgers, R. J., Irving-Rodgers, H. F., and Russell, D. L. (2003): Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. *Reproduction* **126**, 415-424

Roten, L., Nemoto, S., Simsic, J., Coker, M. L., Rao, V., Baicu, S., Defreyte, G., Soloway, P. J., Zile, M. R., and Spinale, F. G. (2000): Effects of gene deletion of the tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase-type 1 (TIMP-1) on left ventricular geometry and function in mice. *J Mol Cell Cardiol* **32**, 109-120

Sasaki, T., Gohring, W., Mann, K., Maurer, P., Hohenester, E., Knauper, V., Murphy, G., and Timpl, R. (1997): Limited cleavage of extracellular matrix protein BM-40 by matrix metalloproteinases increases its affinity for collagens. *J Biol Chem* **272**, 9237-9243

Sasaki, T., Hohenester, E., Gohring, W., and Timpl, R. (1998): Crystal structure and mapping by site-directed mutagenesis of the collagen-binding epitope of an activated form of BM-40/SPARC/osteonectin. *Embo J* **17**, 1625-1634

Savani, R. C., Zhou, Z., Arguiri, E., Wang, S., Vu, D., Howe, C. C., and DeLisser, H. M. (2000): Bleomycin-induced pulmonary injury in mice deficient in SPARC. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**, L743-750

Schnepp, A., Komp Lindgren, P., Hulsmann, H., Kroger, S., Paulsson, M., and Hartmann, U. (2005): Mouse testican-2. Expression, glycosylation, and effects on neurite outgrowth. *J Biol Chem* **280**, 11274-11280

Shah, A., and Shannon, R. P. (2003): Insulin resistance in dilated cardiomyopathy. *Rev Cardiovasc Med* **4 Suppl 6**, S50-57

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**, 13-19

Sirand-Pugnet, P., Durosay, P., Brody, E., and Marie, J. (1995): An intronic (A/U)GGG repeat enhances the splicing of an alternative intron of the chicken beta-tropomyosin pre-mRNA. *Nucleic Acids Res* **23**, 3501-3507

Sloan, E. K., and Anderson, R. L. (2002): Genes involved in breast cancer metastasis to bone. *Cell Mol Life Sci* **59**, 1491-1502

Southern, E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517

Sturm, R. A., Satyamoorthy, K., Meier, F., Gardiner, B. B., Smit, D. J., Vaidya, B., and Herlyn, M. (2002): Osteonectin/SPARC induction by ectopic beta(3) integrin in human radial growth phase primary melanoma cells. *Cancer Res* **62**, 226-232

Termine, J. D., Kleinman, H. K., Whitson, S. W., Conn, K. M., McGarvey, M. L., and Martin, G. R. (1981): Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* **26**, 99-105

Therien, I., Bergeron, A., Bousquet, D., and Manjunath, P. (2005): Isolation and characterization of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation. *Mol Reprod Dev* **71**, 97-106

Tomasselli, A. G., Qahwash, I., Emmons, T. L., Lu, Y., Leone, J. W., Lull, J. M., Fok, K. F., Bannow, C. A., Smith, C. W., Bienkowski, M. J., Heinrikson, R. L., and Yan, R. (2003): Employing a superior BACE1 cleavage sequence to probe cellular APP processing. *J Neurochem* **84**, 1006-1017

Tortorella, M. D., Pratta, M., Liu, R. Q., Austin, J., Ross, O. H., Abbaszade, I., Burn, T., and Arner, E. (2000): Sites of aggrecan cleavage by recombinant human aggrecanase-1 (ADAMTS-4). *J Biol Chem* **275**, 18566-18573

Unger, J. W., and Lange, W. (1997): Insulin receptors in the pituitary gland: morphological evidence for influence on opioid peptide-synthesizing cells. *Cell Tissue Res* **288**, 471-483

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**, 805-814

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., 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**, 37977-37986

Volfovsky, N., Haas, B. J., and Salzberg, S. L. (2003): Computational discovery of internal micro-exons. *Genome Res* **13**, 1216-1221

Weaver, V. M., Lelievre, S., Lakins, J. N., Chrenek, M. A., Jones, J. C., Giancotti, F., Werb, Z., and Bissell, M. J. (2002): beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer Cell* **2**, 205-216

Weekes, J., Morrison, K., Mullen, A., Wait, R., Barton, P., and Dunn, M. J. (2003): Hyperubiquitination of proteins in dilated cardiomyopathy. *Proteomics* **3**, 208-216

Williams, M. C. (2003): Alveolar type I cells: molecular phenotype and development. *Annu Rev Physiol* **65**, 669-695

Yoon, S. O., Kim, M. M., and Chung, A. S. (2001): Inhibitory effect of selenite on invasion of HT1080 tumor cells. *J Biol Chem* **276**, 20085-20092

Yu, W. H., Yu, S., Meng, Q., Brew, K., and Woessner, J. F., Jr. (2000): TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *J Biol Chem* **275**, 31226-31232

Zhao, Y. Y., Liu, Y., Stan, R. V., Fan, L., Gu, Y., Dalton, N., Chu, P. H., Peterson, K., Ross, J., Jr., and Chien, K. R. (2002): Defects in caveolin-1 cause dilated cardiomyopathy and pulmonary hypertension in knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11375-11380

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
bp	Basenpaare
BM	Basalmembran
cDNA	*copy* DNA
CS	Chondroitinsulfat
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DS	Dermatansulfat
DTT	Dithiothreithol
EC	extrazellulär calciumbindend
ECM	extrazelluläre Matrix
EHS Tumor	Engelbreth –Holm-Swarm Tumor
FS	Follistatin-ähnlich
G1-Phase	Wachstumsphase
G418	Geneticin
GAG	Glycosaminoglykan
HS	Heparansulfat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KS	Keratansulfat
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGK	Phosphoglyceratkinase Promotor
S-Phase	DNA Synthese Phase
SPR	Oberflächen Plasmon Resonanz (*surface plasmon resonance*)
TY	Thyroglobulin-ähnlich
WT	Wildtyp
ZMMK	Zentrum für Molekulare Medizin Köln

Anhang (1) Aminosäuresequenzen der Testicane

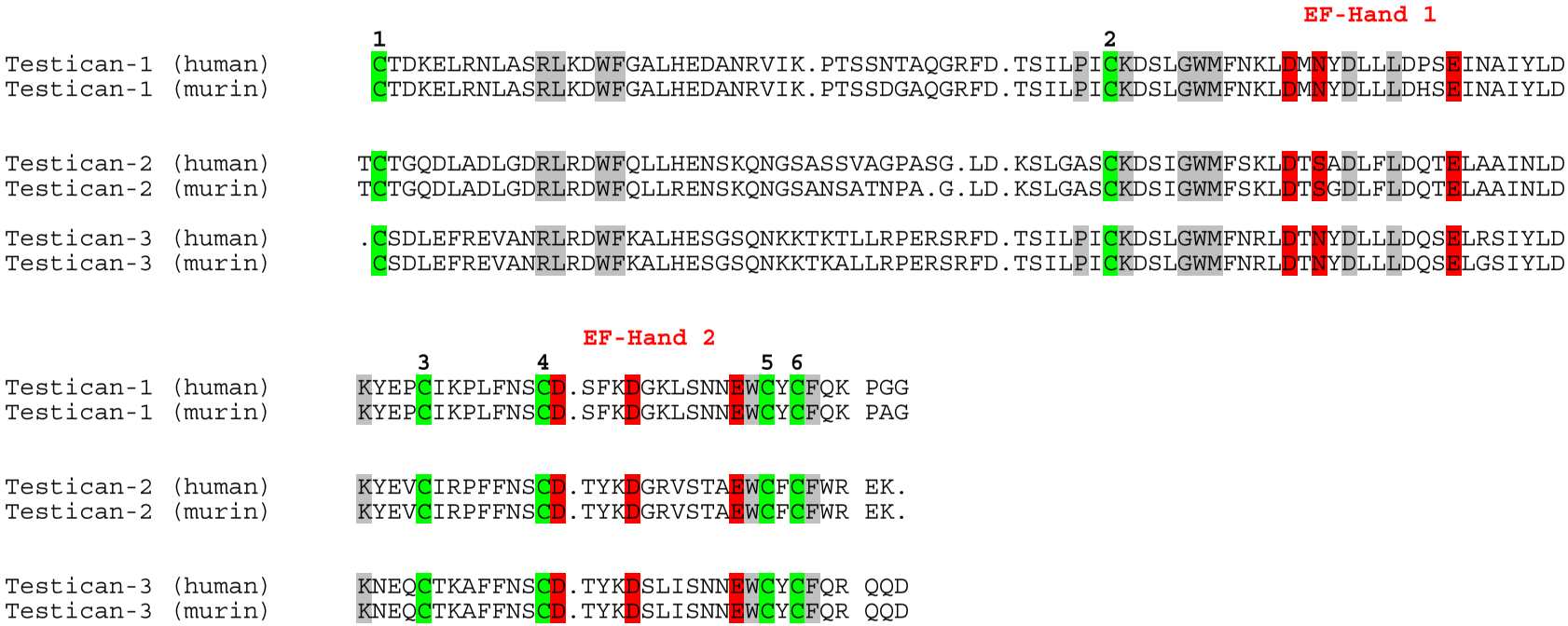
Signalpeptid| Aminoterminale Domäne (TCAN)

```
Testican-1 (human)      MPAIAVLAAAAAAWCFLQVESRH|  LDALAGGAGPNHGNFLDNDQWLSTVSQYDRD.KY.WNRFRDEVEDDYFRNWNPNKPFDQA
Testican-1 (murin)      MPAIAVLAAAAAAWCFLQVDSRH|  LDALAGGAALNNANFLDNDQWLSTVSQYDRD.KY.WNRFRDEVEDDYFRNWNPNKPFDQA

Testican-2 (human)      MRAPGCGRLVLPLLLLAAAALA|  EGDAKGLKEGETPGNFMEDEQWLSSISQYSGKIKH.WNRFRDEVEDDYIKSWEDNQQGDEA
Testican-2 (murin)      MRAPGSGRLALPLLLLAVVALA|  EGDAKGLKEGETPGNFMEDEQWLSSISQYSGKIKH.WNRFRDEVEDDYIKSWEDNQQGDEA

Testican-3 (human)      MLKVSAVLCVCAAAWCSQSLA|  AAAAVAAAGGRSDGGNFLDDKQWLTTISQYDKEVGQ.WNKFRDEVEDDYFRTWSPGKPFDQA
Testican-3 (murin)      MLKVSALLCVCAAAWCSQTLA|  AAAAVAVAGGRSDGGNFLDEKQWLTTISQYDKEVGQ.WNKFRDEVEDDYFRTWNPGKPFDQA
```

Follistatin Domäne

```
                              1    2     3          4
Testican-1 (human)      LDPSKDPCLKVKCSPHKVCVTQDYQTALCVSRKHLLPRQKKGNVAQKHW....
Testican-1 (murin)      LDPSKDPCLKVKCSPHKVCVTQDYQTALCVSRKHLLPRQKKGNVAHKHW....

Testican-2 (human)      LDTTKDPCQKVKCSRHKVCIAQGYQRAMCISRKKLEHRIKQPTVKLHGNK...
Testican-2 (murin)      LDTTKDPCQKVKCSRHKVCVAQGYQRAMCISRKKLEHRIKQPSLKLHGGK...

Testican-3 (human)      LDPAKDPCLKMKCSRHKVCIAQDSQTAVCISHRRLTHRMKEAGVDHRQW....
Testican-3 (murin)      LDPAKDPCLKTKCSRHKVCITQDAQTALCISHRRLTHSMKEVGGSHKQW....

                               5  6         7           8      9          10  11 12
Testican-1 (human)       VGPSNLVKCKPCPVAQSAMVCGSDGHSYTSKCKLEFHACSTGKSLATLCDGPCPCLPEPEPPKHKAER.SA
Testican-1 (murin)       LGPSNLVKCKPCPVAQSAMVCGSDGHTYTSKCKLEFHACSTGKSLNSLCDGPCPCLPEPEPLKPKAEK.SA

Testican-2 (human)       .....DSICKPCHMAQLASVCGSDGHTYSSVCKLEQQACLSSKQLAVRCEGPCPCPTEQAATSTADGKPE.
Testican-2 (murin)       .....DSVCKPCHMAQLASVCGSDGHTYSSVCKLEQQACLSSKQLAVRCEGPCPCPTEQSTASTTDSKSE.

Testican-3 (human)       RG.PILSTCKQCPVVYPSPVCGSDGHTYSFQCKLEYQACVLGKQISVKCEGHCPCPSDKPTSTSRNVK.RA
Testican-3 (murin)       RGLP.SSTCKPCPIAYASPVCGSDGHSYSSQCKLEYQACVLGKQISIKCEGRCPCPSDKSMNIGRNVK.RA
```

EC Domäne


EF-Hand 1
1
2
Testican-1 (human) CTDKELRNLASRLKDWFGALHEDANRVIK.PTSSNTAQGRFD.TSILPICKDSLGWMFNKLDMNYDLLLDPSEINAIYLD
Testican-1 (murin) CTDKELRNLASRLKDWFGALHEDANRVIK.PTSSDGAQGRFD.TSILPICKDSLGWMFNKLDMNYDLLLDHSEINAIYLD
Testican-2 (human) TCTGQDLADLGDRLRDWFQLLHENSKQNGSASSVAGPASG.LD.KSLGASCKDSIGWMFSKLDTSADLFLDQTELAAINLD
Testican-2 (murin) TCTGQDLADLGDRLRDWFQLLRENSKQNGSANSATNPA.G.LD.KSLGASCKDSIGWMFSKLDTSGDLFLDQTELAAINLD
Testican-3 (human) .CSDLEFREVANRLRDWFKALHESGSQNKKTKTLLRPERSRFD.TSILPICKDSLGWMFNRLDTNYDLLLDQSELRSIYLD
Testican-3 (murin) CSDLEFREVANRLRDWFKALHESGSQNKKTKALLRPERSRFD.TSILPICKDSLGWMFNRLDTNYDLLLDQSELGSIYLD
EF-Hand 2
3
4
5
6
Testican-1 (human) KYEPCIKPLFNSCD.SFKDGKLSNNEWCYCFQK PGG
Testican-1 (murin) KYEPCIKPLFNSCD.SFKDGKLSNNEWCYCFQK PAG
Testican-2 (human) KYEVCIRPFFNSCD.TYKDGRVSTAEWCFCFWR EK.
Testican-2 (murin) KYEVCIRPFFNSCD.TYKDGRVSTAEWCFCFWR EK.
Testican-3 (human) KNEQCTKAFFNSCD.TYKDSLISNNEWCYCFQR QQD
Testican-3 (murin) KNEQCTKAFFNSCD.TYKDSLISNNEWCYCFQR QQD

Thyroglobulin Domäne

```
                          1                          2          3      4 5                    6
Testican-1 (human)      LPCQNEMNRIQKLSKGKSLLGAFIPRCNEEGYYKATQCHGSTGQCWCVDKYGNELAGSRKQGA.VSCE
Testican-1 (murin)      LPCQNEMNRIQKLSKGKSLLGAFIPRCNEEGYYKATQCHGSTGQCWCVDKYGNELAGSRKQGT.VSCE

Testican-2 (human)      PPCLAELERIQIQEAAKKKPGIFIPSCDEDGYYRKMQCDQSSGDCWCVDQLGLELTGTRTHGS.PDCD
Testican-2 (murin)      PPCLAELERTQIQEAAKKKPGVFIPSCDEDGYYRKMQCDQSRGDCWCVDQLGLELTGTRMHGT.PDCD

Testican-3 (human)      PPCQTELSNIQKRQGVKKLLGQYIPLCDEDGYYMPTQCHGSVGQCWCVDRYGNEVMGSRINGV.ADCA
Testican-3 (murin)      PPCHTELSNIQKRQGIKKLLGQYIPLCDEDGYYKPTQCHGSVGQCWCVDRYGNEVVGSRINGV.ADCA
```

Domäne V

```
Testican-1 (human)      EEQETSGDFGSGGSVVLLDDLEYERELGPKDKEGKLRVHTRAVTEDDEDEDDDKEDEVGYIW*
Testican-1 (murin)      EEQETSGDFGSGGSVVLLDDLEDERDVGPKDKEGKLRVRTRAVREDDEDEDDDKEDEVGYIW*

Testican-2 (human)      DIVGFSGDFGSGVGW..............EDEEEKETEEAGEEAEEEEGEAGEADDGGYIW*
Testican-2 (murin)      DIVGFSGDFGSGVGW..............EDEEEKETEEAGEEAEEEEGEAGEADDGGYIW*

Testican-3 (human)      IDFEISGDFASGDFHEWTDD.EDDEDDIMNDED.....EIEDDDEDEGDDDDGGDDHDVYI*
Testican-3 (murin)      IDFEISGDFASGDFREWTDD.EGEEDDIMNDKD.....DIEDDDEDEGDDDDDGDVHDGYI*
```

Anhang (2) Sequenzumgebung des Mikro-Exons (EVE)

Testican-1 Lokus (human):

```
tcatttataatgctttcgtactcaggaagttgaggtaggttttgatttttcaactgtat
---------+---------+---------+---------+---------+---------+
agtaaatattacgaaagcatgagtccttcaactccatccaaaaactaaaaagttgacata

                          E  V  E

gtagacatagcattaaagtagttgccaaataaaatgtaaatttcattctaaatctgaaat
--------+---------+---------+---------+---------+---------+
catctgtatcgtaatttcatcaacggtttattttacatttaaagtaagatttagacttta


ctcagtagtaaatatttgttttagttcagtgaaccagtaccacacacatttatttttcat
---------+---------+---------+---------+---------+---------+
gagtcatcatttataaacaaaatcaagtcacttggtcatggtgtgtgtaaataaaaagta


tggtatatccaagggatgcaatttatcaaatgcatataaacagtccatttgctgctttat
---------+---------+---------+---------+---------+---------+
accatataggttccctacgttaaatagtttacgtatatttgtcaggtaaacgacgaaata


cttttctcattagttacagtacaagtatgattgtcagttattatctgtgttttactggtg
---------+---------+---------+---------+---------+---------+
gaaaagagtaatcaatgtcatgttcatactaacagtcaataatagacacaaaatgaccac
```

Testican-1 Lokus (murin):

```
gtactcaggaagttgaggtaggttttgccttttcaaacatatgtagatacagtatcaatc
---------+---------+---------+---------+---------+---------+
catgagtccttcaactccatccaaaacggaaaagtttgtatacatctatgtcatagttag

         E  V  E

aaaatagttgccagataaaatgtaaattgtatctcagatctttaatctccatggtaaata
---------+---------+---------+---------+---------+---------+
ttttatcaacggtctattttacatttaacatagagtctagaaattagaggtaccatttat


tttgctttaaattcagccaaccaggaatatacacgtttgtttctcgtgggtatatgtgag
---------+---------+---------+---------+---------+---------+
aaacgaaatttaagtcggttggtccttatatgtgcaaacaaagagcacccatatacactc


ggatgtaatttatcaaatgtatataagcagcccgttgactgccttatctcttctcattag
---------+---------+---------+---------+---------+---------+
cctacattaaatagtttacatatattcgtcgggcaactgacggaatagagaagagtaatc


ttactctacaagtacgattgctggttattatctgtattttactggtgggttatttattga
---------+---------+---------+---------+---------+---------+
Aatgagatgttcatgctaacgaccaataatagacataaaatgaccacccaataaataact
```

Testican-2 Lokus (human):

```
cctgatctccaggaagtggaggtgagtactgcccaggaccccactctgtgtggtctctgc
---------+---------+---------+---------+---------+---------+
ggactagaggtccttcacctccactcatgacgggtcctggggtgagacacaccagagacg

            E  V  E

agagcacacccctcccctcctgtgtccctccacaccctcattctgacttgccttccctg
---------+---------+---------+---------+---------+---------+
tctcgtgtgggggaggggaggacacagggaggtgtgggagtaagactgaacggaagggac


ccagcctccagtgtggcatgggagcaatcaggagctcacgggagaggctggaaaggattc
---------+---------+---------+---------+---------+---------+
ggtcggaggtcacaccgtaccctcgttagtcctcgagtgccctctccgacctttcctaag


tggacatgggtttataggggatagaggtgtgggggaggcagctggcagggcctgggtggac
---------+---------+---------+---------+---------+---------+
acctgtacccaaatatccctatctccacacccctccgtcgaccgtcccggacccacctg


aggggtcagccaccaggatgacggccattggcacatgacatcgctggcccaggcctctcc
---------+---------+---------+---------+---------+---------+
tccccagtcggtggtcctactgccggtaaccgtgtactgtagcgaccgggtccggagagg
```

Testican-2 Lokus (murin):

```
gtcttcaggaggtagaagtgagtatgatccaggcctcttccccggccagccactagtgtg
---------+---------+---------+---------+---------+---------+
cagaagtcctccatcttcactcatactaggtccggagaaggggccggtcggtgatcacac

          E  V  E

gggtgggaagtcccatgtgggagagactggagagggttctagggtatcgcatgtggggag
---------+---------+---------+---------+---------+---------+
cccacccttcagggtacaccctctctgacctctcccaagatcccatagcgtacacccctc


gttatgtgggtgggctgttctagttgccatgtggaaacggtggtccaggcctctcccatc
---------+---------+---------+---------+---------+---------+
caatacacccacccgacaagatcaacggtacacctttgccaccaggtccggagagggtag


ctttctcttcagttgagcctgagatgtaactggggcccttccttcctttctcccatccct
---------+---------+---------+---------+---------+---------+
gaaagagaagtcaactcggactctacattgaccccgggaaggaaggaaagagggtaggga


atgtccgttcctaggatgattacatcaagagctgggaagacaatcagcaaggagatgaag
---------+---------+---------+---------+---------+---------+
tacaggcaaggatcctactaatgtagttctcgacccttctgttagtcgttcctctacttc
```

Testican-3 Lokus (human):

```
gttggaggaatcttagggaaagtctgaggaagtagaggtttgctttgggttgggtgtcga
---------+---------+---------+---------+---------+---------+
caacctccttagaatccctttcagactccttcatctccaaacgaaacccaacccacagct

                                E  V  E

cagaaattttgtggcaattctatgactagctatctcaatacatcttgtctgtaggaagaa
---------+---------+---------+---------+---------+---------+
gtctttaaaacaccgttaagatactgatcgatagagttatgtagaacagacatccttctt


cagcctagggcaaccataaagctgtaattagttaagaagtaccactcattcattgtgtga
---------+---------+---------+---------+---------+---------+
gtcggatcccgttggtatttcgacattaatcaattcttcatggtgagtaagtaacacact


gggggctctttggtattttgaagttttacaacgacgttgtctgaaatgaatgttcttt
---------+---------+---------+---------+---------+---------+
ccccccgagaaaccataaaacttcaaaaatgttgctgcaacagactttacttacaagaaa


aagattgttaatatccgacaggagaacattatggcttatctgtgaacccaagaattataa
---------+---------+---------+---------+---------+---------+
ttctaacaattataggctgtcctcttgtaataccgaatagacacttgggttcttaatatt
```

Testican-3 Lokus (murin):

```
tttctttttacttttgtaaatttgctgcttgccattgcaggaagtagaggtttgtatatt
---------+---------+---------+---------+---------+---------+
aaagaaaaatgaaaacatttaaacgacgaacggtaacgtccttcatctccaaacatataa

                                          E  V  E

gcttctatctttcatatatttttatattatattaatccatgcatttaattgatcatatat
---------+---------+---------+---------+---------+---------+
cgaagatagaaagtatataaaaatataatataattaggtacgtaaattaactagtatata


acctaaatcatgttattttcctcccttaggatgattatttccgcacttggaatccaggaa
---------+---------+---------+---------+---------+---------+
tggatttagtacaataaaaggagggaatcctactaataaaggcgtgaaccttaggtcctt

                                D  D  Y  F  R  T  W  N  P  G  K

aaccatttgatcaaggtaaaaattaattattttaatataaaaatatttaaatattcataa
---------+---------+---------+---------+---------+---------+
ttggtaaactagttccatttttaattaataaaattatatttttataaatttataagtatt

  P  F  D  Q

ttgctatcctttaggaatgctattcattgcctggtttaagataaaaatgctaaagacata
---------+---------+---------+---------+---------+---------+
aacgataggaaatccttacgataagtaacggaccaaattctatttttacgatttctgtat
```

Erklärung

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 Dezember 2005

Detlef Heep

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Mats Paulsson danke ich für das interessante Thema und seine Unterstützung bei der Durchführung dieser Doktorarbeit unter hervorragenden Arbeitsbedingungen. Weiterhin möchte ich mich für seine Großzügigkeit bedanken, die es mir ermöglicht hat an Seminaren und Kongressen auch außerhalb Deutschlands teilzunehmen.

Bei Herrn Prof. Dr. Siegfried Roth und Herrn Prof. Dr. Helmut W. Klein bedanke ich mich für die Bereitschaft das Coreferat bzw. den Prüfungsvorsitz zu übernehmen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Neil Smyth und Herrn Wieslaw Kryzak für die Herstellung der Chimäre und für viele nützliche Tipps im Umgang mit Stammzellen und Mäusen.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die freundliche Atmosphäre in der Arbeiten sehr viel Spaß macht.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Ursula Hartmann für die Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit, viele lebhafte Diskussionen und für die Einführung des alljährlichen Weihnachtshorrorwichteln und damit für ca. 1 m^3 Plastik *made* in Taiwan.

Jörg und Mille für Dublin.

Und natürlich meiner Familie und meinen langjährigen Freunden. Vor allen denen, mit denen ich zusammen wohne.

Lebenslauf

DETLEF HEEP

SCHIRMERSTR. 14, 50823 KÖLN
TEL. TAGSÜBER: 0221/ 478-6943
TEL. ABENDS: 0221/ 5502549
E-MAIL: DETLEF.HEEP@UNI-KOELN.DE

PERSÖNLICHE DATEN

Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Geburtsdatum/ -ort:	04.12.1969 in Olpe
Konfession:	römisch-katholisch

WERDEGANG

Seit 2001	Promotion im Fach physiologische Chemie (biologische Richtung) im Institut für Biochemie II, Medizinische Fakultät der Universität zu Köln
1995 - 2001	Studium der Biologie an der Universität zu Köln und Diplomarbeit. Abschluss: Diplom Biologe
1995 - 1998	Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg und Erwerb des Vordiploms in Biologie
1993 - 1995	Studium der Architektur an der U-GH Siegen. Abbruch und Studienfachwechsel zum Wintersemester 1995/1996
1993	Erwerb der Hochschulreife am Siegerland-Kolleg, Siegen

Köln, den 01.12.05

Detlef Heep