

Analyse der Expression und Funktion von SMOC-1 und SMOC-2

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Silke Maier

aus Dielheim

2006

Berichterstatter:	Herr Prof. Dr. Mats Paulsson Herr Prof. Dr. R. Jürgen Dohmen
Prüfungsvorsitzender:	Herr Prof. Dr. Helmut W. Klein
Tag der mündlichen Prüfung:	20. April 2006

„Der Weg entsteht beim Gehen.“

(Sprichwort aus Lateinamerika)

Meinen Eltern

Zusammenfassung

Die beiden extrazellulären Matrixproteine SMOC-1 und SMOC-2 wurden sowohl komplett als auch in Fragmenten kloniert, die einzelne oder die Kombination von drei oder vier Domänen enthielten. Die Proteine wurden in eukaryontischen Zellen rekombinant hergestellt und über Affinitätschromatographie aufgereinigt. So konnten sie für funktionelle Studien und zur Antikörper-Herstellung eingesetzt werden. Auch wurde mit dem rekombinanten Protein ein Antiserum gegen SMOC-2 affinitätsgereinigt und zur Analyse der Expression von SMOC-2 im Gewebe verwendet.

In der adulten Maus wurde SMOC-2 hauptsächlich in Herz, Milz, Thymus, Ovar, vor allem aber auch in Lunge, Niere, Knorpel und Haut exprimiert. In der Embryonalentwicklung begann die SMOC-2 Expression an Tag 7,5 in Basalmembranen, war aber nicht auf diese beschränkt. Ab Tag 10,5 wurde die Verteilung breiter und SMOC-2 blieb kontinuierlich bis ins adulte Tier erhalten.

Auch im Zebrafisch spielten die SMOCs schon in sehr frühen Stadien der Embryonalentwicklung, wie z.B. der Gastrulation und Segmentierung, eine Rolle. Nach der Inhibition der Translation von SMOC-1 durch Morpholino Knockdown-Experimente oder bei Überexpression in Folge der Injektion von SMOC-1 mRNA, wiesen die Tiere schon 12 hpf morphologische Veränderungen auf. Diese äußerten sich in einem vergrößerten Kopf-Schwanz-Abstand und zu späteren Entwicklungsstadien in einem missgebildeten posterioren Körperbereich und einem verkrümmten Schwanz. Diese Knockdown-Phänotypen konnten durch Koinjektion von SMOC-1 Morpholino und mRNA aufgehoben werden.

Im weiteren Verlauf der Entwicklung verursachte die Injektion von SMOC-1 oder SMOC-2 Morpholinos allein oder in Kombination weitere schwere Anomalien wie Perikardialödeme und Probleme des Blutgefäßsystems. Diese konnten auf eine fehlerhafte Barrierefunktion von Epithelien zurückgeführt werden. So war neben der Haut auch Endothelgewebe in seiner Funktion beeinträchtigt.

Die Rolle von SMOC-1 und SMOC-2 für die Funktion der Haut wurde *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* untersucht. Dabei wurde eine verstärkte Zelladhäsion von Hautzellen an die extrazelluläre Domäne von SMOC-1 und SMOC-2 festgestellt, die über $\alpha\beta 6$ -Integrin vermittelt wurde. Damit war der Hauptrezeptor beider SMOCs identifiziert, über dessen Verteilung und Funktion weitere mögliche Rollen der SMOCs postuliert werden konnten. So förderten sie *in vitro* das Migrationsverhalten von Keratinozyten, beeinflussten deren Proliferation aber nicht. *In vivo* wurde SMOC-2 von basalen Keratinozyten exprimiert und kolokalisierte mit Cytokeratin-14 in der Epidermis. Hier spielte das Protein auch eine Rolle beim Prozess der Reepithelialisierung im Verlauf der Wundheilung.

Abstract

SMOC-1 and SMOC-2, two extracellular matrix proteins, were cloned as full length proteins but also as fragments that contained only single domains or the combination of three or four domains. The proteins were recombinantly expressed in eukaryotic cell lines, purified by affinity chromatography and used to immunize animals or to perform functional assays.

An antiserum against SMOC-2 could be affinity purified with the help of the new recombinant proteins, which allowed the analysis of expression and tissue distribution of SMOC-2. In adult mouse, heart, spleen, thymus, ovary and, particularly, lung, kidney, cartilage and skin were found to be the organs where SMOC-2 is mainly expressed. During embryonic development SMOC-2 was first detected at basement membranes at embryonic day 7.5, but the expression was not limited to these structures. Starting at day 10.5 the distribution became broader and SMOC-2 was continuously present until adulthood.

In zebrafish, the SMOCs were shown to be important even for very early stages of embryonic development, *i.e.* gastrulation and segmentation. If SMOC-1 translation was inhibited in morpholino knockdown experiments, or if SMOC-1 was overexpressed as a consequence of mRNA injection, the animals showed morphological changes already at 12 hpf. Abnormalities like an increased head-to-tail distance and, at later developmental stages, deformed posterior body segments and a kinky tail were found. The knockdown phenotypes could be rescued by coinjection of SMOC-1 morpholino with SMOC-1 mRNA.

Injection of SMOC-1 or SMOC-2 morpholinos alone or in combination caused other severe developmental abnormalities, *e.g.* pericardial edema formation and irregularities in the vascularization. These failures were due to a defect in epithelial barrier function. The skin was affected and also endothelia became nonfunctional.

The role of SMOC-1 and SMOC-2 in skin function was studied *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo*. Keratinocyte cell attachment was promoted by the extracellular calcium-binding domain of SMOC-1 or SMOC-2, an interaction mediated by $\alpha v \beta 6$ integrin. This integrin seems to be the major receptor for both SMOCs, a result which was supported by codistribution studies. Furthermore, the SMOCs supported migration of HaCaT keratinocytes *in vitro*, but did not influence their proliferation. *In vivo*, SMOC-2 was expressed by basal keratinocytes and colocalized with cytokeratin-14 in the epidermis. Here, it plays a role in the reepithelialization process during wound healing.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG

ABSTRACT

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die extrazelluläre Matrix	1
1.2	Domänen in extrazellulären Proteinen	2
1.3	Die Komponenten der ECM	2
1.3.1	Proteoglykane	2
1.3.2	Kollagene	3
1.3.3	Nicht-kollagene Matrixproteine	3
1.4	Die Basalmembran	4
1.5	Die physiologische Rolle von Calcium	5
1.6	Integrine	6
1.7	Die BM-40 Familie	7
1.7.1	BM-40/SPARC/Osteonectin	9
1.7.2	SC1/Hevin/QR1	10
1.7.3	TSC-36/FRP/Flik/Fstl-1	10
1.7.4	Testicane	11
1.7.5	ECIGs/Fstl-4 und -5	12
1.7.6	SMOCs	12
1.8	Der Zebrafisch als Modellsystem	14
1.8.1	Die Morpholino-Technologie	15
1.9	Zielsetzung der Arbeit	16
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	Material	17
2.1.1	Puffer	17
2.1.2	Proteine	17
2.1.3	Antikörper	18
2.1.4	Zelllinien	19
2.1.5	Bakterienstämme	20

2.1.6	Oligonukleotide	20
2.1.7	Vektoren	22
2.2	Methoden	24
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	24
2.2.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	24
2.2.1.2	Klonierung der Konstrukte.....	25
2.2.1.3	DNA-Sequenzierung.....	26
2.2.2	Der Zebrafisch als Modellsystem.....	26
2.2.2.1	Zebrafisch-Haltung	26
2.2.2.2	RNA-Isolation	27
2.2.2.3	Reverse Transkription	27
2.2.2.4	Die Morpholino-Technologie.....	28
2.2.2.5	Kontroll-Experimente: <i>Mismatch</i> , <i>Rescue</i> , Überexpression	30
2.2.2.6	Herstellung von RNA für Überexpressionsstudien.....	31
2.2.2.7	<i>In vitro</i> Transkription	32
2.2.2.8	<i>In situ</i> Hybridisierung	34
2.2.3	Proteinchemische Methoden	35
2.2.3.1	Proteinquantifizierung.....	35
2.2.3.2	Chromatographische Verfahren	35
2.2.3.3	Proteinfällung mit TCA.....	36
2.2.3.4	Proteinextrakte aus der Zellkultur	37
2.2.3.5	Proteinextrakte aus Gewebe.....	37
2.2.3.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
2.2.3.7	Coomassie Brilliant Blue Färbung.....	39
2.2.3.8	Western Blot Analyse	39
2.2.3.9	Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine.....	40
2.2.4	Affinitätsreinigung der SMOC-1 und SMOC-2 Antiseren.....	40
2.2.4.1	Titerbestimmung mittels ELISA	42
2.2.4.2	Antikörper-Inhibitions-Test	42
2.2.5	Histologische Methoden.....	43
2.2.5.1	Präparation von Gefrierschnitten	43
2.2.5.2	Färbungen.....	43
2.2.6	Zellkulturarbeiten	45
2.2.7	Bindungs- und Inhibitionsstudien.....	47

2.2.7.1	Bindungsstudien.....	47
2.2.7.2	Inhibitionsstudien.....	48
2.2.8	Zellausbreitung.....	48
2.2.9	Zellmigration.....	49
2.2.10	Zellproliferation.....	49
2.2.11	Wundheilung.....	50
3	ERGEBNISSE	51
3.1	Klonierung von SMOC-Konstrukten.....	51
3.2	Rekombinante Expression und Aufreinigung der SMOC-Konstrukte.....	53
3.3	Aufreinigung und Charakterisierung der Antikörper.....	56
3.3.1	SMOC-2 Antikörper aus Meerschweinchen.....	56
3.4	Lokalisation von SMOC-2.....	58
3.4.1	SMOC-2 im adulten Gewebe.....	58
3.4.2	SMOC-2 in der Embryonalentwicklung.....	61
3.4.2.1	SMOC-2 in Mausembryonen von Tag 5,5 bis 6,5.....	61
3.4.2.2	SMOC-2 in Mausembryonen von Tag 7,5 bis 12,5.....	62
3.4.2.3	SMOC-2 in Mausembryonen von Tag 14,5 bis 16,5.....	64
3.4.2.4	SMOC-2 in der neugeborenen Maus.....	65
3.5	Zelluläre Wechselwirkungen von SMOC-1 und SMOC-2.....	66
3.5.1	Zelladhäsionsversuche.....	66
3.5.2	Integrin-Profil der HaCaT-Zellen und Inhibitionsstudien.....	70
3.5.3	Lokalisation von $\alpha\beta 6$ -Integrin auf HaCaT-Zellen.....	73
3.5.4	Migration und Proliferation von HaCaT-Zellen.....	74
3.6	Expression und Funktion von SMOC-2 in der Haut.....	78
3.6.1	Gewebelokalisation von SMOC-2 in der Haut.....	79
3.6.2	SMOC-2 in der Wundheilung und einem Psoriasis-Modell.....	82
3.7	<i>In vivo</i> Studien im Zebrafisch-System.....	86
3.7.1	Die Klonierung der SMOCs im Zebrafisch.....	86
3.7.2	Expression von SMOC-1 im Zebrafisch.....	86
3.7.3	Morpholino-, <i>Rescue</i> - und Überexpressions-Experimente.....	88
3.7.4	Funktion der SMOCs im Zebrafisch.....	91
4	DISKUSSION	97

4.1	Neue rekombinante SMOC Proteine und ihre Aufreinigung.....	97
4.2	SMOC-2 Antikörper und Lokalisation des Proteins.....	99
4.3	Die Rolle von SMOC-1 und SMOC-2 für Zelladhäsion und Migration in Abhängigkeit von $\alpha\beta6$ -Integrin.....	101
4.4	Die Funktion von SMOC-2 in der Haut.....	104
4.5	<i>In vivo</i> Studien zu SMOC-1 und SMOC-2 im Zebrafisch.....	107
4.5.1	SMOC-1: Morpholino, Überexpression und <i>Rescue</i>	108
4.5.2	Funktion von SMOC-1 und SMOC-2 im Zebrafisch.....	112
4.6	Fazit und Ausblick.....	115
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	117
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	128
	ANHANG	130
	DANKSAGUNG	134
	ERKLÄRUNG	135
	LEBENS LAUF	136

1 Einleitung

1.1 Die extrazelluläre Matrix

Die Extrazelluläre Matrix (ECM) fasst alle Makromoleküle zusammen, die in Geweben den Raum zwischen den Zellen füllen. Sie besteht aus einem dreidimensionalen, hochorganisierten Netzwerk aus Polysacchariden, Proteoglykanen und Proteinen, die ein Strukturgerüst ausbilden und dem jeweiligen Gewebe seine physikalischen Eigenschaften verleihen (zur Übersicht siehe Gustafsson und Fässler, 2000). Daneben übernimmt die ECM zusätzlich sehr unterschiedliche Aufgaben, wie z.B. die Regulierung der Zelladhäsion und die Speicherung von Wachstumsfaktoren (Streuli, 1999). Die Proteine der ECM interagieren zudem mit Oberflächenrezeptoren von Zellen, wie z.B. Integrinen, und nehmen so auch Einfluss auf intrazelluläre Signalkaskaden. Damit tragen sie auch zur Migration, Proliferation, Differenzierung oder Apoptose von Zellen bei, womit der ECM eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung, aber auch in Wundheilungs- und Regenerationsprozessen im adulten Organismus zukommt. Die ECM ist also nicht statisch, sondern unterliegt einem ständigen Erneuerungsprozess, zu dem auch Abbauvorgänge durch die Enzymgruppe der Matrix-Metalloproteasen (MMP) gehören (zur Übersicht siehe Bosman und Stamenkovic, 2003).

Eine Sonderform der extrazellulären Matrix stellt die Basalmembran (BM) dar (Paulsson, 1992; Timpl und Brown, 1996). Sie bildet eine dünne Schicht, die direkt mit Zellen (Epithel-, Endothel-, Nerven-, Muskelzellen u.a.) verknüpft ist und Barrierefunktionen übernimmt, epitheliale Zellen polarisiert, Zellwanderung beeinflusst oder auch sehr spezielle Aufgaben haben kann, wie z.B. die des selektiven Filters in der Niere (zur Übersicht siehe Gustafsson und Fässler, 2000).

Die Proteine der ECM werden von den Zellen des jeweiligen Gewebes produziert und in den Zellzwischenraum sekretiert. Dabei ist die molekulare Zusammensetzung der ECM so vielfältig wie ihre unterschiedlichen Funktionen. Es lassen sich drei Hauptkomponenten der ECM nennen: Kollagene, Proteoglykane und nicht-kollagene Matrixproteine wie z.B. Laminin und Fibronectin. Diese Proteine sind zwar unterschiedlichen Familien zugeordnet, doch zeigen sie oft Sequenzhomologien innerhalb definierter Bereiche, den sogenannten Domänen.

1.2 Domänen in extrazellulären Proteinen

Eine Domäne ist eine eigenständige Faltungseinheit innerhalb einer Proteinsequenz, deren Länge zwischen 50 und 300 Aminosäuren liegt (Bork et al., 1996). Vor allem in extrazellulären Proteinen findet sich oft ein modularer Aufbau. Module sind Unterstrukturen von Domänen, die ein Aminosäuremuster besitzen, aus dem eine Konsensus-Sequenz abgeleitet werden kann. Anhand dieser können homologe Domänen identifiziert werden, die dann oft auch ähnliche Sekundär- und Tertiärstrukturen aufweisen. Die Tatsache, dass Proteine oft aus Modulen aufgebaut sind, geht auf Mechanismen wie das Exon-Shuffling zurück (Finnegan, 1989). Dabei werden Exons über transponierbare Elemente in die Introns existierender Gene inseriert. Bei höheren Eukaryonten, bei denen transponierbare Elemente 10% des Genoms ausmachen, ist dies der effektivste Weg, neue Gene zu schaffen. Voraussetzung ist allerdings, dass die Phasengrenzen an den Übergängen zwischen Exon und Intron kompatibel und symmetrisch sind.

1.3 Die Komponenten der ECM

1.3.1 Proteoglykane

Proteoglykane können als Komponenten in der ECM aller Gewebe vorkommen (z.B. Lecticane), aber auch als transmembrane (z.B. Syndecane) oder membran-assoziierte (z.B. Glypicane) Moleküle (zur Übersicht siehe Hartmann und Maurer, 2001). Sie bestehen aus einem Proteinanteil und langen, unverzweigten Polysacchariden, den Glykosaminoglykanen (GAGs). GAGs sind aufgrund saurer Zuckerreste oder der Modifikation durch Sulfatgruppen stark negativ geladen und können daher Kationen anziehen und Wasser binden, wodurch Gele entstehen, die es Gelenken und Geweben ermöglichen, große Druckunterschiede auszugleichen (zur Übersicht siehe Prydz und Dalen, 2000). Zudem spielen Proteoglykane eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Wachstums- und Differenzierungsvorgängen, weil sie mit Wachstumsfaktoren interagieren.

Mittlerweile ist eine große Zahl von Kernproteinen bekannt, die häufig geringe Sequenzhomologien aufweisen und deren Größe von 10 bis über 500 kDa variiert. An die Kernproteine wird dann eine unterschiedliche Anzahl von GAG-Ketten angehängt (von einer bis zu mehr als 100), wobei eine Mischung verschiedener Typen von GAG-Ketten vorliegen kann oder in Abhängigkeit vom Gewebe oder dem Entwicklungszustand GAG-Ketten nur zeitweise auftreten. GAGs selbst sind aus ca. 20-200 Disaccharid-Einheiten aufgebaut, die jeweils aus einer Uronsäure (Glucuronsäure oder Iduronsäure) und einem

Aminozucker (N-Acetylglucosamin oder N-Acetylgalactosamin) bestehen. Sie werden in Abhängigkeit von ihren Disaccharid-Einheiten eingeteilt in Chondroitinsulfat (CS)/Dermatansulfat (DS), Heparansulfat (HS)/Heparin, Keratansulfat (KS) und Hyaluronsäure, wobei die Hyaluronsäure im Gegensatz zu den erstgenannten in proteinfreier Form auf der Zelloberfläche und in der ECM vorkommt (zur Übersicht siehe Kjellen und Lindahl, 1991).

1.3.2 Kollagene

Die Kollagene sind die wohl bekanntesten extrazellulären Matrixproteine und bilden homo- oder heterotrimere Moleküle, die aus α -Ketten aufgebaut sind. Es sind 42 verschiedene Ketten beschrieben, die mindestens 27 unterschiedliche Kollagene zusammensetzen (Myllyharju und Kivirikko, 2004). Charakteristisch ist eine variierende Anzahl an Glycin-Prolin-Hydroxyprolin-Wiederholungen. Dazu kommen dann noch nicht-kollagene Anteile. Die jeweilige Kombination legt die Eigenschaften wie Fibrillenformend (Typ I, II, III, V, XI, XXIV und XXVII) oder nicht Fibrillenformend fest. Typ IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII und XXVI werden zu den Fibrillen-assoziierten Kollagenen gezählt (FACIT; fibril-associated collagen with interrupted triple helix). Kollagen Typ IV und VII sind die typischen Netzbildner, womit sich auch das Vorkommen von Typ IV in der Basalmembran erklärt.

1.3.3 Nicht-kollagene Matrixproteine

Kollagen Typ IV geht Interaktionen mit Perlecan, Nidogen und Laminin ein, nicht-kollagenen Matrixproteinen, zu denen z.B. auch Fibronectin gehört. Da die Laminine die größte Gruppe innerhalb dieser Proteinfamilie bilden, seien sie beispielhaft näher beschrieben. Laminin-1 ist ein heterotrimeres Glykoprotein, das aus je einer α -, β - und γ -Kette aufgebaut wird (Timpl und Brown, 1996). Dabei können fünf verschiedene α -, drei β - und drei γ -Ketten zu 15 unterschiedlichen Lamininen kombiniert werden. Diese sind durch die charakteristische Kreuzform gekennzeichnet (*Abb. 1.1*).

Die kurzen Arme bestehen aus globulären Domänen (VI, IV), welche durch stabförmige Abschnitte (V, III) getrennt werden. Eine aus den Domänen I und II gebildete dreifache coiled-coil α -Helix bildet den langen Arm des Moleküls. Dieser endet in einer globulären G-Domäne. Die G-Domäne besteht aus fünf einzelnen LG-Modulen. Domäne VI, welche im Elektronenmikroskop als globuläre Domäne am Ende der kurzen Arme (N-Terminus) zu erkennen ist, wird auch als LN-Modul bezeichnet. Domäne IV zeigt im Elektronenmikroskop ebenfalls eine globuläre Form und wird auch als L4-Modul bezeichnet. Die globulären Module in den kurzen Armen werden durch die Domänen V und III getrennt, die aus einer Serie von drei bis acht epidermalemem Wachstumsfaktor (EGF)

ähnlichen Wiederholungen bestehen und im Vergleich zu den klassischen EGF-Modulen acht statt sechs Cysteine aufweisen. Sie werden auch als LE-Module bezeichnet. Alle Ketten besitzen in der C-terminalen Region Heptapeptidwiederholungen. Die Domänen I und II werden durch eine ca. 35 Aminosäuren große Domäne B, welche hoch konserviert ist und einen hohen Anteil an Cysteinen aufweist, getrennt.

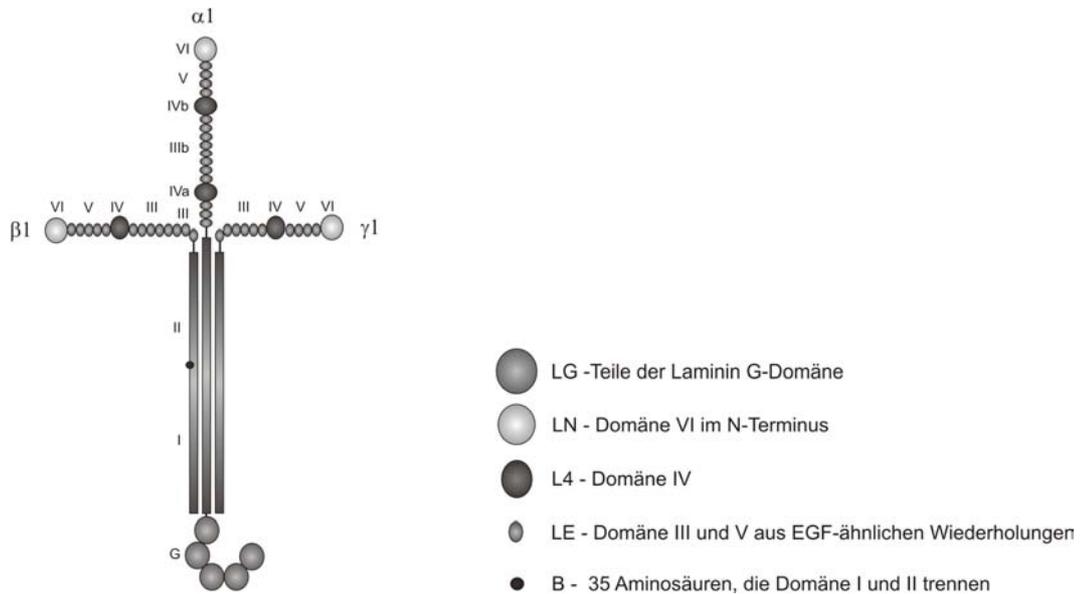


Abb. 1.1: Schematische Übersicht von Laminin-1.

1.4 Die Basalmembran

Verschiedene Formen von Laminin, Kollagen Typ IV, Proteoglykane und Nidogen sind die Bestandteile der Basalmembran. Laminin und Kollagen Typ IV bilden jeweils eigene Netzwerke aus, die dann über Nidogen-1 verknüpft werden (*Abb. 1.2*). Für den Aufbau und Zusammenhalt dieser komplexen Struktur spielen allerdings auch Ionen eine wichtige Rolle, so benötigt Laminin z.B. Calcium zur Selbstaggregation. Weitere Proteine, die mit der Basalmembran assoziiert sind und Calcium-Bindungsstellen tragen, deren Funktion im Zusammenhang mit derselben aber noch nicht bekannt ist, sind die Mitglieder der BM-40-Familie.

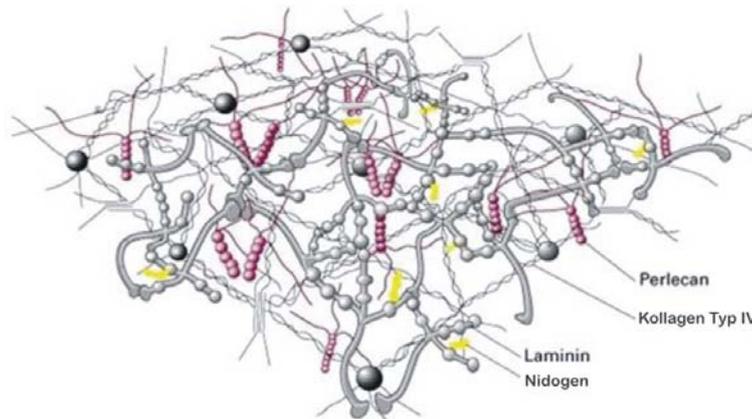


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Basalmembranorganisation. (nach Yurchenco und Schittny, 1990). Man erkennt zwei unabhängige Netzwerke aus Laminin und Kollagen Typ IV, welche über Nidogen und Perlecan verknüpft sind.

1.5 Die physiologische Rolle von Calcium

Calcium ist das Kation, das im Organismus am häufigsten vorkommt. Sein Anteil am Gesamtgewicht des Menschen liegt bei 1%. 99% des Calciums liegen in Knochen und Zähnen als kristallines Hydroxyapatit vor und übernehmen damit eine Rolle bei der Struktur- und Formgebung des Körpers. Extrazelluläres Calcium findet sich im Serum hauptsächlich an Proteine gebunden, so dass die Konzentration der tatsächlich freien Ionen nur 1,2 mM beträgt. Intrazellulär liegt die Konzentration an freiem Calcium im Ruhezustand bei 0,1 μM , in der aktivierten Zelle bei 1-10 μM (Evenas et al., 1998). Calcium-Ionen spielen hier eine wichtige Rolle für intrazelluläre Signalsysteme und sind an der Übersetzung extrazellulärer Signale in so unterschiedlichen Funktionen wie Muskelkontraktion, Ausschüttung von Neurotransmittern, Zellproliferation, Genexpression und Apoptose beteiligt. Um diese Aufgaben zu erfüllen, muss die intrazelluläre Calcium-Konzentration einer genauen Kontrolle unterliegen (zur Übersicht siehe Berridge, 1997).

Von besonderer Bedeutung als Interaktionspartner für die Calcium-Ionen ist das Protein Calmodulin, das Calcium-abhängig an mehr als 100 verschiedene Zellproteine binden kann. Im Calmodulin gibt es zwei EF-Hand Paare (Kretsinger und Nockolds, 1973), über die die Calcium-Bindung vonstatten geht. Insgesamt vier Calcium-Ionen rufen eine Konformationsänderung des Calmodulin hervor, so dass es an das jeweilige Zielprotein binden kann (Chazin, 1995).

Auch außerhalb der Zelle übernimmt Calcium zahlreiche Funktionen. Die Interaktion von Cadherinen, einer Gruppe von Zelladhäsionsproteinen, die durch eine transmembrane Domäne mit der Zelle verankert sind, wäre ohne Calcium-Ionen z.B. nicht

möglich (Takeichi, 1995). Auch die im Folgenden näher beschriebenen Integrine haben Bindungsstellen für zweiwertige Kationen.

1.6 Integrine

Integrine stellen eine wichtige Klasse an Oberflächenrezeptoren von Zellen dar, die Zelladhäsion an extrazelluläre Matrixproteine und in Vertebraten auch bestimmte Zell-Zell-Adhäsionen vermitteln (zur Übersicht siehe Ruoslahti, 1991). Da sie transmembrane Glykoproteine sind, können sie auch auf die Organisation des Cytoskeletts und intrazelluläre Signalwege Einfluss nehmen, worüber sie an der Regulation verschiedener Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Zellwanderung beteiligt sind (zur Übersicht siehe Hynes, 2002).

Sie bestehen aus einer α - und einer β -Untereinheit (*Abb. 1.3 A*), von denen jede in einen extrazellulären Teil, eine einzelne Transmembrandomäne und mit Ausnahme von $\beta 4$ einen kurzen cytoplasmatischen Teil gegliedert ist. Die N-terminalen Bereiche der Untereinheiten bilden ein Kopfstück, das die Bindungsstelle für extrazelluläre Matrixproteine darstellt, während der C-terminale Teil Wechselwirkungen mit dem Cytoskelett und Signalmolekülen eingehen kann. Bisher sind 18 α - und 8 β -Untereinheiten bekannt, die 24 Integrine aufbauen (*Abb. 1.3 B*). Die Hälfte davon trägt die $\beta 1$ -Untereinheit (zur Übersicht siehe Gu und Taniguchi, 2004).

Jedes Integrin scheint darüber hinaus eine spezifische, nicht redundante Funktion zu haben, da die Gene für verschiedene α - und β -Untereinheiten in der Maus ausgeschaltet wurden und die Phänotypen eindeutig und verschieden voneinander waren. So wird z.B. in der $\beta 1$ -defizienten Maus bereits die Präimplantationsphase komplett verhindert (Fässler und Meyer, 1995).

In Zellen sind Integrine an der Zelladhäsion beteiligt, was *in vitro* durch ihre Lokalisation in Fokalkontakten gezeigt werden kann (van der Flier und Sonnenberg, 2001). Das sind Punkte, über die Zellen ihren nächsten Kontakt mit dem Substrat eingehen. Der Abstand zwischen Zellmembran und Substrat beträgt dann nur noch 15-20 nm. Die fokalen Kontakte bilden die primär stabilisierende Kraft und den Ort für die Initialisierung von Aktin-haltigen Streßfibrillen (Carter et al., 1990). Integrine liegen zunächst inaktiv vor, können aber in Abhängigkeit vom Substrat in den Bereich der fokalen Kontakte einwandern und Ligandenbindung induzieren. Neben den Integrinen kommt z.B. auch das Cytoskelett-gebundene Vinculin in fokalen Kontakten vor, welches daher als Marker derselben Verwendung findet (zur Übersicht siehe Zamir und Geiger, 2001).

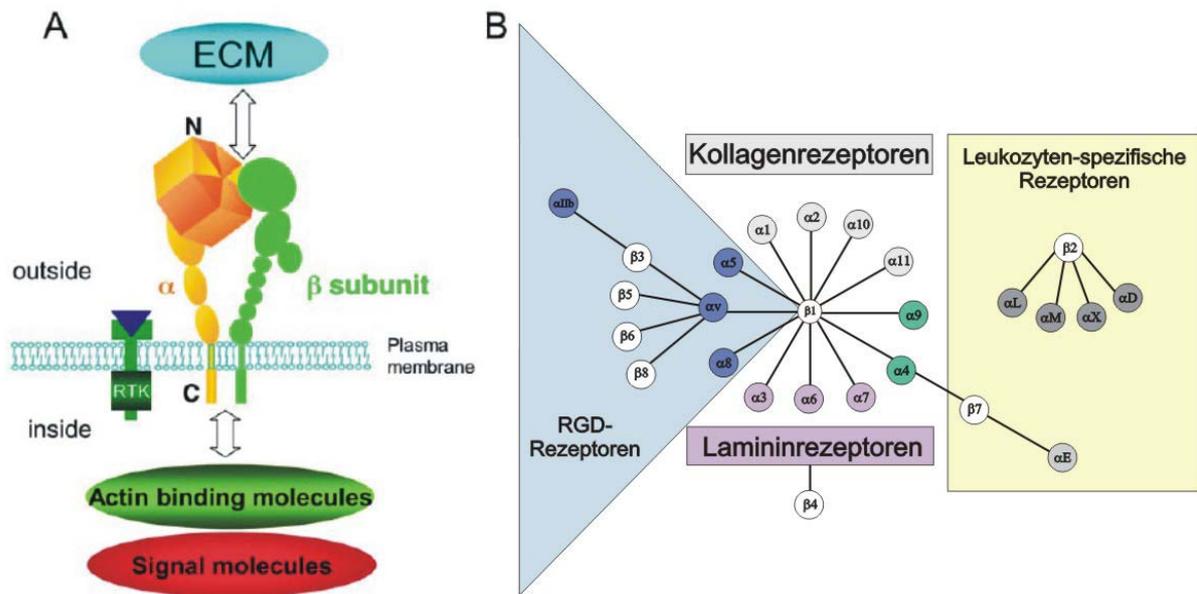


Abb. 1.3: Die Struktur der Integrine und die Integrin-Rezeptor-Familien.

A) Integrin-Rezeptoren sind $\alpha\beta$ Heterodimere. Jede der Untereinheiten hat eine extrazelluläre Region, über die sie mit der ECM in Verbindung steht. Der kurze cytoplasmatische Teil kann Interaktionen mit dem Cytoskelett vermitteln. RTK, Rezeptor-Tyrosin-Kinase (nach Gu und Taniguchi, 2004). B) Die bekannten 24 Integrine können gemäß ihrer evolutionären Entstehung (Farbe der α -Untereinheiten), Ligandenspezifität oder Expression auf bestimmten Zellarten in mehrere Familien eingeteilt werden (nach Hynes, 2002).

Die Mehrheit aller Studien über Integrin-vermittelte Adhäsion wurde mit Zellen durchgeführt, die an Fibronectin (FN) binden. Diese Bindung erfolgt über zehn verschiedene Mitglieder der Integrin-Familie, von denen acht die Tripeptid-Sequenz Arg-Gly-Asp (RGD) erkennen (Chen et al., 1996). Diese Bindung ist wichtig für viele Zell-Substrat-Wechselwirkungen wie Zelladhäsion und Migration. Die Ligandenbindung löst eine Signalkaskade aus, die Veränderungen des Zellverhaltens wie Ausbreitung, Wanderung oder Differenzierung zur Folge haben kann. Eine schnelle Abfolge dieser Prozesse läuft z.B. in der Wundheilung ab, weshalb Integrine hierbei auch eine hohe Umverteilungsrage aufweisen. Integrine werden auch als Rezeptoren von Mitgliedern der BM-40 Familie diskutiert (Sturm et al., 2002; De et al., 2003).

1.7 Die BM-40 Familie

Die nun schon mehrfach erwähnte BM-40 Familie besteht aus mehreren sekretierten Proteinen, die eine extrazelluläre Calcium-bindende (EC)-Domäne und eine Follistatin-ähnliche (FS)-Domäne besitzen (Abb. 1.4).

Die EC-Domäne weist zwei EF-Hand Motive auf, die wie für Calmodulin bisher nur für intrazelluläre Proteine beschrieben worden waren. Für BM-40 ist die Domäne sogar kristallisiert (Abb. 1.5) und beide EF-Hände sind über Röntgenstrukturanalyse

nachgewiesen (Maurer et al., 1995; Hohenester et al., 1996; Hohenester et al., 1997). Auch für die meisten anderen Familienmitglieder ist die Calcium-Bindung bereits experimentell bestätigt.

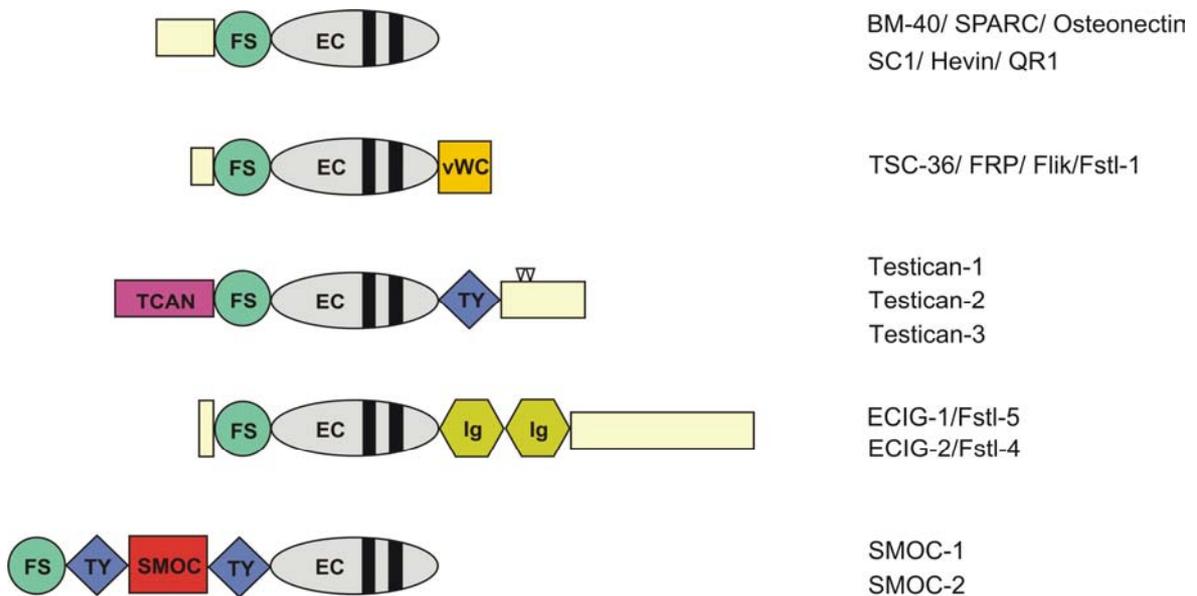


Abb. 1.4: Schematische Übersicht über die Struktur der Mitglieder der BM-40 Familie.

FS = Follistatin-ähnliche Domäne; EC = extrazelluläre calciumbindende Domäne; die schwarzen Balken symbolisieren die EF-Hand Motive; vWC = von Willebrand Faktor Typ C homologe Domäne; TCAN = Testican spezifische Domäne; TY = Thyroglobulin Domäne; ▽ = potentielle Glykosaminoglykan Bindestelle; Ig = Immunglobulin Domäne; SMOC = SMOC spezifische Domäne. Die unbeschrifteten Rechtecke stellen Domänen dar, die keine Homologie zu Datenbanksequenzen aufweisen. Signalpeptide wurden der Übersichtlichkeit halber weggelassen.

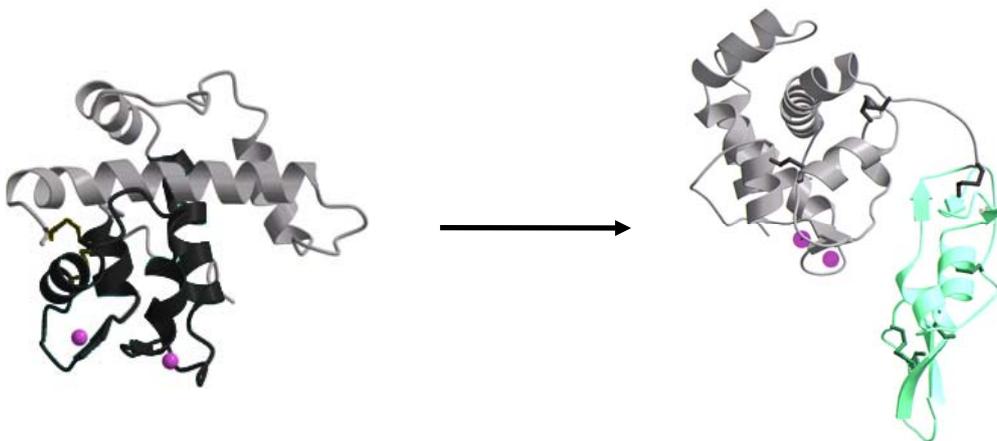


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der EC-Domäne sowie des FS-EC-Domänenpaares von BM-40.

Diese Abbildung beruht auf den Daten der Röntgenstruktur (Hohenester et al., 1996). Links wird ein Modell der EC-Domäne allein, rechts des FS-EC-Domänenpaares gezeigt. Die gebundenen Calcium-Ionen sind als Kugeln dargestellt.

Damit sind diese Proteine vor allem in der großen Anzahl an verschiedenen extrazellulären Kompartimenten interessant, die Calcium-Gradienten aufweisen, wie z.B.

Haut (Menon et al., 1985), Plazenta (Reitz et al., 1977), Lunge (Eckenhoff, 1989) oder Gehirn (Nicholson et al., 1977). Es ist vorstellbar, dass den Calcium-Ionen hier mehr als nur eine Struktur bildende Rolle zufällt, indem sie an der Modulation oder Übertragung von Signalen beteiligt sind.

Die Follistatin-Domäne weist, wie der Name sagt, Ähnlichkeiten zu einem anderen extrazellulären Protein auf, das an Mitglieder der TGF- β -Proteinfamilie binden und dadurch deren Wirkung aufheben kann (zur Übersicht siehe Michel et al., 1993). Sie trägt zehn Cysteine und einen N-terminalen Teil, der Ähnlichkeit zu epidermalen Wachstumsfaktoren aufweist sowie einen C-terminalen Teil, der Homologie zu einer Kazal-Typ Proteaseinhibitor Domäne hat (zur Übersicht siehe Bode und Huber, 1991).

1.7.1 BM-40/SPARC/Osteonectin

BM-40, Namensgeber der Familie, wurde zuerst beschrieben, nachdem es als Komponente des Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)-Tumors der Basalmembran isoliert und als Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 40 kDa charakterisiert worden war (Dziadek et al., 1986; Mann et al., 1987). Parallel dazu wurden von zwei anderen Arbeitsgruppen SPARC (secreted protein acidic and rich in cystein), das aus parietalem Endoderm der Maus isoliert wurde (Sage et al., 1984), und Osteonectin, das als nicht-kollagener Bestandteil der Knochenmatrix isoliert worden war (Termine et al., 1981), entdeckt.

Neben den bereits erwähnten EC- und FS-Domänen hat BM-40 N-terminal noch eine spezifische Domäne, die als Transglutaminase-Substrat dient (Hohenadl et al., 1995). Diese besteht aus 52 Aminosäuren, von denen 18 negativ geladen sind. Die Calciumbindung an BM-40 ist mit einem Anstieg der α -helikalen Bestandteile und der Bildung von Bindungsstellen für extrazelluläre Liganden wie z.B. Kollagenen verbunden (Mayer et al., 1991). Die EF-Hände binden zwei Calcium-Ionen mit hoher Affinität und Kooperativität. Diese liegt im nanomolaren Bereich, so dass beide EF-Hände in der Matrix im Calcium-gesättigten Zustand vorliegen dürften (Maurer et al., 1995).

Neben der Bindung an Kollagene (Sasaki et al., 1997; Sasaki et al., 1998) sind auch Interaktionen mit PDGF (Raines et al., 1992) und VEGF (Kupprion et al., 1998) bekannt. Zudem ergaben *in vitro* Versuche, dass BM-40 Zytokin-Aktivitäten beeinflusst (Lane und Sage, 1994), die Zelladhäsion behindert (Murphy-Ullrich et al., 1995), den Zell-Zyklus unterbricht (Funk und Sage, 1991), Zelldifferenzierung mitreguliert (Bassuk et al., 1999), Matrix-Metalloproteinasen aktiviert (Hasselaar et al., 1991) und damit auch Veränderungen der Zellmorphologie auslösen kann (Lane und Sage, 1990).

Über welche Art zellulären Rezeptor all diese Wechselwirkungen erreicht werden, ist bisher unbekannt. Es gibt Arbeiten aus der Tumorforschung, die BM-40 mit β 3-Integrinen in Verbindung bringen (Sturm et al., 2002). Zudem wurde beschrieben, dass

BM-40 eine erhöhte Migration von Tumorzellen im Knochen über die Aktivierung von $\alpha v\beta 3$ und $\alpha v\beta 5$ Integrinen induziert (De et al., 2003). Das Protein ist auch in die Angiogenese involviert und bedingt dadurch eine erhöhte Invasivität von Melanomzellen (zur Übersicht siehe Brekken und Sage, 2000).

BM-40 kommt bereits in der embryonalen Entwicklung, aber auch noch im adulten Tier vor. Beim Fehlen des Proteins, wie aus der Knockout-Maus bekannt, sind bis zum Alter von sechs Monaten keine Defekte zu erkennen. Dann entwickeln die Tiere Katarakte (Gilmour et al., 1998; Norose et al., 1998), weisen eine verringerte Knochenmasse sowie verschlechtere Knochenneubildung auf (Delany et al., 2000) und zeigen Auffälligkeiten in der Wundheilung (Basu et al., 2001; Bradshaw et al., 2002).

1.7.2 SC1/Hevin/QR1

Das Glykoprotein SC1 (synaptic cleft 1) ist zu 70% identisch zu BM-40, besitzt jedoch eine viel längere saure N-terminale Domäne. SC1 wurde aus Rattengehirnen (Johnston et al., 1990), das humane Ortholog Hevin aus Hoch-Endothel-Venenzellen der Mandeln kloniert (Girard und Springer, 1995), wo es an der transendothelialen Migration der Lymphozyten beteiligt ist. Hevin bindet an Kollagen Typ I Fibrillen (Hambrock et al., 2003) und inhibiert wie BM-40 die Adhäsion und Ausbreitung von Endothelzellen (Girard und Springer, 1996). In vielen Tumorzelltypen ist Hevin schwächer exprimiert als in den entsprechenden Normalgeweben. SC1 defiziente Mäuse zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp (McKinnon et al., 2000), während Mäuse, die zusätzlich noch BM-40 defizient sind, eine gesteigerte Vaskularisierung im Fall der Implantation von Fremdgewebe aufweisen (Barker et al., 2005). QR1 (Quail Retina protein 1) ist das Wachtelhomolog zu SC1 und wird in den sich entwickelnden neuroretinalen Zellen von Wachtel und Huhn exprimiert (Guermah et al., 1991).

1.7.3 TSC-36/FRP/Flik/Fstl-1

TSC-36 ist ein Glykoprotein, das neben der EC- und FS-Domäne eine aus 12 Aminosäuren bestehende N-terminale und eine C-terminale Domäne besitzt, die Homologie zu einer von-Willebrand-Faktor Typ C-Domäne aufweist. Das ursprünglich in murinen Osteoblasten als TGF- $\beta 1$ induziertes Protein (TGF- $\beta 1$ stimulated clone 36) beschriebene Protein (Shibanuma et al., 1993), auch FRP (follistatin-related protein) oder Fstl-1 (Follistatin-like 1), zeigt antiproliferative (Sumitomo et al., 2000) und antiinvasive Wirkung (Johnston et al., 2000). Bisher wurden orthologe TSC-36 Proteine in Ratte, Mensch, Affe, Huhn und Xenopus gefunden, kloniert und sequenziert.

Flik (follistatin-like) ist das Ortholog aus Huhn, das vermutlich die Dorsalisierung und die neurale Induktion während der Gastrulation beeinflusst und Auswirkung auf die

Kompartimentbildung der Somiten und die Myogenese hat (Amthor et al., 1996). Die genaue biologische Funktion von TSC-36 ist noch ungeklärt. Allerdings ist interessant, dass bei TSC-36 die EC-Domäne nicht funktionell zu sein scheint, da keine Calciumbindung nachgewiesen werden konnte (Hambrock et al., 2004).

1.7.4 Testicane

Testican wurde ursprünglich als proteolytisches Fragment aus humaner Samenflüssigkeit isoliert (Bonnet et al., 1992). Gegenwärtig sind drei Testicane beschrieben (Alliel et al., 1993; Charbonnier et al., 1997; Vannahme et al., 1999; Hartmann und Maurer, 2001; Nakada et al., 2001), die sowohl in Maus als auch in Mensch vorkommen. Darüber hinaus wurden Testican-Homologe auch in Invertebraten wie *Drosophila* und *C. elegans* entdeckt. Sie weisen Homologie zu Proteinen der BM-40 Familie auf, doch handelt es sich bei den Testicanen um potentielle Proteoglykane, da die C-terminale Domäne zwei Glykosaminoglykan Anheftungsstellen trägt (Bonnet et al., 1992). Zu den bisher beschriebenen Domänen kommt zusätzlich noch eine N-terminale Domäne, die besonders bei Testican-2 reich an sauren Aminosäuren ist und keine Homologie zu anderen Proteinen aufweist. Außerdem enthalten sie eine Thyroglobulin (TY) Domäne.

Anhaltspunkte zur Funktion der Testicane geben derzeit *in vitro* Untersuchungen und Analysen der Expression von Testican-1, -2 und -3. Während der Embryonalentwicklung der Maus wird Testican-1 bereits im zentralen und peripheren Nervensystem gefunden und konzentriert sich bis hin zur adulten Maus auf das Gehirn, wo es vor allem an der postsynaptischen Membran von Pyramidalneuronen der CA3 Region des Hippocampus und im Thalamus lokalisiert ist (Bonnet et al., 1996; Charbonnier et al., 2000; Marr et al., 2000).

Testican-2 zeigt in der Maus eine breitere Expression als Testican-1. In der Entwicklung ist es ab Embryonaltag 6,5 und später im Nervensystem und den darin enthaltenen Blutgefäßen, in Herz, Skelettmuskel, endokrinen Drüsen und der Lunge exprimiert. Adult findet man Testican-2 hauptsächlich im Gehirn, endokrinen Organen und der Lunge (Schnepp, 2004; Schnepp et al., 2005). Im Gehirn wird es vor allem im Bulbus olfactorius, Hippocampus und in den Purkinjezellen des Cerebellums gefunden.

Testican-3 wird wie Testican-1 ab Embryonaltag 10,5 exprimiert und findet sich unter anderem im ZNS, in Basalmembranen der Blutgefäße und des Herzens, in der Leber und im Innenohr. Im adulten Tier ist die Testican-3 Expression wieder auf das Gehirn beschränkt, wobei das Protein in Bulbus olfactorius, Thalamus, Hippocampus, Cortex und Striatum immunhistologisch nachgewiesen werden konnte (Hechler, 2003).

Für alle drei Testicane wurden in unserer Arbeitsgruppe defiziente Mäuse generiert, die bisher keinen offensichtlichen Phänotyp aufweisen, lebensfähig und fertil sind. Da es aber wahrscheinlich ist, dass die Funktion eines Testicans jeweils von den beiden anderen

ersetzt werden kann, werden vermutlich erst Doppel- und Tripelknockouts weitere Auskunft über die Rolle der Testicane geben.

1.7.5 ECIGs/Fstl-4 und -5

Die beiden ECIGs (*Abb. 1.4*) wurden erst vor kurzem in unserer Arbeitsgruppe beschrieben. Sie wurden auch im Rahmen von Genomprojekten gefunden und vom HUGO Gene Nomenclature Committee als Fstl-4 und -5 (Follistatin-like 4 und 5) bezeichnet. Sie besitzen neben den charakteristischen FS- und EC-Domänen C-terminal zwei Immunglobulin ähnliche Domänen und eine Sequenz ohne Homologie zu bekannten Proteinen. Untersuchungen zu ihrer weiteren Charakterisierung werden gegenwärtig durchgeführt.

1.7.6 SMOCs

Zwei weitere in unserer Arbeitsgruppe beschriebene Mitglieder der BM-40 Familie sind SMOC-1 und SMOC-2 (secreted modular calcium-binding protein 1 und 2). Hier lieferte eine Analyse der EST-Datenbanken humane EST-Klone, die eine Sequenzhomologie von 37% zu BM-40 aufwiesen (Vannahme et al., 2002; Vannahme et al., 2003). Beide tragen N-terminal die Konsensussequenz eines Signalpeptids, was zusammen mit der Abwesenheit einer hydrophoben Transmembranregion darauf hindeutet, dass die Proteine sekretiert werden. Der weitere Aufbau ist auch bei diesen beiden modular, zeigt aber Abweichungen von den bisher beschriebenen Proteinen der BM-40 Familie, da die FS- und die EC-Domäne nicht direkt aneinander gekoppelt sind, sondern durch zwei TY-Domänen getrennt sind, die wiederum durch eine SMOC-spezifische Domäne separiert werden (*Abb. 1.4*). Die SMOC-spezifische Domäne zeigt keine Homologie zu bekannten Proteinen und enthält einen hohen Anteil aromatischer Aminosäuren. Dies lässt die Vermutung zu, dass diese Region eine Faltung mit einem hydrophoben Kern einnimmt.

Die in beiden SMOCs auftretenden Thyroglobulin- (TY) Domänen sind nach einem Hypophysenhormon-Vorläufer benannt, der elf TY-Domänen trägt, über deren Funktion als Cystein- oder Kation-abhängige Proteaseinhibitoren spekuliert wird (Lenarcic und Bevec, 1998). Die TY-Domänen enthalten jeweils sechs Cysteine und werden damit durch drei Disulfid-Brücken stabilisiert. Das auffälligste Motiv der TY-Domänen jedoch ist die seltene Aminosäure-Sequenz Cys-Trp-Cys-Val (Molina et al., 1996), das sonst in Proteinen zu finden ist, die an Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt sind, wie z.B. in Nidogen-1 und -2 (Nagayoshi et al., 1989) und in Proteinen, die in der Lage sind, Wachstumsfaktoren zu binden wie z.B. das *insulin-like growth factor binding protein* (Shimasaki und Ling, 1991). Die Kristallstruktur der TY-Domäne ist bekannt (Guncar et al., 1999) und es lassen sich zwei Faltungseinheiten unterscheiden: ein kurzer α -Helix- β -

Strang und drei Stränge, die ein kurzes antiparalleles β -Faltblatt formen. Ein Sequenzvergleich zeigt, dass die Primär- und Sekundärstruktur der TY-Domänen in SMOC-1 und SMOC-2 konserviert sind.

Auch die EC-Domänen mit amphipatischer α -Helix und Helix-Schleife-Helix-Motiven der zwei EF-Hände sind konserviert. Es ist bekannt, dass die Interaktion der FS- und EC-Domäne die Calcium-Bindung beeinflusst (Hohenester et al., 1997). Obwohl beide Domänen in den SMOCs nicht direkt benachbart sind, ist die EC-Domäne bei den SMOCs funktionell. Die Funktion der EF-Hände als Calcium-Bindungsstellen konnte über Circular dichroismus-Spektroskopie nachgewiesen werden. Dabei kann die Sekundärstruktur und somit Konformation und deren Veränderung bei Ionenzugabe oder -entzug bestimmt werden. Die CD-Spektren deuten auf Proteine mit einem geringen Anteil an α -Helix (5-10%) und um die 40% β -Faltblatt hin, die reversibel Calcium binden können (Vannahme et al., 2002; Vannahme et al., 2003).

Die translatierten Proteinsequenzen von SMOC-1 und SMOC-2 sind zu 55% identisch. Das 408 Aminosäuren lange SMOC-1 weist zwei potentielle N- und 9 O-Glykosylierungsstellen auf, das 425 Aminosäuren lange SMOC-2 eine N- und 9 O-Glykosylierungsstellen. Eine N-Glykosylierungsstelle, die jeweils in der SMOC-spezifischen Domäne liegt, konnte für SMOC-1 (N 214) und SMOC-2 (N 206) mittels eines N-Glykosidase F Verdaus experimentell bestätigt werden (Vannahme et al., 2002; Vannahme et al., 2003). Bei SMOC-1 wurde darüber hinaus trotz fehlender potentieller GAG-Bindungsstellen auch Hinweise auf Keratansulfat-Ketten gefunden. Die genannten Glykosylierungen erklären das Laufverhalten der Proteine im Gel. Diese wurden zur weiteren biochemischen Charakterisierung rekombinant in eukaryontischen Zellen exprimiert und aus dem Überstand aufgereinigt. SMOC-1 hat ein theoretisches Molekulargewicht von 50,7 kDa, läuft aber unter reduzierenden Bedingungen bei 75 kDa, SMOC-2 ist mit 52,9 kDa etwas größer und läuft bei 64 kDa.

Mit Hilfe der rekombinanten Proteine wurden Antikörper gegen die beiden SMOCs hergestellt und zur Untersuchung der Gewebeverteilung eingesetzt. Zuvor war die mRNA von SMOC-1 und -2 schon in einer Vielzahl von Geweben über Northern Blot und RT-PCR nachgewiesen worden (Vannahme et al., 2002; Vannahme et al., 2003). Speziell kommt SMOC-1 in Gehirn, Thymus, Herz, Muskel, Leber, Lunge, Testis und vor allem Ovarien vor und SMOC-2 in Herz, Lunge, Niere, Muskel, Milz, Thymus und auch dominant in Ovarien. Für das humane SMOC-2 wurde die Expression im Muskel auch durch die Identifikation des Homologs *smap2* (*s*mooth *m*uscle *a*ssociated *p*rotein *2*) bestätigt, das mit glatter Muskulatur assoziiert ist und während der Neointima-Bildung hochreguliert wird (Nishimoto et al., 2002). Im Menschen wird SMOC-2 alternativ in zwei Isoformen gespleißt.

Für SMOC-1 stellte sich heraus, dass es in den meisten Geweben mit der Basalmembran assoziiert ist. Durch Elektronenmikroskopie konnte es dann auch tatsächlich als integrale Komponente der Basalmembran dargestellt werden. Eine Ausnahme bildet das Ovar, wo SMOC-1 nicht in der Basalmembran, sondern ausschließlich in der Zona Pellucida, die die Eizelle umgibt und für die Befruchtung von Bedeutung ist, zu finden ist (Vannahme et al., 2002). Durch Protein-Protein-Interaktionsstudien konnte eine Bindung von SMOC-1 an die Basalmembranproteine Laminin-1, Nidogen-1 und Perlecan (Fragment IV-1) nachgewiesen werden (Heep, 2005).

Um all diese *in vitro* oder *ex vivo* Studien im lebenden Organismus betrachten zu können, sind eine ganze Reihe von Tiermodellen im Einsatz. So wurde die Maus bereits mehrfach erwähnt, doch auch *Xenopus laevis*, *Drosophila*, *C. elegans* oder der Zebrafisch (*Danio rerio*) sind weitverbreitet.

1.8 Der Zebrafisch als Modellsystem

Besonders im Bereich der Entwicklungsbiologie wird der Zebrafisch schon seit Jahren als Modellsystem verwendet. Ergebnisse aus Studien mit dem Fisch lassen sich nur schwer direkt auf den Menschen übertragen, doch kann in kurzer Zeit eine Fülle an Informationen über die Funktionen von Genen und Proteinen gewonnen werden. Der Zebrafisch hat eine hohe Nachkommenzahl, deren Entwicklung außerhalb des Uterus stattfindet und damit leicht zu beobachten ist. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Eier, Embryonen und Jungfische transparent sind. Die Entwicklung läuft sehr schnell ab (*Abb. 1.6*), so dass der Zebrafisch bereits nach 90 Tagen den adulten Status erreicht hat und vor allem auch die Entwicklung vom Ei zur Larve sehr schnell vor sich geht. Mit dem Schlüpfen ist innerhalb der ersten drei Tage nach der Eiablage zu rechnen. Der Fisch ist dann schon voll funktionsfähig.

Fehlt also während der Entwicklung ein Gen oder Protein, kann dies innerhalb kürzester Zeit zu morphologischen Auffälligkeiten oder Veränderungen führen. Aus diesem Grund finden gerade im Zebrafisch, aber auch in *Xenopus* oder Huhn die *antisense*-Technologien in den letzten Jahren verstärkt Anwendung. Dabei wird mRNA gezielt inaktiviert, indem ein komplementärer Strang in der lebenden Zelle an die gewünschte mRNA bindet. Die molekulare Zusammensetzung der *antisense* Nukleinsäuren und der inhibitorische Mechanismus kann hierbei unterschiedlich sein.

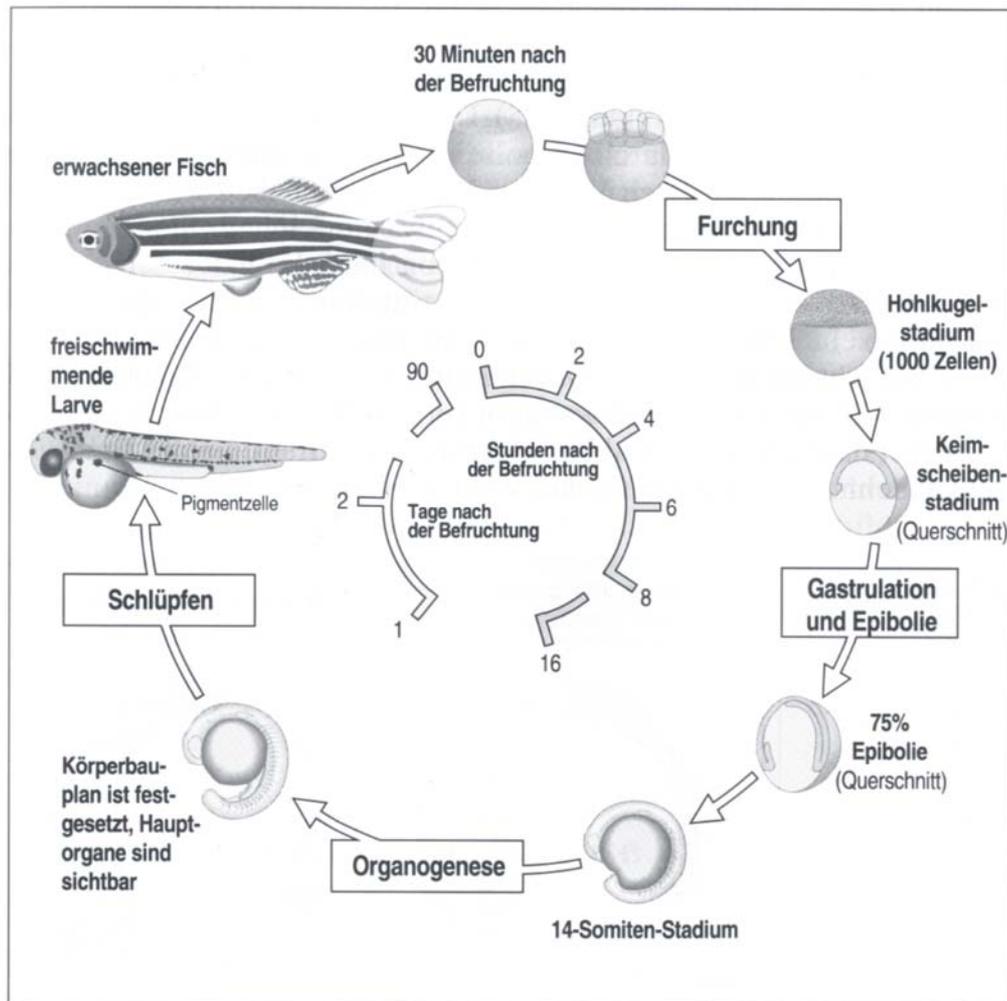


Abb. 1.6: Übersicht über die Zebrafisch-Entwicklung (aus Lewis Wolpert, „Entwicklungsbiologie“). Schematische Darstellung der Entwicklung des Zebrafischs von der Befruchtung des Eis bis zum adulten Tier. Dabei wird insbesondere der zeitliche Ablauf verdeutlicht.

1.8.1 Die Morpholino-Technologie

Im Fisch wird die sogenannte Morpholino-Technologie eingesetzt, bei der anstelle von Ribonukleotiden das RNA-Analogon Morpholin verwendet wird, das nicht anfällig gegenüber RNaseH ist (Abb. 1.7). Die Morpholinos bilden hybride Doppelstränge mit komplementären mRNA-Einzelsträngen. Die Nukleotidsequenz des Morpholinos besteht aus 25 Basen und besitzt hundertprozentige Homologie zu einem nicht-translatierten Bereich am 5'-Ende der mRNA. Der kurze doppelsträngige Bereich vor der translatierten Region verhindert den Beginn der Translation, da der ribosomale Translationskomplex aufgrund des hybriden Bereichs nicht andocken kann. Allerdings verdünnt sich die effektive Konzentration injizierter Morpholinos mit dem Wachstum des Embryos nach jeder Zellteilung, so dass sich der inhibitorische Effekt schließlich aufhebt. Daher spricht man nicht von Knockout-, sondern von Knockdown-Phänotypen (nach Begemann, 2004).

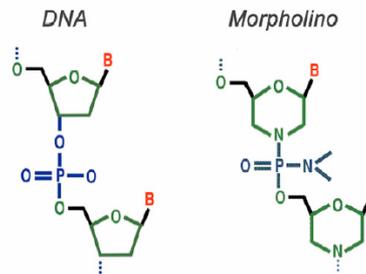


Abb. 1.7: Aufbau von Morpholinos (nach Begemann, 2004).

Grundbaustein der DNA sind die Nukleotide, die aus einer heterozyklischen Base, der Ribose und der verknüpfenden Phosphorsäure zusammengesetzt sind. In Morpholinos sind die Basen mit einem heterozyklischen Morpholinring verbunden; im Gegensatz zu DNA sind die Phosphoramidatgruppen ungeladen. B=Base (Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin)

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Die Lokalisation von SMOC-2 konnte bisher nicht bestimmt werden, da sich alle hergestellten Antiseren aufgrund starker Kreuzreaktivität gegenüber anderen BM-40 Familienmitgliedern als untauglich für die Immunhistochemie erwiesen. Daher war das erste Ziel der Arbeit die Produktion und Aufreinigung neuen Proteins, das zur Affinitätsreinigung der Seren verwendet werden konnte. Dazu sollten neben dem Gesamtprotein auch Proteinfragmente kloniert, exprimiert und gereinigt werden.

Mit den affinitätsgereinigten Antikörpern sollte die Analyse der Expression von SMOC-2 im Gewebe durchgeführt und das Protein näher charakterisiert werden. Zu diesen Untersuchungen sollten Western Blot Analysen und Immunhistochemie eingesetzt werden. Besonderes Augenmerk galt der Verteilung des Proteins in der adulten Maus wie auch der Expression während der Embryonalentwicklung.

Durch die Herstellung rekombinanter Proteine sollten des Weiteren mögliche Einflüsse von SMOC-1 und SMOC-2 auf zelluläre Prozesse wie Zelladhäsion und Zellmigration untersucht werden. Um potentielle Funktionen bestimmten Proteindomänen zuordnen zu können, sollten definierte Domänen einzeln oder in Kombination in eukaryotischen Zellen exprimiert und gereinigt werden. Dazu mussten die korrespondierenden cDNA-Fragmente über PCR hergestellt und in geeignete Vektoren kloniert werden. Der verwendete Expressionsvektor enthielt neben den Konstrukten zur Sicherstellung der Sekretion das BM-40 Signalpeptid und für die Reinigung über Affinitätschromatographie einen *Tag*.

Um auch *in vivo* eine Analyse der Funktion beider Proteine zu ermöglichen, sollte über die neuartige Morpholino-Technologie im Zebrafisch die Translation der Proteine unterdrückt werden. Diese Versuche sollten Aufschluss darüber geben, ob es beim Fehlen der SMOCs zu deutlichen morphologischen oder Verhaltensauffälligkeiten kommt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die verwendeten Chemikalien und Enzyme wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Fluka bzw. Sigma (Taufkirchen), Gibco™ bzw. Invitrogen (Karlsruhe), Biozym (Oldendorf), Sigma (Steinheim), Roche (Mannheim), Serva (Heidelberg) oder New England Biolabs (Schwalbach) bezogen. Zum Ansetzen aller Lösungen wurde entionisiertes Wasser aus einer Reinstwasseranlage von Millipore verwendet. Die Chemikalien hatten die Qualität *pro analysis*.

2.1.1 Puffer

PBS: 8,4 mM Na₂HPO₄
1,5 mM NaH₂PO₄
137 mM NaCl
2,7 mM KCl
Einstellung des pH-Wertes von 7,4 mit HCl

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

Alle weiteren Puffer werden bei den entsprechenden Methoden beschrieben.

2.1.2 Proteine

Humanes Plasma Fibronectin	CHEMICON
Humanes Vitronectin	Promega
Bovines Kollagen Typ I	Biochrom
Trypsin aus Schweinepankreas	SIGMA
Protein-Molekulargewichtsstandard: LMW (Low Molecular Weight)-Marker	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

2.1.3 Antikörper

Primärantikörper

Antikörper, Typ	Quelle	Hersteller	Verdünnung
gegen humanes SMOC-1	Kaninchen, polyklonal	Immunsierung unserer Antigene durch Pineda Antikörper-Service	1:500 WB und IF
gegen murines SMOC-2	Meerschweinchen, polyklonal	Immunsierung unserer Antigene durch Pineda Antikörper-Service	1:500 WB und IF
gegen murines Laminin-1	Kaninchen, polyklonal	Immunsierung unserer Antigene durch Pineda Antikörper-Service	1:2000 IF
gegen murines Cytokeratin-14	Kaninchen, polyklonal	Covance Research Products	1:2000 IF
gegen humanes $\alpha 6$ Integrin (GoH3)	Ratte, monoklonal	CHEMICON	20 $\mu\text{g/ml}$ CA
gegen humanes $\beta 1$ Integrin (mAb13)	Ratte, monoklonal	Prof. Dr. Martin J. Humphries, University of Manchester	20 $\mu\text{g/ml}$ CA
gegen humanes αv Integrin	Maus, monoklonal	Dr. Simon L. Goodman, MERCK, Darmstadt	20 $\mu\text{g/ml}$ CA
gegen murines $\beta 6$ Integrin	Maus, monoklonal	CHEMICON	20 $\mu\text{g/ml}$ CA
gegen murines $\beta 6$ Integrin	Kaninchen, monoklonal	Prof. Dr. Dean Sheppard, University of California, San Francisco	1:10 IF
gegen murines Vinculin	Maus, monoklonal	SIGMA	1:400 IF
Tetra-His	Maus, monoklonal	QIAGEN	1:1000 WB und IF
c-Myc (9E10)	Maus, monoklonal	Santa Cruz Biotechnology	1:1000 WB
Strep-tag [®] II	Maus, monoklonal	IBA	1:1000 WB

WB=Western Blot; IF=Immunfluoreszenz; CA=Cell Adhesion Assay

Sekundärantikörper

Antikörper, Typ	Quelle	Hersteller	Verdünnung
Anti-Digoxigenin Fab-Fragmente, Alkalische Phosphatase gekoppelt	Schaf	Roche	1:4000 <i>In situ</i>
Anti-Meerschweinchen-IgG, HRP (<i>Horseradish Peroxidase</i>)-gekoppelt	Esel	Jackson ImmunoResearch	1:5000 WB
Anti-Meerschweinchen-IgG, Cy3-gekoppelt	Ziege	Jackson ImmunoResearch	1:800 IF
Anti-Meerschweinchen-IgG, Alexa488-gekoppelt	Ziege	Molecular Probes	1:1000 IF
Anti-Kaninchen-IgG, HRP-gekoppelt	Schwein	DAKO	1:3000 WB
Anti-Kaninchen-IgG, Cy3-gekoppelt	Ziege	Jackson ImmunoResearch	1:800 IF
Anti-Kaninchen-IgG, Alexa488-gekoppelt	Ziege	Molecular Probes	1:1000 IF
Anti-Maus-IgG, HRP-gekoppelt	Kaninchen	DAKO	1:2000 WB
Anti-Maus-IgG, Cy3-gekoppelt	Ziege	Jackson ImmunoResearch	1:800 IF

WB=Western Blot; IF=Immunfluoreszenz; *In situ*=*In situ* Hybridisierung

2.1.4 Zelllinien

EBNA293-Zellen: humane embryonale Nierenzellen (Invitrogen), in deren Genom das (HEK 293) EBNA-1 Gen integriert wurde und die eine G-418 Resistenz tragen

HT1080-Zellen: humane Fibrosarkomzellen (Barber et al., 1997)

A375-Zellen: humane Melanomzellen

WI26-Zellen: humane Lungenfibroblasten (Hayflick, 1961)

HaCaT-Zellen: humane Keratinozyten (Boukamp et al., 1988)

PAM212-Zellen: murine Keratinozyten

RCS-Zellen: Ratten Chondrosarkomzellen (Mukhopadhyay et al., 1995)

2.1.5 Bakterienstämme

Der *E. coli*-Stamm Top 10 wurde zur Transformation eingesetzt. Top 10 F': F- mcrA D (mrr-hsdRMS-mcrBC)(j 80lacZD M15 D lacX74 recA1 deoR AraD139 D (araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG.

2.1.6 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von Sigma-Genosys oder Invitrogen bezogen. Das Präfix m weist auf Primer für Maus, d für Zebrafisch (*danio rerio*) hin. S steht jeweils für einen *sense*-Primer, A für einen *antisense*-Primer.

Bezeichnung	Oligonukleotid in 5' → 3' Richtung
BM40	GTTCCCAGCACCATGAGGG
Rev2	CTGGATCCGGCCTTGCC
mSMOC-1 S1	GCCCGCTAGCCACCGCACCACCGGCCCCAGG
mSMOC-1 S2	GCCCGCTAGCCGATGCAAAGATGCTGGC
mSMOC-1 S3	AGCCAAGAGTGTAGAGGC
mSMOC-1 S4	TG TTCAGGTCCAGTTACC
mSMOC-1 S5	GGGTGTTAGCAAAGAAGG
mSMOC-1 S6	GCCCGCTAGCGAGAGTGACGCCAGAGCC
mSMOC-1 A1	CAATGACTGCGGCCGCTTAGACAAGGCGTCCGATGAAGC
mSMOC-1 A2	GGCTCTCTGGTACTCACACA
mSMOC-1 A3	CGTAGGACCTGCCGTCAGA
mSMOC-1 A4	CAATGACTGCGGCCGCTCACTTGGCTCTGGCGTCACTCTC
mSMOC-2 S1	GCCCGCTAGCCAGAAGTTCTCAGCGCTC
mSMOC-2 S5	GCCCGCTAGTCGCTCACCGTGGGAATTGC
mSMOC-2 S6	GCCCGCTAGCGGTTCAATAAATGAAAAGG
mSMOC-2 S7	GCCCGCTAGCGATGTGTCCAGGTGTGTGGC
mSMOC-2 S8	GCCCGCTAGCAACACAGCCCGAGCTCACC
mSMOC-2 A4	CAATGACTGCGGCCGCTCATCCTTGTTTCCTGGG
mSMOC-2 A5	CAATGACTGCGGCCGCTCACTTCGCTGGGTGAGC
mSMOC-2 A6	CAATGACTGCGGCCGCTCAATTGTCATTCTTGGGCTGC
dSMOC-1 S1	GAGGGCGAAATGCAGGGACG

dSMOC-1 S2	GGCCGATGCAAAGAAGCAGG
dSMOC-1 S3	AGAACCCGCGGGAAGCCATC
dSMOC-1 S4	CCTCGCTACCTACTGGACC
dSMOC-1 S5	GCCGTGTGAACACTTCATCG
dSMOC-1 S6	CAACAAGAAGGAGATGAAGCCC
dSMOC-1 S7	CAAGAATTTGGACGATCCC
dSMOC-1 S8	ATGTCAAGGAGAAACCCG
dSMOC-1 A1	TTGGTATCATAACTGCGTCC
dSMOC-1 A2	ACCACACACAGGCTTGC
dSMOC-1 A3	GCCGCTGACTGGCTTGCCAT
dSMOC-1 A4	GTCAGATCTCTGTCTCTGAA
dSMOC-1 A5	GGCTTGTTATGAATTCCACT
dSMOC-1 A6	CCTTGCCTTGTCCCTTGACT
dSMOC-1 A7	CCGAAGACCTACTTACTGAAC
dSMOC-1 A8	CGATGAAGTGTTACACGGC
dSMOC-1 A9	TTTATAATTTCTCAGAATCC
dS1 A10	TCCAGCAGTGAACAGATGCC
dSMOC-2 S1	GGATTTAAGGAATTAAGCCCC
dSMOC-2 S2	CCACAGAGCACAGTCTGC
dS2 S2 (Nhe)	GCCCGCTAGCCCACAGAGCACAGTCTGC
dSMOC-2 S3	ACAGGAAGAAGCAAGACAGC
dSMOC-2 S4	CTCTGGAGCTCCTCGAAAGC
dSMOC-2 S5	AATCAGATCCGTCGACGG
dSMOC-2 S6	AAGGACCATACAGGAGCC
dSMOC-2 S7	GCCCGCTAGCCACAACTCTCCGCGCTCACG
dSMOC-2 S8	GCCCGCTAGCGAATGCAACACAGACTGC
dSMOC-2 S9	GCCCGCTAGCAAGTGTGTTGCAGAGAAG
dS2 S10	GCCCGCTAGCTCGTGTGATCAGGAGCAG
dS2 S11	AAGAAACCCAGTGCCAA
dSMOC-2 A1	GCTTTCGAGGAGCTCCAGAG
dSMOC-2 A2	CTCTGGACATCCTGCAGTGT
dSMOC-2 A3	CCGTCGACGGATCTGATT
dSMOC-2 A4	CCCTCTTCCTTAGTGACA

dS2 A4 (Not)	CAATGACTGCGGCCGCTCACCCCTTTCCTTAGTGACA
dSMOC-2 A5	CAATGACTGCGGCCGCTCAATCACATTTGGTTGGTTC
dSMOC-2 A6	CAATGACTGCGGCCGCTCATTGGCACTGGGGTTTCTT
dSMOC-2 A7	CAATGACTGCGGCCGCTCAGGTCGATTGTGTTCTGGT
dSMOC-2 A8	CAATGACTGCGGCCGCTCAGACACCCAGACAGCCCAT
dSMOC-2 A9	GGCTCCTGTATGGTCCTT

2.1.7 Vektoren

Klonierungsvektor: Um die PCR-amplifizierten Konstrukte sequenzieren zu können, wurde der Klonierungsvektor pDrive (QIAGEN) verwendet. Der Vektor liegt bereits in linearisierter Form vor. Zur Ligation in den Vektor werden PCR-Produkte empfohlen, die mit einer Polymerase ohne Proofreading-Aktivität erzeugt wurden. Solche Polymerasen hängen einzelne Adenosin-Überhänge an das 3'-Ende ihrer Reaktionsprodukte, welche an den Uridin-Überhang des pDrive-Vektors hybridisieren können.

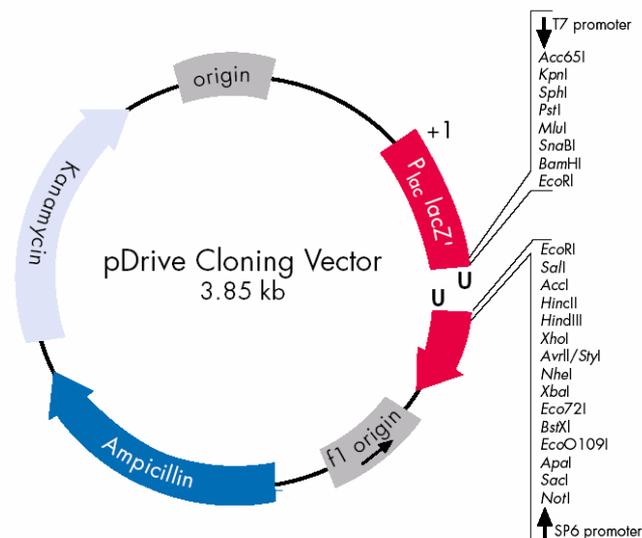


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des pDrive-Vektors (QIAGEN).

Der Klonierungsvektor der Firma QIAGEN wurde eingesetzt. Er trägt eine Kanamycin- und eine Ampicillin-Resistenz, die für Restriktionsverdauung möglichen Enzyme sind angegeben.

Expressionssvektor: Die Subklonierung der sequenzierten Konstrukte erfolgte in den Expressionsvektor pCEP-Pu, der eine Modifikation des eukaryontischen pCEP4-Vektors

(Invitrogen) darstellt. In die multiple cloning site (MCS) dieses Vektors wurde ein BM-40 Signalpeptid (Kohfeldt et al., 1997) eingeführt. Der Vektor besitzt zudem noch eine Ampicillin- und eine Puromycin-Resistenz für die Selektion sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten.

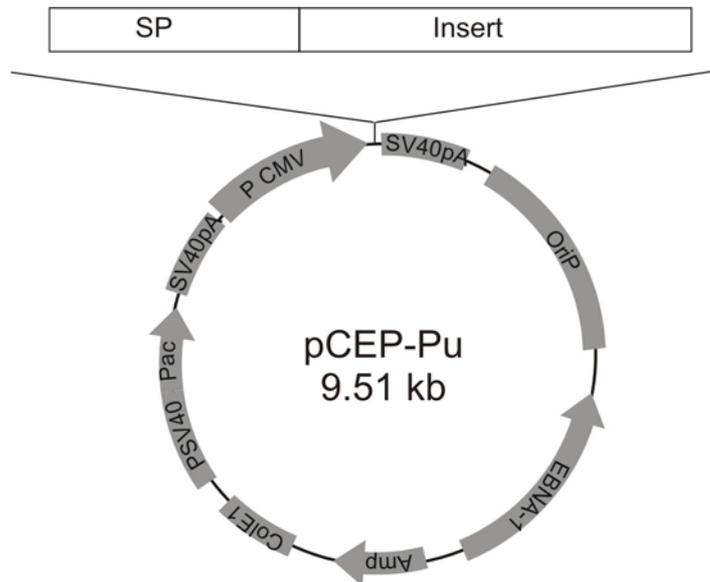


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der pCEP-Pu Vektorkarte.

Der Expressionsvektor pCEP-Pu wurde zur eukaryontischen Expression von SMOC in Zellen verwendet. OriP - bakterieller Replikationsursprung; P und SV40pA – Promotor und Polyadenylierungssignal des Simian Virus 40; P CMV – Promotor des Cytomegalievirus; Amp – Ampicillin-Resistenz; EBNA-1 - Epstein Barr nukleares Antigen-1 (EBNA-1 und oriP ermöglichen zusammen eine episomale Replikation). Es wurde ein Insert mit Signalpeptid (SP) eingeführt.

2.2 Methoden

Wenn nicht näher beschrieben, wurden die hier aufgeführten Methoden den Lehrbüchern „Antibodies: A laboratory manual“ (Harlow und Lane, 1988), „Molecular Cloning: A laboratory manual“ (Sambrook et al., 1989), „Der Experimentator: Proteinchemie“ (Rehm, 2000) und „Zebrafish: A practical approach“ (Nüsslein-Volhard und Dahm, 2002) entnommen und bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR können durch Verwendung spezifischer Oligonukleotide (Primer) DNA Abschnitte *in vitro* amplifiziert werden (Saiki et al., 1988). Dabei wird die doppelsträngige DNA zunächst denaturiert, anschließend können sich die spezifischen Oligonukleotide an die DNA anlagern (*Annealing*). Die DNA Polymerase synthetisiert nun in Anwesenheit von dNTPs wieder einen DNA-Doppelstrang (*Extension*). Um die DNA zu Beginn der Reaktion vollständig zu denaturieren, wurde sie in einem ersten Schritt 3 min bei 95°C denaturiert. Für den letzten Zyklus wurde eine Polymerisationsdauer von 10 min gewählt, um noch nicht fertig gestellte Produkte zu vervollständigen. Die Reaktion wurde in einem programmierbaren „Thermocycler“ durchgeführt.

Reaktionsansatz:

0,3 µl	cDNA
2,5 µl	Taq Puffer
0,5 µl	DMSO
0,4 µl	dNTPs [25 mM]
0,5 µl	<i>sense</i> Primer
0,5 µl	<i>antisense</i> Primer
0,2 µl	Taq Polymerase
20,1 µl	ddH ₂ O

Um möglichst spezifische PCR Produkte zu erhalten, wurde zunächst eine hohe *Annealing*-Temperatur gewählt, die in den ersten 10 Zyklen um je 0,5°C erniedrigt wurde. In den weiteren 25 Zyklen wurde dann eine niedrigere Temperatur gewählt, um das Produkt auch

in ausreichenden Mengen zu erhalten. Da die Aktivität der Polymerase im Laufe der Reaktion nachließ, wurde bei den letzten 25 Zyklen die Extensions-Zeit um je zehn Sekunden verlängert. Die Extensions-Zeit wurde entsprechend der Produktgröße gewählt, wobei pro 1 kb mindestens eine Minute verwendet wurde. Für DNA-Fragmente bis zu einer Größe von 1 kb wurde die Taq-Polymerase (Roche) eingesetzt. Für alle anderen war die Gefahr von Mutationen zu groß, so dass eine Polymerase mit proof-reading Aktivität verwendet wurde (High-Fidelity, Roche).

Thermocycler-Programm:

3 min	95°C		
30 sec	95°C	-0,5°C je Zyklus	10 Zyklen
30 sec	64°C		
1 min 10 sec	72°C		
30 sec	95°C	+10 sec je Zyklus	25 Zyklen
30 sec	60°C		
1 min 10 sec	72°C		
10 min	72°C		

2.2.1.2 Klonierung der Konstrukte

Es wurden eine Reihe Primer zusammengestellt, um cDNA Fragmente zu amplifizieren, die jeweils die gesamten Proteine (FL), die Follistatin-ähnliche, die beiden Thyroglobulin-ähnlichen und die SMOC-Domänen (FTST), die beiden Thyroglobulin-ähnlichen, die SMOC- sowie die extrazellulären Domänen (TSTE), die beiden Thyroglobulin-ähnlichen und die SMOC-Domänen (TST) sowie die extrazelluläre Domäne allein (EC) enthielten. Die Primer waren für mSMOC-1 FL: S1 und A1, FTST: S1 und A4, TSTE: S2 und A1, TST: S2 und A4 und für EC: S6 und A1. Die Vorwärtsprimer führten jeweils eine NheI-Schnittstelle am 5' Ende ein, die Rückwärtsprimer ein Stopcodon zusammen mit einer NotI-Schnittstelle. Für mSMOC-2 gilt das entsprechende und folgende Primer wurden verwendet für FL: S1 und A4, FTST: S1 und A5, TSTE: S5 und A4, TST: S7 und A5 und für EC: S8 und A4.

Die über PCR-amplifizierte cDNA wurde in den pDrive Vector (QIAGEN) kloniert und sequenziert. Zur Herstellung rekombinanter Proteine wurden NheI/NotI

Restriktionsfragmente des pDrive-SMOC Plasmids aufgereinigt und in den eukaryontischen Expressionsvektor pCEP-Pu umkloniert. Die korrekte Insertion der Konstrukte in den pCEP-Pu-Vektor wurde jeweils wieder über Sequenzierung verifiziert.

2.2.1.3 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden beim ZMMK-Servicelabor in Auftrag gegeben. Für die Sequenzreaktion wurden entweder universelle Plasmid- oder interne Insert-spezifische Primer und ca. 300 ng Plasmid-DNA in Kombination mit dem *Abi Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Perkin Elmer Applied Biosystems) verwendet. Die Reaktionsprodukte wurden mit einem *Abi Prism 377 Automated Sequencer* (Perkin Elmer Applied Biosystems) analysiert.

2.2.2 Der Zebrafisch als Modellsystem

Der Zebrafisch ist neben der Maus ein interessantes Modellsystem. Aus diesem Grund wurden SMOC-1 und SMOC-2 auch im Zebrafisch kloniert. Dazu waren verschiedene neue Techniken von Nöten.

2.2.2.1 Zebrafisch-Haltung

Die Zebrafische werden in Tanks mit Wasser von 28,5°C gehalten, die in einem Raum mit Tag/Nacht-Zyklus von 14 h Licht und 10 h Dunkelheit aufgestellt waren. Die Wasserwerte mussten ständig überprüft werden, wobei eine Konzentration von 60 µg NaCl/l sowie ein pH-Wert von 5,5 angeraten wird. Nitrat und Nitrit sollten nach Möglichkeit nicht im System vorliegen.

Um befruchtete Zebrafisch-Eier zu erhalten, wurden jeweils ein Männchen und ein Weibchen am Abend vor der Verpaarung in einer Box zusammengesetzt, die durch eine Trennwand verhinderte, dass die Fische zusammenkommen konnten. Die Gegenwart des jeweils anderen Geschlechts führte dazu, dass diese sich aneinander gewöhnten und so nicht aggressiv reagierten, wenn sie sich verpaaren sollten. Am nächsten Morgen, sobald der Lichtzyklus begann, wurden Männchen und Weibchen in einem Becken verpaart, in dem ein Gitter die Fische vom Boden fernhielt. Die Eier, die nun bei der Ablage vom Männchen befruchtet wurden, fielen durch das Gitter, so dass die Tiere sie nicht fressen konnten. Sie wurden entnommen und in E3-Puffer bei 28,5°C im Inkubator gehalten.

Unbefruchtete Eier mussten entfernt und der Puffer täglich gewechselt werden, damit die Embryonen sich entwickeln konnten. Nach spätestens drei Tagen schlüpften die Embryonen und ab dem fünften Tag mußten sie auch zusätzlich gefüttert werden. Dazu

wurde zweimal täglich ein spezielles Babyfisch-Futter verwendet. Die Jungfische konnten ab dem fünften Lebenstag auch in die Zebrafisch-Anlage umgesetzt werden.

Im Alter von ungefähr 14 Tagen bedurften die Fische weiterer Zufütterung durch Artemien, die zu diesem Zweck gezüchtet wurden. Wenn sie herangewachsen waren, erhielten sie wie die Adulten zweimal täglich Lebendfutter in Form von Bosmidien und zweimal Trockenfutter. Dies war nötig, um die Tiere auf eine regelmäßige Eiablage vorzubereiten. Die Fische sind mit drei Monaten geschlechtsreif und können verpaart werden. Dazu war es nötig, Störgeräusche zu vermeiden und alle 10 Tage Verpaarungen anzusetzen, um die Tiere dadurch zur Eiablage zu trainieren.

E3-Puffer:

5 mM NaCl
0,17 mM KCl
0,33 mM CaCl₂
0,33 mM MgSO₄

2.2.2.2 RNA-Isolation

25 Zebrafisch-Embryonen oder 5 adulte Zebrafische wurden in Eiswasser überführt, dadurch getötet und dann in 800 µl Trizol homogenisiert. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei RT wurden 200 µl Chloroform zugegeben, 15 sec geschüttelt und 2-3 min bei RT inkubiert. Danach wurde bei 12000 x g für 15 min bei 4°C abzentrifugiert. Die Wasserphase wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und mit 10 µg Glykogen, dann mit 0,5 ml Isopropanol versehen. Nach 10 min bei RT wurde 10 min bei 4°C und 12000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 75% Ethanol gewaschen. Nach Vortexen und erneutem Zentrifugieren bei 7500 x g für 5 min bei 4°C wurde das Pellet getrocknet, in Wasser aufgenommen und 10 min auf 55°C gebracht. Danach konnte die RNA bei -70°C eingefroren werden.

2.2.2.3 Reverse Transkription

Um aus der RNA cDNA herzustellen, wurde die sogenannte Reverse Transkription durchgeführt.

Reaktionsansatz:

5 µl	RNA	}	2 min auf 70°C, dann auf Eis
7,5 µl	ddH ₂ O		
1 µl	oligo dT Primer		

4 μ l	5 x Puffer	}	1 h auf 42°C
1 μ l	dNTPs		
0,5 μ l	RNase Inhibitor		
1 μ l	Superscript Reverse Transkriptase		
danach	5 min auf 94°C, dann auf Eis		

Nach Zugabe der gewünschten Menge ddH₂O konnte die cDNA bei -20°C eingefroren werden und war für PCRs einsatzbereit.

PCRs wurden durchgeführt, um die kompletten SMOC-1 und SMOC-2 Sequenzen in Zebrafisch zu erhalten. Dazu wurden folgende Primer verwendet: für dSMOC-1 S5 und A10, für dSMOC-2 S2 und A4.

2.2.2.4 Die Morpholino-Technologie

Um einen ersten Eindruck über die Funktion eines noch nicht genauer charakterisierten Gens zu bekommen, werden in den letzten Jahren zunehmend *antisense*-Technologien verwendet. Seit dem Jahr 2000 wird die Morpholino *antisense*-Methode erfolgreich in Zebrafisch, aber auch in Seeigel, Krallenfrosch oder Hühnchen eingesetzt, um gezielt Transkripte zu inaktivieren.

Idealerweise wird ein Morpholino so gewählt, dass er auch das Startcodon der Translation (AUG) abdeckt. Morpholinos werden über dünne Glaskapillaren in die befruchteten Eier des Zebrafischs injiziert (*Abb. 2.3 A*). Dies muss im Ein-Zell-Stadium (*Abb. 2.3 B*) geschehen, um den Embryo nicht durch den Manipulationsvorgang selbst zu schädigen und um die Produktion der Zielproteine bereits von der frühen Entwicklung an zu unterbinden.

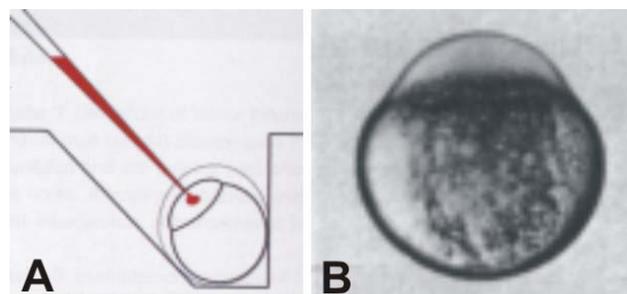


Abb. 2.3: Injektion der Zebrafisch-Morpholinos im Ein-Zell-Stadium (nach Nüsslein-Volhard und Dahm, 2002 „Zebrafish“, Plate 12).

Schematische Darstellung der Injektion einer befruchteten Eizelle (A); Fotografie einer Eizelle im Ein-Zell-Stadium (B).

Die Morpholinos für SMOC-1 und SMOC-2 wurden von der Firma GENE TOOLS, Philomath, USA ausgewählt und hergestellt und sehen wie folgt aus:

dSMOC-1	AGAGCCAGATTGTGACAGTTCATTC
dSMOC-1 <i>Mismatch</i>	AGACCCACATTCTGACACTTGATTC
dSMOC-1, Fluorescein markiert	CTGTCTGACGATGAAGTGTTACAC
dSMOC-2	CAGCAGCAGCACCGATACGCGCATC
dSMOC-2 <i>Mismatch</i>	CACCACCAGCAGCGATACCCGGATC

Vor der Injektion wurden die Morpholinos in sterilem Wasser auf 1 mM verdünnt und wenn sie nicht mit Fluorescein markiert waren, mit Phenolrot und FITC (Dextran Fluorescein, 10 000 MW anionic; D-1821 der Firma Molecular Probes; 1:50 verdünnt und dann 0,5 µl in 2 µl eingesetzt) angefärbt. Ersteres wurde verwendet, um den Erfolg der Injektion bei diesem Vorgang selbst überprüfen zu können, letzteres, um im Verlauf der Entwicklung des Zebrafischembryos weiterhin den Verbleib des Morpholinos verfolgen zu können. Am Beispiel des mit Fluorescein gekoppelten SMOC-1 Morpholinos werden Embryonen 10, 12 und 72 Stunden nach der Befruchtung (hpf) gezeigt (*Abb. 2.4*).

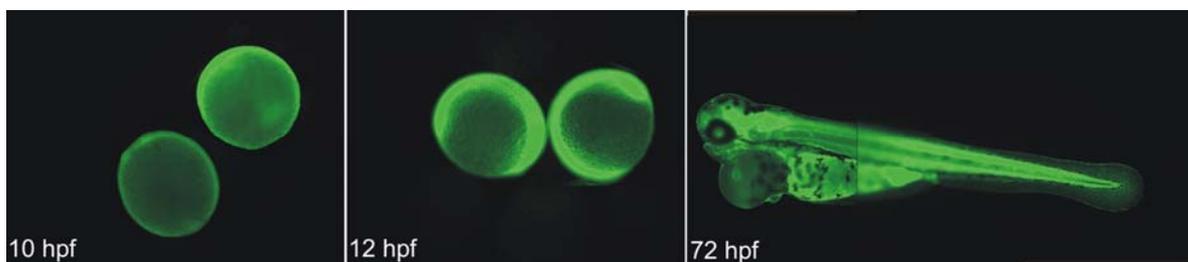


Abb. 2.4: Erfolgskontrolle der Injektion mittels Fluoreszenz-markiertem Morpholino 10, 12 und 72 hpf. Mit SMOC-1 Morpholino injizierte Embryonen werden 10, 12 oder 72 Stunden nach der Befruchtung (hpf) auf erfolgreiche Injektion untersucht.

Die nach der Eiablage gesammelten Eier mussten direkt injiziert werden, da dies nur im 1-4 Zell-Stadium möglich ist, ohne dass der Embryo Schaden nimmt. Dazu wurden die Eier auf eine Platte pipettiert, die mit durch Aktivkohle geschwärzter Agarose gefüllt war, und der E3-Puffer weitestgehend abgenommen. Die Morpholinos wurden in dünne Glaskapillaren aufgezogen und im Halter des Mikromanipulators befestigt. Danach wurden die Eier mit 2 nl Morpholino durch Einstechen in den Dottersack injiziert, was ungefähr 2 ng pro Oozyte bedeutet. Die Eier wurden wieder in E3-Puffer überführt und bei 28,5°C gehalten. Sie wurden wie die uninjizierten behandelt und am Binokular nach den angegebenen Zeiten beobachtet oder fotografiert.

Um eine bessere Darstellung der Embryonen zu erhalten, konnten diese, wenn sie 24 h und älter waren, mit 2,5 mg/ml Pronase in E3-Puffer für 5 min bei 28,5°C inkubiert und dadurch dechorioniert werden. Die Entwicklung läuft außerhalb des Chorions unverändert weiter. Danach konnten die Embryonen in frischem E3-Puffer gewaschen und darin bei 28,5°C weiter gehalten werden. Sollten frühere Stadien Betrachtung finden, wurden die Embryonen im Chorion in 4% PFA üN bei 4°C fixiert und konnten nach 3 x 5 minütigem Waschen in PBST mit Pinzetten dechorioniert werden. Die Lagerung war in 100% Methanol bei -20°C möglich.

2.2.2.5 Kontroll-Experimente: *Mismatch*, *Rescue*, *Überexpression*

Zunächst mussten für jede Injektion neue Kanülen angefertigt und deren Injektionsvolumen überprüft werden. Auch gab es einige wichtige Kontrollen, die parallel zu jeder Morpholino-Injektion durchzuführen waren. Zum einen sollten von den Gelegen gleichzeitig immer unbehandelte Eier mitaufgezogen werden, Eier mit Wasser und Eier mit einem *Mismatch*-Morpholino injiziert werden, um unspezifische Effekte erkennen zu können. Die unbehandelten Eier dokumentierten die Qualität der verwendeten Eier, die von Gelege zu Gelege sehr schwanken konnte. So sollte hier die Überlebensrate größer als 80% sein. Das galt auch für die mit Wasser injizierten Eier, die eine Kontrolle für die Injektion, die Kanüle und den Injizierenden selbst darstellte. Bei einer schlechten Injektionsmethode starben die Eier innerhalb kurzer Zeit.

Die *Mismatch*-Morpholino Injektion wurde durchgeführt, um eventuelle unspezifische Effekte des Morpholinos auszuschließen. Dafür wurden in der Morpholino-Sequenz fünf Basen ausgetauscht, wodurch der Morpholino nicht mehr an die Ziel-RNA binden und die Translation unterdrücken konnte. Damit sollten sich die Fische normal entwickeln und keinerlei morphologische Auffälligkeiten zeigen.

Für den Morpholino selbst mussten Dosis-Wirkungs-Beziehungen festgestellt werden, d. h. es wurden verschiedene Morpholino-Konzentrationen injiziert, um die Dosis zu determinieren, die einen spezifischen Effekt hervorrief. Für die SMOCs war die beste Konzentration 2 ng.

Um zu zeigen, dass eine morphologische Veränderung des Fisches nach Morpholino-Injektion tatsächlich das Ergebnis der gezielten Hemmung der Proteintranslation war und nicht auf irgendwie gearteten Nebenwirkungen des Morpholinos beruhte, wurden *Rescue*-Experimente durchgeführt. Diese „Rettung“ bestand darin, dass synthetisch hergestellte mRNA des Zielgens gleichzeitig mit dem Morpholino injiziert wurde, um dessen Wirkung aufzuheben. Dabei war darauf zu achten, dass die RNA direkt am Startcodon begann und die kodierende Region bis zum Stopcodon abdeckte, während die Morpholino-Sequenz 5' davon lag, so dass es zu keinerlei Überlappung kommen konnte. Das war wichtig, um zu verhindern, dass der Morpholino an

die RNA binden konnte. Während dieser nach Injektion nämlich die Ziel-mRNA des Fisches stilllegte, sollte über die zusätzlich injizierte RNA des betreffenden Gens eine Produktion des Proteins wieder möglich sein und der Fisch sich normal entwickeln können, keine morphologischen Veränderungen aufweisen und jeglicher Effekt des Morpholinos aufgehoben sein.

Um diese Kontrolle in die Experimente mit einschließen zu können, war es notwendig, RNA mit allen notwendigen Modifikationen wie 5`Cap und Polyadenylierung herzustellen, was über ein Kit der Firma Ambion erreicht wurde. Mit der RNA ließ sich neben dem *Rescue*-Experiment jeweils auch eine Überexpressionsstudie durchführen, die als Kontrolle der Wirksamkeit der RNA herangezogen wurde.

2.2.2.6 Herstellung von RNA für Überexpressionsstudien

In pDrive klonierte cDNA-Konstrukte der kompletten Zebrafisch-SMOCs wurden zur Verwendung des T7-Promotors mit HindIII linearisiert. Der Verdau wurde mit 2,5 µl 0,5 M EDTA abgestoppt und mit 5 µl 3 M Natriumacetat, 100 µl 100% Ethanol bei -20°C für 15 min gefällt. Dann wurde für 15 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, erneut abzentrifugiert und das Pellet in 20 µl ddH₂O aufgenommen. Es folgte ein Verdau mit 150 µg/ml Proteinase K und 0,5% SDS für 30 min bei 50°C und danach eine Phenol-Chloroform-Extraktion. Dazu wurden 171,8 µl ddH₂O und 200 µl Phenol zum Ansatz gegeben, gut gemischt und 5 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 200 µl Phenol/Chloroform im Verhältnis 1:1 gemischt und erneut abzentrifugiert. Das Ganze wurde mit 200 µl Chloroform wiederholt, danach wurde die obere Phase mit 20 µl Natriumacetat und 400 µl 100% Ethanol für 15 min bei -80°C gefällt. Es folgte wieder ein Zentrifugationsschritt bei 4°C für 30 min bei 13000 rpm. Das Pellet wurde in 300 µl 70% Ethanol gewaschen, 15 min bei 45°C getrocknet und in 10 µl ddH₂O aufgenommen. So vorbereitet konnte nun das Ambion mMessage mMachine[®] T7 Ultra Kit zum Einsatz kommen. Dieses ist geeignet für die *in vitro* Synthese von RNA mit einem Anti-Reverse Cap-Analog (ARCA) und einem Poly(A)-Schwanz, die so für *in vivo* Studien eingesetzt werden konnte, da sie als mRNA erkannt und nicht abgebaut wurde. Im ARCA ist eine der 3`OH-Gruppen durch -OCH₃ ersetzt, wodurch die T7-Polymerase nur an dem verbleibenden -OH Transkription initiieren und somit nur RNA in der richtigen Orientierung synthetisieren kann. Zudem werden auch *E. coli* Poly(A)Polymerase und ATP bereitgestellt, um einen Poly(A)-Schwanz von 50 – 100 Basen anzuhängen.

Im ersten Schritt wurde die *in vitro* Transkription durch Mischen von

10 µl	T7 2x NTP/ARCA
2 µl	10x T7 Reaktionspuffer
2 µl	T7 Enzym Mix
6 µl	DNA

eingeleitet und die Reaktion 2 h bei 37°C durchgeführt. Diese wurde durch Zugabe von 1 µl DNase für 15 min bei 37°C abgestoppt. Danach musste die gewonnen RNA noch mit dem Poly(A)-Schwanz versehen werden, um zu garantieren, dass sie *in vivo* nicht sofort abgebaut, sondern abgelesen wurde. Dazu wurde die Lösung der ersten Reaktion versehen mit

36 µl	ddH ₂ O
20 µl	5x E-PAP Puffer
10 µl	25 mM MnCl ₂
10 µl	ATP Lösung
4 µl	E-PAP

und 30-45 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde auf Eis und mit 10 µl Ammoniumacetat abgestoppt und gut gemischt. Es wurde eine Extraktion zunächst mit Phenol/Chloroform, dann mit Chloroform angeschlossen. Danach wurde die RNA mit Isopropanol gefällt und das Pellet in ddH₂O aufgenommen und weggefroren.

Die RNA konnte nun für die Injektion verwendet werden. Dabei kamen für Überexpressions-Studien Konzentrationen von 5 ng/µl (10 pg), 1 ng/µl (2 pg) und 500 pg/µl (1 pg) zum Einsatz, die in ddH₂O verdünnt und ebenfalls mit Phenolrot und FITC angefärbt wurden.

2.2.2.7 *In vitro* Transkription

Um RNA-Sonden für *in situ*-Hybridisierungen herzustellen, wurde ein anderer Weg der RNA-Herstellung gewählt. Die Sonde für SMOC-1 wurde über die Primer dSMOC-1 S2 und dSMOC-1 A4 zunächst auch in den pDrive-Vektor kloniert, der dann je nach Orientierung des Inserts linearisiert wurde. Sollte der T7- Promotor genutzt werden, wurde HindIII verwendet, für den SP6-Promotor musste mit MluI verdaut werden. Durch die Verwendung eines Kits der Firma Roche wurden im Verlauf der *in vitro* Transkription nun

direkt Digoxigenin-markierte Nukleotide eingebaut, so dass die Sonde später detektiert werden konnte.

Reaktionsansatz:

2 µl	10 x Transkriptionspuffer
4,5 µl	ddH ₂ O
2 µl	NTP-Mix
0,5 µl	RNase Inhibitor
2 µl	T7/SP6 Polymerase
9 µl	DNA

Dieser Ansatz wurde 2 h für T7 und 3 h für SP6 bei 37°C inkubiert. Dann wurden 0,5 µl RNase-Inhibitor und 2 µl DNase zugegeben und 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 2 µl 0,2 M EDTA, pH 8 abgestoppt und mit 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl absolutem Ethanol bei -20°C für 30 min gefällt. Die Zentrifugation bei 4°C für 15 min ergab ein Pellet, das mit 50 µl 70% Ethanol gewaschen und nach erneutem Zentrifugieren in ddH₂O aufgenommen werden konnte. Die RNA war nun einsatzbereit und konnte auf einem Agarose-Gel getestet werden (Abb. 2.5). Ob die Digoxigenin-Markierung erfolgreich verlaufen war, konnte durch Auftropfen eines Aliquots der RNA auf eine Membran und anschließender Antikörper-Detektion mit einem Antikörper gegen Digoxigenin im Vergleich mit einer Positivkontrolle überprüft werden.

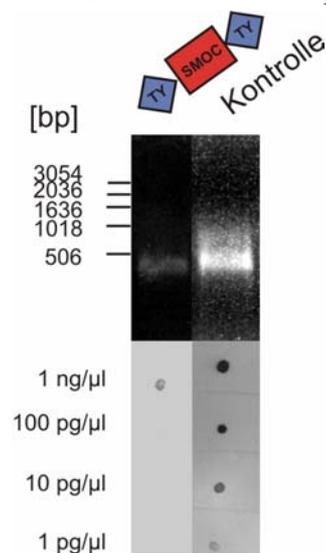


Abb. 2.5: Qualitätskontrolle der SMOC-1 Sonde zur *in situ* Hybridisierung.

Für SMOC-1 wurde eine *antisense*-Sonde von 582 Nukleotiden hergestellt, die die erste Thyroglobulin-, die spezifische SMOC- und zweite Thyroglobulin-Domäne beinhaltet. Die RNA wird im Vergleich zu einer Kontrolle auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Die Effizienz der Digoxigenin-Markierung wird über eine Antikörper-Inkubation bestimmt und durch Vergleich mit einer Positivkontrolle quantitativ abgeschätzt.

2.2.2.8 *In situ* Hybridisierung

Die Embryonen, die auf Expression getestet werden sollten, wurden zu unterschiedlichen Zeiten fixiert und in Methanol gelagert. Danach erfolgte zunächst Äquilibrierung, indem sie 5 min bei RT in 75% Methanol/PBS, dann weitere 5 min in 50% Methanol/PBS und 5 min in 25% Methanol/PBS gewaschen wurden. Nach 4 x 5 min in PBST wurde ein Proteinase K Verdau angeschlossen, der für verschiedene Stadien unterschiedlich lange andauerte: Waren die Embryonen jünger als 6 hpf, wurde 5 min bei RT in 2,5 µg/ml Proteinase K (Roche # 03115879001), von 6 bis 12 hpf, 5 min in 10 µg/ml Proteinase K verdaut. Danach blieb die Konzentration auf 10 µg/ml, doch wurden Embryonen 12-24 hpf 10 min, 24-48 hpf 20 min und älter als 48 hpf 30 min inkubiert. Dies erhöhte die Sensitivität der Prozedur, indem Proteine von der mRNA abgedaut werden und damit der Sonde besserer Zugang verschafft wurde. Nach 2 x 5 min Waschen in 2 mg/ml Glycin/PBST wurde 30 min in 4% PFA bei RT fixiert. Dann wurde erneut 5 x 5 min in PBST gewaschen, bevor die Prähybridisierung begann.

500 µl Hybridisierungs-Puffer, der auf 65°C vorgewärmt wurde, wurden auf die Embryonen gegeben und diese darin bei 65°C für 2 h inkubiert. Ein Teil der Embryonen wurde nun mit Antikörper gegen Digoxigenin 1:400 versetzt und üN bei 4°C inkubiert, um den Antikörper zu präabsorbieren. Der Rest der Embryonen wurde mit Hybridisierungs-Puffer versehen, der die jeweilige Sonde enthielt und 4 min bei 80°C denaturiert worden war. 50 ng der Sonde wurden üN bei 65°C hybridisiert. Danach wurde die Sonde abgenommen und Waschschrte von jeweils 10 min bei 65°C angeschlossen. Zunächst wurde mit einem Mix aus 66% Hybridisierungs-Puffer mit 33% 2 x SSC, dann in 33% Hybridisierungs-Puffer mit 66% 2 x SSC, in 2 x SSC und abschließend in 0,2 x SSC gewaschen. Nach einer weiteren Inkubation mit 0,2 x SSC bei 65°C für 10 min wurden die Proben 10 min auf RT gebracht. Danach erfolgten Waschschrte bei RT mit 66% 0,2 x SSC mit 33% PBST und 33% 0,2 x SSC mit 66% PBST für 10 min. Nach 10 min in PBST konnte für mindestens 2 h blockiert werden.

Die Antikörperinkubation wurde angeschlossen bei 4°C üN in Blocklösung mit dem bereits präabsorbierten Antikörper gegen Digoxigenin, der nochmals 1:10 verdünnt wurde (1:4000). Diese Lösung konnte dreimal verwendet werden. Die Embryonen wurden mit 500 µl PBST 6 x 10 min gewaschen, dann 2 x 10 min in AP-Puffer äquilibriert. Darin wurden die Embryonen nun in 24-Loch-Platten transferiert, der Überstand wurde abgenommen und die Farbentwicklung durch Zugabe von 150 µl BM-Purple AP Substrat (Nalgene # 1442074) eingeleitet. Dazu wurden die Platten bei RT im Dunkeln geschüttelt, bis die gewünschte Intensität erreicht war. Abgestoppt werden konnte durch Waschen in PBST für 2 x 10 min. Die Embryonen konnten dann in 4% PFA bei 4°C im Dunkeln nachfixiert und gelagert werden.

<u>PBST:</u>	<u>20 x SSC:</u>	<u>Blocklösung:</u>
1 x PBS	3 M NaCl	28 ml TBTB
0,1% Tween® 20	0,3 M NaCitrat	5 ml 10% Blocking reagent (Boehringer Mannheim)

<u>Hybridisierungs- Puffer :</u>	<u>AP-Puffer:</u>
50% Formamid	100 mM NaCl
5 x SSC	50 mM MgCl ₂
0,1% Tween® 20	100 mM Tris/HCl, pH 9,5
500 µg/ml torula (Hefe) RNA	1 mM Levamisol
50 µg/ml Heparin	0,1% Tween® 20

2.2.3 Proteinchemische Methoden

2.2.3.1 Proteinquantifizierung

Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Detektion von Proteinen ist aufgrund der Absorption des aromatischen Gerüsts von Tryptophan und Tyrosin bei 280 nm möglich. Unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten für Proteine bei 280 nm, korrigiert um den Wert bei 320 nm, um eventuelle Verunreinigungen zu erfassen, lässt sich die Proteinkonzentration mit folgender Formel berechnen: $C = (\text{OD } 280 \text{ nm} - \text{OD } 320 \text{ nm}) / \text{Extinktionskoeffizient}$

BCA-Assay

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

2.2.3.2 Chromatographische Verfahren

Um die von den transfizierten Zellen exprimierte Proteine zu reinigen, wurden verschiedene chromatographische Verfahren benutzt. In Abhängigkeit von ihren individuellen Eigenschaften wie Ladung, Größe oder Hydrophobizität binden Proteine unterschiedlich stark an verschiedene Matrices und können durch eine geeignete Kombination verschiedener Methoden zur Homogenität gereinigt werden.

Zunächst wurden jeweils serumfreie Kulturüberstände gesammelt und mit 1 mM PMSF als Proteaseinhibitor versetzt. Danach wurde der Überstand auf 2 M Harnstoff, 50 mM Tris und pH 8 eingestellt, abzentrifugiert und filtriert, um alle eventuell vorhandenen Schwebstoffe zu entfernen. Wenn möglich wurde die Reinigung sofort angeschlossen, falls eine Lagerung nötig war, erfolgte diese bei 4°C.

Affinitätsreinigung mittels Histidinmotiv

Da alle Konstrukte ein N-terminales Octahistidin-Motiv mit anschließender Thrombin-Schnittstelle besaßen, wurde zunächst eine Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA (Qiagen) oder Talon-Matrix (Clontech) angestrebt. Dazu wurde eine Säule mit 10 ml Matrix nach Angaben des Herstellers gepackt. Für beide Matrices gab es unterschiedliche Regenerationsprotokolle. Die Ni-NTA Matrix wurde mit 2% SDS und 100 mM EDTA gewaschen und dann wieder mit 100 mM Nickel beladen, während die Talon-Matrix mit 25 mM MES bei pH 5 gewaschen und mit 500 mM Cobalt wieder beladen wurde. Als Waschpuffer diente jeweils 2 M Harnstoff, 50 mM Tris, pH 8, in dem die Überstände vor Beladen der Säule auch äquilibriert wurden. Das Medium wurde dann mit einer Peristaltikpumpe auf die Säule gegeben (1 ml/min) und die Matrix mit dem Waschpuffer nachgespült. Die Elution erfolgte über einen linearen Imidazolgradienten (0-250 mM in Waschpuffer). Das Prinzip beruht auf der Verdrängung des Histidin-Motivs durch das Imidazol. Es wurden jeweils 70 Fraktionen zu je 1 ml gesammelt.

Thrombin-Verdau

Die positiven Fraktionen wurden vereinigt und mit 2 M Tris, pH 8 auf diesen Wert gepuffert. Die Zugabe von 2 mM CaCl₂ ermöglichte optimale Bedingungen für das Enzym. Thrombin wurde in einer Konzentration von 1 U/mg Protein zugesetzt und üN bei RT inkubiert.

2.2.3.3 Proteinfällung mit TCA

Proteine können durch Säuren gefällt werden, da die pH-Verschiebung die Löslichkeit der Proteine beeinflusst. Dazu wurden 1-ml Aliquots der Proteinlösungen nach Zugabe von 10 µl 0,1% Triton X-100 und 250 µl 50% Trichloressigsäure in Wasser für 20 min auf Eis inkubiert, die gefällten Proteine 15 min bei 13000 rpm und 4°C abzentrifugiert und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Pellet an der Luft getrocknet und in 1x SDS-Probenpuffer gelöst.

2.2.3.4 Proteinextrakte aus der Zellkultur

Die Proteine wurden in drei Fraktionen unterteilt:

- 1) serumfreier Zellkulturüberstand
- 2) Zellen: zelluläre Proteine aus lysierten Zellen und zellassoziierte Proteine
- 3) Matrix: extrazelluläre Proteine, die bereits in die Matrix eingebaut wurden bzw. an der Zellkulturschale haften

Die Überstände wurden abgenommen und stellten die erste Fraktion dar. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, um eventuelle Medium-Reste zu entfernen. Sie wurden abtrypsiniert und in 1 ml PBS mit 1% CHAPS aufgenommen, 10 sec bei Amplitude 70 sonifiziert und 30 min bei 4°C rotiert. Danach erfolgte eine 30 minütige Zentrifugation, wonach der abgenommene Überstand die Zellfraktion darstellte. Was auf der Platte verblieb, wurde mit 1x SDS-Probenpuffer versehen, abgeschabt und stellte die Matrixfraktion dar.

2.2.3.5 Proteinextrakte aus Gewebe

Für die Hautproben wurde die Rückenhaut neugeborener oder adulter C57Bl/6 Mäuse entfernt und über Nacht bei 4°C in 1 M NaCl oder 0,05% Trypsin inkubiert, um Dermis und Epidermis voneinander zu trennen. Die beiden Hautbestandteile wurden dann in einem Polytron in Suspensionspuffer homogenisiert und für 30 min bei 4°C und 13000 rpm abzentrifugiert. Abschließend wurden Pellet und Überstand getrennt in 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen.

Suspensionspuffer :

100 mM NaCl

10 mM Tris/HCl, pH 7,6

1 mM EDTA, pH 8

1 µg/ml Aprotinin

10 µg/ml PMSF

2.2.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE unter Verwendung eines Tris/Glycin-Puffersystems (Laemmli, 1970) durchlaufen die Proteine zuerst ein großporiges Sammelgel (pH 6,8), werden an der Grenzschicht zum Trenngel konzentriert und laufen dann als scharfe Bande ins Trenngel (pH 8,8) ein, wo sie nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Als Trennmatrix wurde eine Mischung aus Acrylamid und Bisacrylamid (37,5:1)

verwendet, die durch Zugabe von Ammoniumpersulfat und N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) polymerisiert wurde. Für das Sammelgel wurde eine Acrylamid-Konzentration von 4%, für das Trenngel Acrylamid-Konzentrationen von 12-16% gewählt, je nach Größe der zu analysierenden Proteine.

	Sammelgel		Trenngel	
	(4%)	(12%)	(14%)	(16%)
AA/Bis (30%/0,8%)	4,1 ml	10 ml	11,67 ml	13,3 ml
3 M Tris pH 8,8		4,625 ml	4,625 ml	4,625 ml
1 M Tris pH 6,8	3,7 ml			
H ₂ O	22,3 ml	10,25 ml	8,583 ml	6,917 ml
10% SDS	300 µl	250 µl	250 µl	250 µl
10% APS	300 µl	85 µl	85 µl	85 µl
TEMED	41 µl	15 µl	15 µl	15 µl

Die zu untersuchenden Proben wurden mit reduzierendem 1x SDS-Probenpuffer (mit 5% β -Mercaptoethanol) versetzt, für 5 min auf 100°C erhitzt und auf einem SDS-PAA-Gel der Größe 7,5 cm x 10 cm x 1,2 mm aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte unter Wasserkühlung bei konstanter Stromstärke von etwa 30 mA.

Elektrophorese-Puffer:

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

2 x Probenpuffer:

20% Glycerin
4% SDS
0,2% Bromphenolblau
50 mM Tris/HCl pH 6,8

Zur Abschätzung der Massen wurde ein Molekulargewichtsmarker parallel mit aufgetrennt.

Molekulargewichtsmarker LMW (low molecular weight):

Phosphorylase b	94 kDa
Bovine serum albumin	67 kDa
Ovalbumin	43 kDa
Carbonic anhydrase	30 kDa
Trypsin inhibitor	20 kDa
Lysozyme	14 kDa

Die Proteine konnten nun direkt über eine Coomassie Färbung sichtbar gemacht werden oder wurden zunächst auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert.

2.2.3.7 Coomassie Brilliant Blue Färbung

Für diese Art der Färbung wurde das Gel etwa 1 h in Färbelösung geschwenkt und anschließend in Entfärbelösung überführt. Diese wurde erneuert, bis die gewünschte Intensität der Färbung erreicht war. Die Aufbewahrung der Gele erfolgte in 7% Essigsäure. Die Nachweisgrenze der Coomassie Färbung liegt bei 0,1 µg Protein.

Färbelösung:

0,125% Coomassie Brilliant Blue R250
50% Methanol
5% Essigsäure

Entfärbelösung:

70% Methanol
10% Essigsäure

2.2.3.8 Western Blot Analyse

Die Proteine wurden entweder direkt (Slot Blot) oder nach der SDS-PAGE elektrophoretisch aus dem Gel heraus auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran NC, Schleicher & Schüll) transferiert. Für den Slot Blot wurde eine Membran zurechtgeschnitten, in eine Apparatur (Höfer) eingespannt und zwischen 5 und 100 ng eines nativen Proteins in einem Volumen von 200 µl (verdünnt in TBS) in die vorgesehene Öffnung pipettiert. Anschließend wurde für ca. eine Minute ein Vakuum angelegt, um die Proteine auf die Membran zu saugen. Der Nachweis der Proteine erfolgte analog zu elektrophoretisch transferierten Proteinen.

Im Unterschied zum Slot Blot lagen diese allerdings nach der SDS-PAGE in denaturierter Form vor. Die elektrophoretische Übertragung der Proteine erfolgte mit Hilfe einer Blot-Kammer (Höfer) und dem Transfer-Puffer bei 4°C entweder $\bar{u}N$ bei 100 mA oder innerhalb einer Stunde bei 400 mA.

Transfer-Puffer:

50 mM Borsäure, pH 8,5
10% Methanol

Nach dem Transfer wurde die Membran kurz mit Wasser gewaschen; anschließend wurden die Proteine mit 0,2% Ponceau S-Lösung (Serva) reversibel gefärbt, um die Markerproteine zu kennzeichnen und den Erfolg des Transfers zu überprüfen.

2.2.3.9 Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine

Vor der Immundetektion wurden freie Bindungsstellen auf der Membran durch 5% Milchpulver in TBS blockiert, um eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu vermeiden. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit einem Protein-spezifischen Primär-Antikörper in der unter 2.1.7 angegebenen Verdünnung in TBS/5% Milchpulver für 1 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit TBS/0,1% Tween 20 erfolgte die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper in der unter 2.1.7 angegebenen Verdünnung in TBS/5% Milchpulver für 1 h bei RT, der den Fc-Teil des ersten Antikörpers erkennt. Nach erneutem Waschen wurde das Signal durch Chemilumineszenz mittels einer ECL (*enhanced chemiluminescence*)-Lösung sichtbar gemacht. Dabei katalysiert die Peroxidase unter alkalischen Bedingungen und in Gegenwart von H_2O_2 die Oxidation von Luminol. Dieses befindet sich daraufhin in dem angeregten Zustand des 3-Aminophthalats, das bei Relaxation in den Grundzustand Strahlung abgibt, die auf einem Röntgenfilm (RX-Super, Fujifilm) detektiert werden kann.

Blockierlösung:

5% Milchpulver in TBS

ECL-Lösung:

100 mM Tris/HCl, pH 8,5

1,25 mM Luminol

225 nM Cumarin

0,03% Wasserstoffperoxid

2.2.4 Affinitätsreinigung der SMOC-1 und SMOC-2 Antiseren

Zu Beginn dieser Arbeit lagen in unserer Arbeitsgruppe ein polyklonales Antiserum gegen SMOC-1 aus Kaninchen und ein polyklonales Antiserum gegen SMOC-2 aus Meerschweinchen vor. Diese zeigten jedoch neben den spezifischen Signalen Kreuzreaktivitäten zu anderen Proteinen der BM-40 Familie. Um diese Kreuzreaktionen zu eliminieren, wurde SMOC-1 oder SMOC-2 Protein an je eine Säule aus Cyanbromid (CNBr)-Sephrose gekoppelt.

Die gewünschte Menge gefriergetrocknete CNBr-Sephrose wurde abgewogen (1 g ergibt 3,5 ml Gelvolumen) und in 1 mM HCl suspendiert. Nach mehrmaligem Wechseln der HCl-Lösung war die Matrix gequollen und aktiviert und konnte für die Kopplung von Proteinen verwendet werden. Da die Kopplung der Proteine an das Säulenmaterial über Aminogruppen erfolgte, wurden die rekombinanten Proteine, die in 2 M Harnstoff, 50 mM Tris-Puffer vorlagen, vor der Kopplung zweimal 6 h und einmal 12 h bei 4°C gegen Kopplungspuffer dialysiert.

Kopplungspuffer:0,1 M NaHCO₃, pH 8,3

0,5 M NaCl

Complete-Proteaseinhibitor, Roche:1 Tablette wurde in 2 ml H₂O aufgenommen und mit einer Verdünnung von 1:25 verwendetAcetat-Puffer:

0,1 M NaAcetat, pH 4,0

0,5 M NaCl

Tris-Puffer:

0,1 M Tris, pH 8,0

0,5 M NaCl

Die in HCl suspendierte Matrix wurde zusammen mit dem Protein über Nacht bei 4°C inkubiert. Für die Erstellung der SMOC-1 und SMOC-2 Antigen-Säulen wurden 500 µg rekombinantes Protein und 2,5 ml Gelmatrix verwendet. Am folgenden Tag wurde die Matrix abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Proteinkonzentration des Überstandes photometrisch bestimmt, um beurteilen zu können, ob die Kopplung des Proteins an die Matrix erfolgreich war. Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurde die Protein-gekoppelte Matrix für 2 h mit 0,1 M Tris, pH 8,0 inkubiert. Anschließend wurde das Material in eine Säule gepackt und die Säule alternierend mit zehn Säulenvolumen Acetat- bzw. Tris-Puffer gewaschen. Der Vorgang wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurde die Säule in TBS äquilibriert.

Reinigung des Antikörpers

Die zentrifugierten (1 h, 21000 x g, 4°C) und anschließend mit TBS (1:1) verdünnten SMOC-1 und SMOC-2 Seren wurden langsam über die Säulen gepumpt. Hierbei sollten die spezifischen Antikörper auf der Säule verbleiben. Diese wurde mit fünf Säulenvolumen TBS gewaschen. Die an der Säule angereicherten Antikörper wurden mit acht Fraktionen zu je 2 ml 3 M KSCN von der Säule eluiert. Um die Antikörper und das an die Säule gebundene Protein durch das KSCN nicht zu denaturieren, wurde die Säule sofort nach der Elution mit zehn Säulenvolumen TBS gespült und der eluierte Antikörper gegen TBS dialysiert. Dies geschah innerhalb von 30 min ab Beginn der Elution. Nach der Dialyse wurden von allen Antikörper-Fraktionen die Konzentrationen photometrisch bestimmt. Fraktionen mit einer Konzentration von mehr als 50 µg/ml wurden vereinigt und noch einmal vermessen. Es ergab sich eine Antikörperkonzentration von 262 µg/ml für den gereinigten SMOC-1 Antikörper aus Kaninchen und von 363 µg/ml für den gereinigten SMOC-2 Antikörper aus Meerschweinchen. Die Säulen wurden anschließend in TBS mit 0,01% Azid gelagert.

2.2.4.1 Titerbestimmung mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

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

200 µl in TBS gelöstes Antigen (5 µg/ml) wurden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Waschen mit PBS/0,02% Tween 20 wurden unspezifische Bindungsstellen für 1 h bei 37°C mit 200 µl Blockierungslösung abgesättigt. In dieser Lösung wurde auch der Antikörper verdünnt, von 1:1,625 bis 1:409600, und ebenfalls 1 h bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Sekundärantikörper-Inkubation mit Peroxidase-gekoppeltem Antikörper gegen Kaninchen IgG (SMOC-1) oder Meerschweinchen IgG (SMOC-2) in einer Verdünnung von 1:4000. Die Farbreaktion wurde nach Waschen mit 100 µl der Farbstofflösung eingeleitet und mit 100 µl 20%iger Schwefelsäure abgestoppt.

Blockierungslösung:

1% BSA in Wasser

Farbstofflösung:

18 ml Wasser

2 ml 1 M Natriumacetat/Zitronensäure-Puffer, pH 6

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

15 µl 3,5% H₂O₂

2.2.4.2 Antikörper-Inhibitions-Test

Um die Spezifität eines Antikörpers zu testen, wurde ein Blockierungstest durchgeführt. Dabei wurde ein konstantes Volumen des Antikörpers (50 µl) mit steigenden Mengen des entsprechenden Proteins, gegen das er generiert worden war, vorinkubiert. Im Fall von SMOC-2 waren dies 5 µl, 25 µl, 50 µl, 100 µl und 500 µl Protein. Das Gemisch wurde für

2 h bei RT rotierend inkubiert und dann in der entsprechenden Verdünnung im Western Blot oder in der Immunfluoreszenz nach den beschriebenen Protokollen eingesetzt.

2.2.5 Histologische Methoden

2.2.5.1 Präparation von Gefrierschnitten

Frisch präparierte Mausgewebe oder Embryonen wurden zunächst in *Tissue-Tek*[®]-Einbettlösung (Sakura) vorinkubiert, dann in frischer Lösung ausgerichtet, auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Schnitte wurden um -20°C in einem Kryostat angefertigt, wobei die Wahl der Temperatur vom jeweilig zu schneidenden Gewebe abhängig gemacht wurde. Es wurden sagittale Schnitte von Organen adulter Mäuse sowie von Mausembryonen (Embryonaltage 5,5; 6,5; 7,5; 8,5; 9,5; 10,5; 12,5; 14,5; 16,5) und neugeborenen Mäusen (Postnataltag 1,5) mit einer Schnittdicke von 7 µm angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und bei -20°C gelagert. Wegen der geringen Größe der Mausembryonen zum Beginn der Entwicklung wurden diese bis E 9,5 im Uterusgewebe eingebettet; ab E 10,5 wurde der Embryo vor der Einbettung aus dem Uterus präpariert.

2.2.5.2 Färbungen

Indirekte Immunfluoreszenz Mikroskopie

Zur Lokalisation von Proteinen in Zellen oder Geweben wurde die indirekte Immunfluoreszenz-Färbung angewendet, bei der ein spezifischer Antikörper mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörper visualisiert wird. Bei der Cy3-Markierung handelt es sich um das Fluorochrom Indocarbocyanin, das eine maximale Absorption bei 553 nm (grün) und Emission bei 575 nm (rot) aufweist.

Zellen wurden auf *Lab-Tek*[®] Permax Chamber Slides (Nunc) kultiviert und dann 10 min in 4% Paraformaldehyd/PBS bei RT fixiert. Anschließend wurden sie in 0,2% BSA in PBS gewaschen und 5 min permeabilisiert, bevor sie nochmals in 0,2% BSA-Lösung gewaschen wurden. Die Inkubation in Primärantikörper wurde für 1 h bei RT durchgeführt und nach Waschen erfolgte dann die Sekundärantikörper Inkubation für 1 h bei RT. Nach Waschen in PBS wurden die Objektträger eingedeckt.

Gewebe-Schnitte wurden für 30 min an der Luft getrocknet und mit 0,5% Paraformaldehyd/PBS für 10 min bei RT fixiert. Nach Waschen in PBS mit 0,1% Tween 20 wurden die Schnitte für 30 min mit 5% normalem Ziegenerum in PBS-Tween blockiert. Der affinitätsgereinigte Antikörper gegen SMOC-2 und das Antiserum gegen Laminin-1 wurden in Blocklösung verdünnt und auf den Schnitten bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach 3 x 5 min Waschen in Blockierlösung erfolgte die Detektion mit einem

Cy3-gekoppelten (Jackson ImmunoResearch) oder einem Alexa488-gekoppelten (Molecular Probes) Sekundärantikörper. Nach Waschen in PBS wurden die Schnitte mit Elvanol eingebettet und konnten abschließend unter einem Zeiss Axiophot Fluoreszenz-Mikroskop analysiert werden.

4% Paraformaldehyd:

400 ml ddH₂O auf 60°C erwärmen
20 g Paraformaldehyd einrühren
1 N NaOH zugeben, bis die Lösung wieder klar ist
50 ml 10 x PBS zugeben und filtrieren
pH-Wert mit HCl auf 7,4 einstellen
auf 500 ml mit ddH₂O auffüllen

Permeabilisierungslösung:

1% Triton-X-100
10 mM Glycin
0,1% BSA
in PBS

Elvanol:

12 g Mowiol 4-88 mit
30 ml ddH₂O versetzen, kurz rühren und 2 h bei RT stehen lassen
60 ml 0,2 M Tris/HCl, pH 8,5 zugeben und unter Rühren lösen
30 g Glycerin zugeben und 10 min bei 56°C rühren
15 min bei 5000 x g zentrifugieren und klaren Überstand mit
2 g DABCO versetzen (2,5% Endkonzentration)
Aliquots bei -20°C lagern

Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Bei der HE-Färbung handelt es sich um eine Übersichtsfärbung. Kerne und Knorpelsubstanz werden blau gefärbt, das Cytoplasma wird rötlich und die Muskulatur und Bindegewebe erscheinen abgestuft rosa. Die Kryoschnitte wurden je 5 min mit PBS und destilliertem Wasser gewaschen und dann 10 min mit 4%iger Paraformaldehydlösung fixiert. Danach wurden die Objektträger für 10 min in einer kommerziellen Hämatoxylin-Färbelösung inkubiert, mit Leitungswasser abgepült, kurz in 1%igem HCl-Alkohol (EtOH) differenziert, bis nur die Kerne blau-rot erschienen und unter fließendem Leitungswasser 10 min gebläut. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte 5-10 min in 0,5%iger Eosinlösung inkubiert und dann in 70%igem Alkohol differenziert, bis das Cytoplasma rosa und die Erythrozyten rot erschienen. Zuletzt wurden die Schnitte über eine steigende Alkoholreihe entwässert und mit DPX eingebettet.

Hämalaun:

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

Eosinlösung (0,5%):

1% Eosin
99% EtOH
mit destilliertem Wasser 1:1 verdünnen

steigende Alkoholreihe:

1 min 70% EtOH
1 min 96% EtOH
2 x 1 min Isopropanol
2 x 5 min Xylol

2.2.6 Zellkulturarbeiten

Alle in dieser Arbeit verwendeten Säugetierzellen wurden in Brutschränken bei 5-7% CO₂, 37°C und wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden aseptisch in Sterilbänken mit autoklavierten Glas- oder sterilen Kunststoffgeräten durchgeführt. Die Zellen wurden regelmäßig passagiert, die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer.

Auftauen von Zellen

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

Passagieren von Zellen

Um die Zellen vom Boden der Kulturschale zu lösen, wurden ihnen mit EDTA die dafür benötigten zweiwertigen Kationen entzogen und durch Zusatz von Trypsin die für die Anheftung verantwortlichen Rezeptoren zerstört. Da das im Medium vorhandene FCS Trypsininhibitoren enthält, wurde das alte Medium zunächst abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit EDTA/Trypsin-Lösung (0,02%/0,05%) versetzt und im Brutschrank solange inkubiert, bis sie sich vom Untergrund lösten. Durch Zugabe von frischem, serumhaltigem Medium wurde das Trypsin inaktiviert. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Pipette vereinzelt, Aliquots der Zellsuspension auf mehrere Platten verteilt und mit frischem Medium versetzt.

Zellkulturmedien

EBNA-293-Zellen: DMEM-F12 + 10% FCS + 10 U/100 µg/ml Penicillin/Streptomycin
+ 2 mM Glutamat + 350 µg/ml Geneticin G-418 sulphate

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

Transfizierte Zellen: entsprechendes Medium + 1 µg/ml Puromycin

Serumfreies Medium: entsprechendes Medium ohne FCS

Einfriermedium: entsprechendes Medium + 20% FCS + 10% DMSO

Ernte serumfreier Überstände

Zur Überprüfung der Expression einzelner Proteine im Zellkulturüberstand wurden die Zellen serumfrei gesetzt. Dazu wurden sie mit PBS gewaschen und 48 h mit serumfreiem Medium kultiviert. Die Überstände wurden abgenommen, mit Proteaseinhibitoren versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Einfrieren von Zellen

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

Transfektion von Zellen

Bei der Lipofektion wird in einen Vektor klonierte DNA mit einer Art Micelle umgeben und durch Verschmelzen von Micelle und Zellmembran in die Zelle befördert. Um eine

stabile Transfektion und damit eine effektive Proteinexpression über einen längeren Zeitraum zu gewährleisten, wurde ein Vektor mit eingebautem Resistenzgen verwendet und durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums Zellen selektioniert.

Die Transfektion von EBNA-293 oder HT1080 Zellen erfolgte jeweils mit dem pCEP-Pu-Vektor inklusive der SMOC-Konstrukte und wurde mit FuGene6 durchgeführt. In ein Eppendorfgefäß wurden dazu 94 µl serumfreies Medium vorgelegt und tropfenweise 6 µl FuGene6 hinzugefügt. Die Mischung wurde vorsichtig mit der Pipettenspitze umgerührt, 5 min bei RT inkubiert und dann in ein zweites Gefäß mit 2 µg der entsprechenden DNA getropft. Nach 15 min wurde das Gemisch zu einer mit frischem Medium versorgten und ca. 70% konfluenten Platte mit Zellen gegeben und für 24 h bei 37°C inkubiert. Danach begann die Selektion mit 1 µg/ml Puromycin.

2.2.7 Bindungs- und Inhibitionsstudien

2.2.7.1 Bindungsstudien

Zur Analyse möglicher Bindung von Zellen an ein Protein in Abhängigkeit von dessen Konzentration wurden mit destilliertem Wasser Verdünnungsreihen der zu untersuchenden Proteine in einem Konzentrationsbereich von 0-40 µg/ml angefertigt und damit die Vertiefungen von Zellkultur-kompatiblen 96-Well Platten (Costar) beschichtet. Dazu wurden 100 µl Proteinlösung (SMOC-1 oder SMOC-2 FTST oder EC-Fragmente) bei 4°C über Nacht inkubiert. Humanes Fibronectin (Chemicon) diente als Positivkontrolle. Unspezifische Bindungsstellen wurden am nächsten Tag für 4 h bei 4°C mit 100 µl einer 1%igen BSA-Lösung in Wasser blockiert. Dann wurden die jeweiligen Zellen trypsinisiert, mit serumhaltigem Medium resuspendiert, vereinzelt und ihre Anzahl bestimmt. Die Zellen wurden 5 min bei 1000 x g abzentrifugiert und nach Entfernen des Überstands in serumfreiem DMEM (Seromed-Biochrom) auf 3×10^5 /ml eingestellt. Nach Vortexen wurden je 100 µl der Zellsuspension pro Vertiefung in die Mikrotiter-Platten pipettiert und für 30 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Als Negativkontrolle wurden auch Vertiefungen ohne Proteinbeschichtung mit der Zellsuspension versetzt.

Ungebundene Zellen wurden danach durch Abschlagen des Mediums und Waschen mit PBS entfernt. Die Zellen wurden dann mit 1% Glutaraldehyd in PBS für 15 min fixiert, das Fixativ abgeschlagen und eine Färbung mit 100 µl einer 0,1%igen Kristallviolett-Lösung in H₂O bei RT für 25 min angeschlossen. Überschüssige Farbe wurde durch gründliches Waschen mit H₂O entfernt und der gebundene Farbstoff wurde durch Zugabe von 50 µl 0,2% Triton X-100 aus den Zellen gelöst. Die Quantifizierung erfolgte nach 1 h in einem ELISA-Reader (Labsystems) bei 540 nm und war proportional zur Anzahl der gefärbten Zellen. Die gemessenen Werte wurden dann um den Wert der unspezifischen

Zellbindung korrigiert und von jeder Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt und die Standardabweichung ermittelt.

2.2.7.2 Inhibitionsstudien

Um zu untersuchen, ob es sich bei der beobachteten Zelladhäsion um eine Integrin-vermittelte Bindung handelt, wurden zwei Ansätze zur Inhibition getestet. Dazu wurden 96-Well-Platten mit einer Proteinlösung einer einheitlichen Konzentration beschichtet, die mit 10 µg/ml dem Beginn der Sättigung entsprach. Der Versuch wurde dann wie unter 2.2.7.1 beschrieben durchgeführt mit der Abwandlung, dass die Zellen in Medium mit 5 mM EDTA auf die Mikrotiter-Platte gegeben wurden, um die Kationen-Abhängigkeit zu testen. Entsprechend konnte auch die RGD-Abhängigkeit durch Zugabe von 500 µg/ml eines RGD-Peptids (Sigma) oder die Integrin-Abhängigkeit durch Zugabe von 20 µg/ml inhibitorischer Antikörper gegen die jeweiligen Integrine getestet werden. Humanes Fibronectin, humanes Vitronectin und bovines Kollagen Typ I dienten als Positivkontrolle, wie auch Vertiefungen, die mit Zellen ohne irgendeinen Zusatz inkubiert wurden. Als Negativkontrolle dienten wiederum Vertiefungen, die nicht beschichtet worden waren. Auch hier wurden Mehrfachbestimmungen durchgeführt.

2.2.8 Zellausbreitung

Ein Hinweis darauf, über welche Rezeptoren Zellen an ein Protein binden, ist ihre Spreitung auf demselben. Da Zellen dabei Fokalkontakte ausbilden, in denen Integrin-Rezeptoren lokalisiert sind, konnte das gesuchte Integrin qualitativ bestimmt werden. Dazu wurden *Lab-Tek®* Chamber slides Permanox (Nunc) mit 10 µg/ml der EC-Fragmente von SMOC-1 oder SMOC-2 bei 4°C über Nacht beschichtet. Humanes Fibronectin diente als Positivkontrolle. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 0,1% BSA in PBS für 1 h bei RT blockiert. Danach wurden HaCaT-Zellen auf den Chamber slides mit einer Dichte von 4×10^5 /ml in serumfreiem DMEM ausplattiert und für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Slides wurden dann mit warmem PBS plus 1 mM MgCl₂ und 1 mM CaCl₂ gewaschen und die Zellen für 8 min in 2% Paraformaldehyd in PBS bei RT fixiert. Das Fixativ wurde entfernt und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden sie bei RT für 45 min in PBS mit 0,5% Saponin, 2% Pferdeserum und 2,5% Methanol permeabilisiert. Die Antikörper wurden ebenfalls in dieser Lösung verdünnt und für 1 h bei RT auf den Slides inkubiert. Es wurde eine Doppelfärbung für Vinculin (Sigma) und $\alpha\beta6$ -Integrin angefertigt, um eine Kolokalisation in Fokalkontakten zeigen zu können. Die Objektträger wurden mit Blocklösung gewaschen und die Detektion wurde abschließend mit einem Zweitantikörper-Gemisch aus Cy3-gekoppeltem Ziege anti-Maus IgG (Jackson ImmunoResearch) und Alexa488-gekoppeltem Ziege anti-Kaninchen IgG (Molecular

Probes) durchgeführt. Nach Waschen wurden die Proben in Elvanol eingebettet, so dass Aufnahmen der Zellen am Zeiss Axiophot Fluoreszenzmikroskop gemacht werden konnten.

2.2.9 Zellmigration

Um zu untersuchen, ob die Zellen nicht nur eine veränderte Haftung an bestimmte Proteine haben, sondern auch ein verändertes Migrationsverhalten aufweisen, wurden gleiche Mengen von HaCaT-Keratinocyten auf 24-well Platten (Costar) ausgesät, die zuvor mit 10 µg/ml SMOC-1 oder SMOC-2 EC beschichtet worden waren. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen angesetzt. Wenn die Zellen eine konfluente Schicht gebildet hatten, wurde diese mit einer Pipettenspitze senkrecht zerkratzt. Es wurden Fotos der Wundränder gemacht und diese nach 8, 24 und 48 h erneut an derselben Stelle aufgenommen. So konnte die Distanz, über die die Zellen in dieser Zeit gewandert waren, bestimmt werden. Sie wurde jeweils an fünf verschiedenen Stellen des Fotos gemessen und daraus der Mittelwert gebildet.

2.2.10 Zellproliferation

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob der Effekt, der bei der Zellwanderung auftrat, tatsächlich auf eine erhöhte Migrationsgeschwindigkeit oder nur auf Proliferation zurückzuführen war. Dazu wurde erneut eine Mikrotiterplatte mit 10 µg/ml SMOC-1 oder SMOC-2 EC beschichtet. Humanes Fibronectin diente als Positivkontrolle. Nach dem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden gleiche Mengen an HaCaT-Keratinocyten ausgesät und für 20 h bzw. 44 h bei 37°C kultiviert. Nach den angegebenen Zeiten wurde eine 0,025 mM PMS-XTT Lösung zugegeben. Dabei handelt es sich um 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) als zu metabolisierende Substanz. XTT wird von lebenden Zellen zu Formazan umgesetzt, welches in Wasser löslich ist und photometrisch nachgewiesen werden kann. Um eine effektivere Reduktion von XTT durch die Zellen zu erzielen, wurde Phenazine methosulfate (PMS) zugegeben. Das Gemisch verblieb für 4 h bei 37°C auf den Zellen und wurde dann abgenommen. So konnte nach 24 h bzw. 48 h die Extinktion des gelösten Formazans bei 450 nm in einem ELISA-Reader bestimmt werden. Jeder Wert wurde dreifach bestimmt.

2.2.11 Wundheilung

Um die Wundheilung auch am Tier direkt verfolgen zu können, wurden C57Bl/6 Mäuse intraperitoneal mit 500 µl Ketavet (Pharmacia & Upjohn) und 250 µl Rompun 2% (Bayer) in 4,5 ml 0,9% NaCl narkotisiert. Ihre Augen wurden mit Bepanthen (Roche) versorgt und die dorsale Haut rasiert und enthaart. Nach Desinfektion wurde die Rückenmitte lokalisiert, die Rückenhaut zu einer Falte nach oben gezogen und die Maus auf die Seite gelegt. Die Hautfalte wurde daraufhin fixiert und mit einer Stanze wurde ein Loch von 4 mm Durchmesser durch beide Hautschichten gestanzt. Vier dieser Stanzbiopsien konnten so als Wunden auf der Rückenseite gesetzt werden. Die Normalhaut wurde gesammelt und danach wurden Mäuse nach 4 h, 2, 5, 7, 11 und 14 Tagen durch CO₂ Inhalation getötet, um die Wunden entnehmen zu können. Dazu wurden die Wundstellen und 5 mm des umliegenden Gewebes in *Tissue Tek*[®] eingebettet, 7 µm dicke Kryoschnitte angefertigt und bei -20°C weggefroren (Die hier beschriebene Methode wurde durchgeführt von Dr. Paola Zigrino, Institut für Dermatologie, Universität zu Köln). Die Schnitte wurden später wie unter 2.2.5.2 beschrieben gefärbt.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung von SMOC-Konstrukten

In vorherigen Studien waren humanes SMOC-1 und murines SMOC-2 bereits in ihrer Domänenorganisation beschrieben, kloniert und rekombinant exprimiert worden (Vannahme et al., 2002; Vannahme et al., 2003). Zu Beginn dieser Arbeit sollte zunächst SMOC-2 Kompletprotein aus zwei transfizierten Zelllinien (HT1080 und EBNA-293) mit dem Ziel hergestellt und aufgereinigt werden, Protein zur Antikörper-Herstellung und für funktionelle Studien zu gewinnen. Dies stellte sich allerdings als problematisch dar, wobei folgende Schwierigkeiten auftraten: In den Überständen beider Zelllinien lag das Protein degradiert vor und HT1080-Zellen produzierten zudem nur geringe Mengen SMOC-2. Zwar konnte das mit einer N-terminalen Modifikation, einem His-Hexapeptid, gefolgt von einer Myc-Antikörperbindungsstelle und einer Schnittstelle für die Protease Faktor X (Wuttke et al., 2001) versehene Protein über Affinitätschromatographie aufkonzentriert werden, doch lag jeweils eine intakte und eine Abbaubande vor. Die Trennung dieser Banden mittels Ionenaustauschchromatographie gelang aufgrund der geringen Ausgangsmengen nicht.

Um einzugrenzen, ob Teile des Proteins selbst die Aufreinigung erschwerten, wurden neben den kompletten Proteinen zum einen unterschiedliche Proteinfragmente kloniert, zum anderen verschiedene Modifikationen an *Tags* benutzt, um Alternativen bei der Aufreinigung zu haben. Zudem war es möglich, dass der große *His-Myc-Tag* die Konformation der Proteine beeinflusste und damit die Zugänglichkeit für Proteasen und die Löslichkeit der Proteine ungünstig verschob. Daher sollten kürzere *Tags* verwendet werden. Um außerdem eine bessere Vergleichbarkeit von SMOC-1 und SMOC-2 zu erreichen, wurden beide Proteine in der gleichen Spezies kloniert, also die kompletten Maus-cDNAs (Full Length). Bei den Proteinfragmenten handelte es sich um Konstrukte ohne die EC-Domäne (FTST, Follistatin + Thyroglobulin + SMOC + Thyroglobulin), ohne die Follistatin-Domäne (TSTE, Thyroglobulin + SMOC + Thyroglobulin + EC), ohne EC- und Follistatin-Domäne (TST, Thyroglobulin + SMOC + Thyroglobulin) sowie die EC-Domäne allein (*Abb. 3.1*).

Die Konstrukte wurden sowohl in einen Vektor mit N-terminalem Octahistidin-Peptid (*His-Tag*) als auch in einen Vektor mit C-terminalem Streptavidin-Peptid (*Strep-Tag*) eingebaut. Dafür mussten sie jeweils ohne und mit Stop-Codon kloniert werden. Des Weiteren wurden die Konstrukte mit Restriktionsschnittstellen versehen, um sie aus dem Klonierungsvektor ausschneiden und gerichtet in den Expressionsvektor integrieren zu

können. Als Expressionsvektor diente der mit einem BM-40 Signalpeptid versehene pCEP-Pu Vektor (Kohfeldt et al., 1997), das ermöglichte, dass transfizierte Zellen das Protein effizient ins Medium sekretierten (Abb. 3.2).

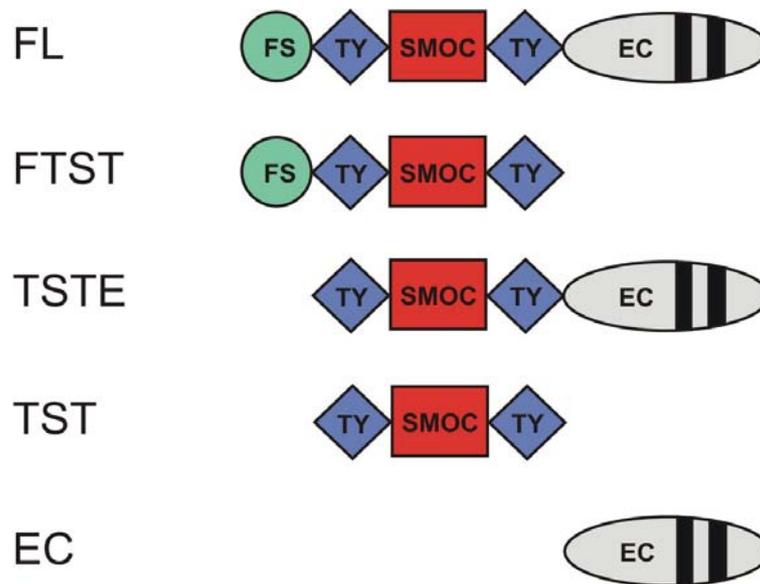


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der klonierten Proteinfragmente.

Die Konstrukte stellen für SMOC-1 und SMOC-2 das komplette Protein FL (full length) oder Teile davon dar. FTST, TSTE, TST und EC deuten auf die enthaltenen Domänen hin. FS steht für Follistatin, TY für Thyroglobulin, SMOC für die spezifische und EC für die extrazelluläre Calcium-bindende Domäne. Die schwarzen Balken bezeichnen die EF-Hand-Motive.

Die verschiedenen Konstrukte wurden über PCR amplifiziert und in den pDrive-Klonierungsvektor ligiert. Bakterien wurden mit dem Plasmid transformiert, positive Klone vermehrt und die DNA über Sequenzierung auf Vollständigkeit und Mutationen untersucht. War das Fragment fehlerfrei, wurde über die Restriktionsschnittstellen ein Doppelverdau NheI-NotI durchgeführt und das Konstrukt in den ebenso geschnittenen Expressionsvektor pCEP-Pu umklont. Vom Vektor aus wurde dann nochmals in das Konstrukt einsequenziert, um Fehler an den Klonierungsstellen auszuschließen.

Die so erhaltenen Expressionssysteme wurden dann für SMOC-1 in HT1080-Zellen, für SMOC-2 in EBNA-293 Zellen transfiziert. Für SMOC-1 war bereits bekannt, dass die Expression in EBNA-293 Zellen zu einem proteolytisch degradierten Protein führte, weshalb HT1080-Zellen verwendet wurden. Im Fall von SMOC-2 war in beiden Zelllinien eine Abbaubande festgestellt worden. Da jedoch die Ausbeute und damit auch die Menge an intaktem Protein in EBNA-293 Zellen höher war, wurden diese transfiziert. Danach wurden beide Zelllinien einer Selektion mit Puromycin unterzogen, da das Plasmid pCEP-Pu eine Puromycin Resistenz trägt und so nur die Zellen überleben konnten, die die Konstrukte erfolgreich aufgenommen hatten.

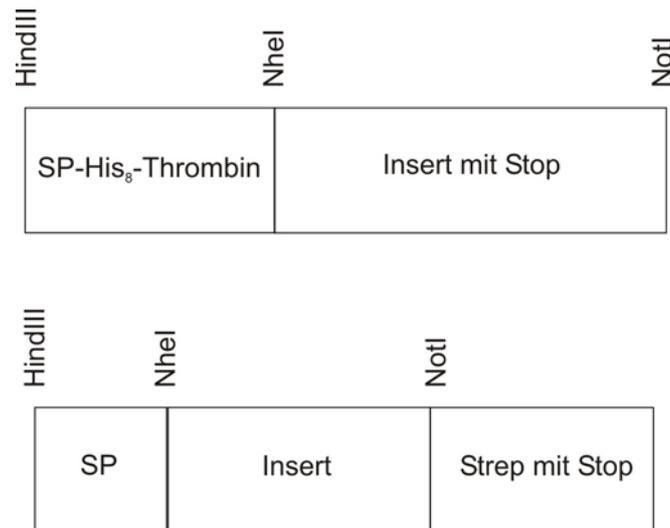


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der eingesetzten Expressionsvektoren.

Der kommerziell erhältliche pCEP-4-Vektor (Invitrogen) wurde mit einem BM-40 Signalpeptid (SP) für die Sekretion der Proteine (Kohfeldt et al., 1997) modifiziert. Für die Aufreinigung trägt der Vektor entweder einen N-terminalen Octahistidin-Tag mit anschließender Thrombinschnittstelle (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Manuel Koch, Institut für Dermatologie, Universität zu Köln) oder C-terminal einen Streptavidin-Tag (zur Verfügung gestellt von Dr. Neil Smyth, University of Southampton).

3.2 Rekombinante Expression und Aufreinigung der SMOC-Konstrukte

Mit den neuen SMOC-Konstrukten sollte Protein in größeren Mengen hergestellt werden, wozu die transfizierten Zellen vermehrt, in serumfreiem Zellkulturmedium gehalten und die Überstände gesammelt wurden. Die Aufreinigung des kompletten SMOC-2 Proteins schlug sowohl über den C-terminalen *Strep-Tag* als auch über den N-terminalem *His-Tag* fehl. Die Ausbeute im Überstand war gering, was darauf zurückzuführen war, dass das Protein in der extrazellulären Matrix der Zellen zurückgehalten wurde (*nicht gezeigte Ergebnisse*). Eine Aufreinigung des Proteins in Gegenwart von 2 M Harnstoff verbesserte die Ausbeute, obwohl immer noch Abbau vonstatten ging.

Die Abbaubande sollte über Ionenaustauschchromatographie abgetrennt werden, wobei alle Ansätze ohne Erfolg blieben. Es wurden eine Resource S Säule (ein starker Kationentauscher) in 2 M Harnstoff, 20 mM Natriumacetat, pH 4,8, eine SP-Sepharose Fast Flow im neutralen pH-Bereich, eine SP-Sepharose Fast Flow im sauren pH-Bereich und eine DEAE-Sepharose Fast Flow im alkalischen pH-Bereich getestet.

Da die Möglichkeit bestand, dass nur Teile des Proteins die Schwierigkeiten bei der Aufreinigung verursachten, sollte eine Aufreinigungsstrategie mit den zuvor schon genannten kürzeren Fragmenten etabliert werden. TSTE- und EC-Fragmente zeigten

ähnliche Probleme bei der Aufreinigung wie die kompletten Proteine. Daher schien die EC-Domäne für die Bindung an die Matrix verantwortlich zu sein. Die FTST- und TST-Proteinfragmente wurden besser produziert und waren auch weniger vom Problem der Degradation betroffen. Dennoch war die Aufreinigung mittels *Strep-Tag* unbefriedigend.

Aus diesem Grund wurden auch zwei Liter des SMOC-2 FTST Proteins gesammelt, das N-terminal *His-getaggt* war und über eine Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriacetic acid) oder Talon-Säule (Cobalt-Matrix) aufgereinigt. Der Überstand wurde auf 2 M Harnstoff eingestellt, mit 50 mM Tris auf pH 8 gepuffert und auf die Säule geladen. Die vielen anderen im Überstand enthaltenen Proteine, die nicht an die Säule binden, wurden mit einem Puffer mit 2 M Harnstoff und 50 mM Tris, pH 8 gewaschen, bevor derselbe Puffer mit 250 mM Imidazol in einem linearen Gradienten von 0-100% auf die Säule gepumpt wurde. Das Eluat wurde in 70 Fraktionen zu je einem ml gesammelt und diese dann auf einem Gel mit anschließender Detektion mittels *His-Tag* Antikörper getestet (*Abb. 3.3*).

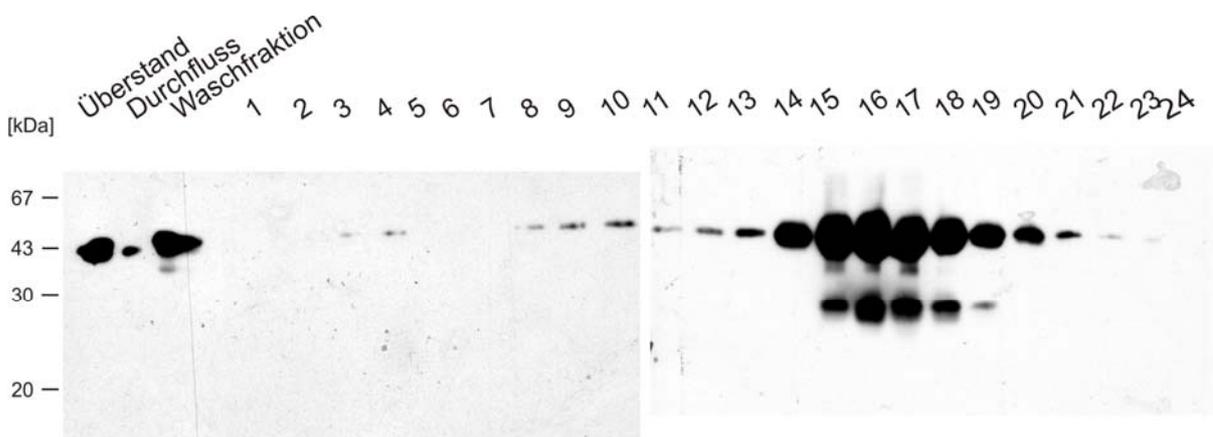


Abb. 3.3: Aufreinigung von SMOC-2 FTST-His über eine Ni-NTA-Säule.

Aliquots des Überstands, des Durchflusses und der Waschschrte wurden gesammelt, TCA-gefällt und mit Aliquots der einzelnen Elutionsfraktionen auf einem 12,5%-igen SDS-Polyacrylamid-Gel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran wurde das Protein mit einem spezifischen Antikörper gegen den *His-Tag* nachgewiesen.

Hier war nun deutlich zu erkennen, dass ein Aufreinigungseffekt erzielt worden war. Es gab Fraktionen mit SMOC-2 FTST in höherer Konzentration, auch wenn dort dann nicht nur intaktes Protein vorlag, sondern auch wieder Abbau auftrat. Dieser schien C-terminal vonstatten zu gehen, da der N-terminale *His-Tag* noch vorhanden war, über den die Detektion vorgenommen wurde. Neben diesem Problem wurden anhand eines Coomassiegefärbten Gels auch noch Verunreinigungen mit unbekanntem Proteinen deutlich. Daher wurde eine zusätzliche Aufreinigung angestrebt, zu der hier nun ein anderer Ansatz als der bisher verwendete Ionenaustausch gewählt wurde.

Da eine Thrombin-Schnittstelle hinter dem N-terminalen *His-Tag* im Vektor liegt, konnten zunächst die SMOC-2 haltigen Fraktionen vereinigt und über Nacht mit Thrombin inkubiert werden. Da die Aktivität dieses Enzyms in einem Puffer mit Calcium höher ist, war die Verwendung eines phosphatfreien Puffers notwendig, um zu verhindern, dass bei Zugabe von Calcium das entsprechende Phosphat ausfiel. Nachdem der *His-Tag* abgespalten worden war, erfolgte Dialyse gegen 2 M Harnstoff und 50 mM Tris, pH 8 und ein erneuter Säulenlauf über Ni-NTA. Da das SMOC-2 FTST ohne *Tag* nicht mehr an die Säule binden konnte, jegliche Proteine, die zuvor noch als Verunreinigung vorlagen, aber wieder unspezifisch an der Matrix zurückgehalten wurden, konnte ein höherer Reinheitsgrad erzielt werden. Das gewünschte Protein befand sich nun im Durchfluss der Säule und konnte über eine SDS-PAGE und Coomassie-Färbung nachgewiesen werden.

Die Abbaubande der Fraktionen 15-19 (*Abb. 3.3*) war nach diesem weiteren Reinigungsschritt ebenfalls verschwunden. Das rekombinante Protein konnte also zur Homogenität gereinigt werden und zeigt unter reduzierenden Bedingungen eine Bande bei 43 kDa (*Abb. 3.4*). Die Ausbeute lag bei 400 µg Protein pro Liter Kulturüberstand.

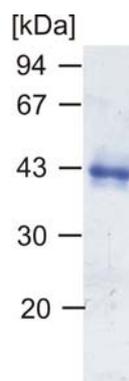


Abb. 3.4: Gereinigtes SMOC-2 FTST.

Nachdem der *His-Tag* über Thrombin-Verdau abgespalten war, wurde die Lösung erneut über eine Ni-NTA-Säule gegeben. Ein Aliquot des Durchflusses dieser Säule wurde auf einem 12,5%-igen SDS-Polyacrylamid-Gel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Es ist eine Bande bei 43 kDa und somit gereinigte SMOC-2 FTST zu erkennen.

Die Proteinfragmente, die von SMOC-1 und SMOC-2 im Weiteren für funktionelle Studien oder zur Herstellung von Antikörpern verwendet wurden, sollten die kompletten Proteine repräsentieren, weshalb FTST- und EC-Fragmente exprimiert wurden (*Abb. 3.5*). Sie konnten aus dem Überstand aufgereinigt werden, wobei die EC-Domänen deutlich niedrigere Ausbeuten erbrachten, sich bei Einfrieren und Lagerung schnell abbauten und für alle folgenden Experimente immer frisch hergestellt werden mußten. Doch konnten die Fragmente einzeln oder in Kombination eingesetzt werden, um bestimmte Eigenschaften direkt bestimmten Domänen zuordnen zu können.

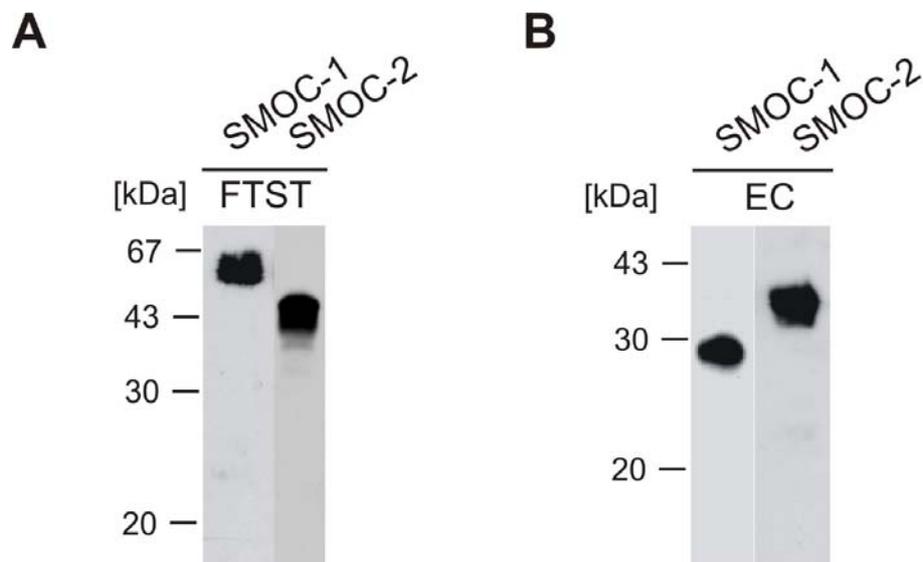


Abb. 3.5: Klonierung und Expression verschiedener SMOC-Konstrukte.

Es wurden für SMOC-1 und SMOC-2 FTST- (A) und EC-Konstrukte (B) kloniert, die jeweils in einen Vektor mit N-terminalem *His-Tag* ligiert wurden. Die SMOC-1 Konstrukte wurden in HT1080-Zellen, die SMOC-2 Konstrukte in EBNA-293 Zellen exprimiert. Aus den serumfreien Überständen wurde jeweils 1ml mit TCA gefällt und auf einem 12,5%-igen SDS-Polyacrylamid-Gel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran wurden die Proteine jeweils über einen Antikörper gegen den *His-Tag* nachgewiesen.

3.3 Aufreinigung und Charakterisierung der Antikörper

Mit den hergestellten Proteinen war die Planung weiterer Experimente möglich. So konnte z.B. ein Meerschweinchen-Antiserum, das aus einer früheren Immunisierung gegen SMOC-2 vorhanden war, nun einer Affinitätsreinigung unterzogen werden.

3.3.1 SMOC-2 Antikörper aus Meerschweinchen

Zur Affinitätsreinigung wurde das Antiserum über eine Cyanbromid-Sepharose-Säule gepumpt, an die SMOC-2 FTST gekoppelt worden war. Nach verschiedenen Waschschritten wurde der Antikörper mit 3 M Kaliumthiocyanat eluiert und auf Spezifität getestet. Dies geschah in Form eines Dot Blots für das native Protein und mittels Western Blot für die denaturierte Form. Die Spezifität wurde durch ein Inhibitionsexperiment bestimmt. Dazu wurde eine konstante Menge des Antikörpers mit unterschiedlichen Mengen an SMOC-2 Protein versetzt. Danach erfolgte mit diesen vorinkubierten Antikörpern die Detektion auf dem Western Blot, auf den ebenfalls unterschiedliche Mengen an SMOC-2 Protein aufgetragen worden waren.

Die Reaktivität des Antikörpers konnte durch Zugabe des Antigens komplett blockiert werden (*Abb. 3.6 A*). Bei Zugabe der zehnfachen Menge des Antigens zum Antikörper konnte SMOC-2 nicht mehr nachgewiesen werden, da alle Bindungsstellen bereits gesättigt waren. Wurde nur die doppelte Menge Antigen zugegeben, konnte das Protein auf dem Blot je nach Auftragsmenge detektiert werden. So war die Inhibition zu stark, um geringere Mengen (10 ng) nachzuweisen, doch bei entsprechend höherer Menge des Proteins auf dem Blot (40 ng) konnte der Antikörper dieses wieder detektieren. Es wurde also eindeutig gezeigt, dass der SMOC-2 Antikörper nach der Affinitätsreinigung SMOC-2 spezifisch nachweisen konnte.

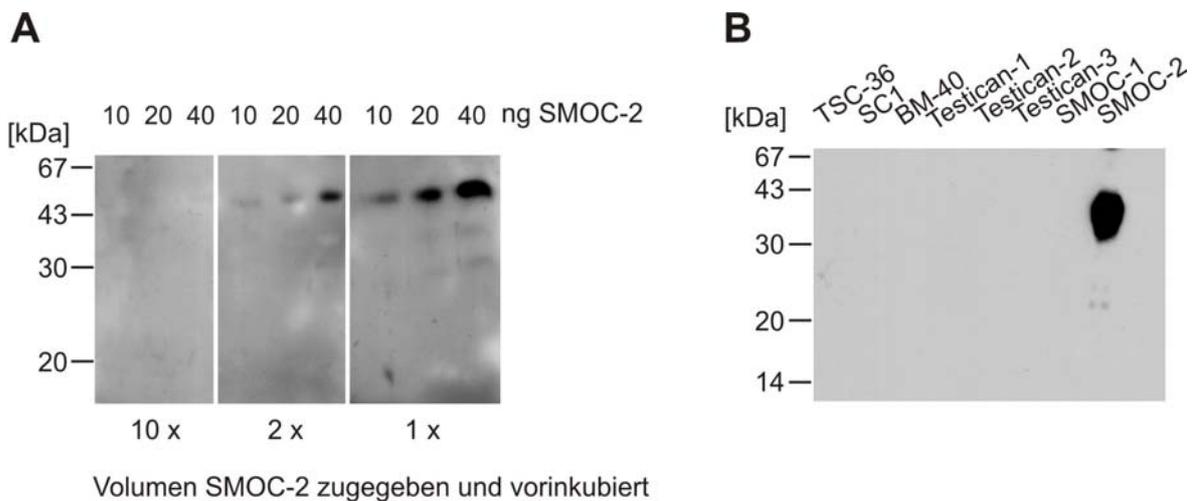


Abb. 3.6: Spezifitätstest für den Antikörper gegen SMOC-2 aus Meerschweinchen.

Es wurden verschiedene Mengen (10, 20 und 40 ng) SMOC-2 FTST auf einem 12,5%-igen SDS-Polyacrylamid-Gel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran wurde mit einem Antikörper gegen SMOC-2 inkubiert, der zuvor mit SMOC-2 Protein vorinkubiert worden war. Dabei wurde ein definiertes Antikörper-Volumen mit der zehnfachen, doppelten oder gleichen Menge Protein zwei Stunden bei RT inkubiert (A). Gleiche Mengen Proteins der verschiedenen BM-40 Familienmitglieder wurden auf einem 12,5%-igen SDS-Polyacrylamid-Gel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran wurde der affinitätsgereinigte Antikörper gegen SMOC-2 aus Meerschweinchen auf Kreuzreaktivität getestet (B).

Ob allerdings Kreuzreaktivitäten mit anderen BM-40 Familienmitgliedern auszuschließen waren, konnte mit diesem Experiment nicht festgestellt werden. Deshalb wurde ein weiterer Western Blot angefertigt, auf den neben SMOC-2 sämtliche weitere Proteine der BM-40 Familie aufgetragen wurden (TSC-36, SC1, BM-40, die Testicane und SMOC-1). Der Antikörper konnte nur SMOC-2 nachweisen (*Abb. 3.6 B*), was deutlich macht, dass durch die Affinitätsreinigung auch alle Kreuzreaktivitäten beseitigt werden konnten. So war dieser Antikörper zwar im Vergleich zu anderen polyklonalen Antikörpern immer noch von niedrigem Titer, jedoch der einzig sinnvoll einsetzbare. Zudem war er durch die angeführten Daten klar charakterisiert und konnte nun für alle folgenden Experimente verwendet werden.

3.4 Lokalisation von SMOC-2

Da über das Vorkommen von SMOC-2 bisher nur eine Gewebeverteilung auf mRNA-Ebene bekannt war, konnte mit Hilfe des beschriebenen Antikörpers nun auch die Expression des Proteins dargestellt werden. Dazu wurden Gefrierschnitte adulter Mausgewebe gefärbt, wobei ein besonderes Augenmerk den Geweben galt, für die bereits SMOC-2 Transkripte nachgewiesen worden waren, nämlich Herz, Thymus, Milz, Lunge, Niere und Ovar (Vannahme et al., 2003).

3.4.1 SMOC-2 im adulten Gewebe

SMOC-2 war in den genannten Organen nachweisbar (*Abb. 3.7*), doch variierte die Art der Färbung von Gewebe zu Gewebe sehr. So war im Herz (*Abb. 3.7 A*) eine eher diffuse, aber spezifische Verteilung von SMOC-2 festzustellen, wie die komplett ungefärbte Negativkontrolle bestätigte. In den lymphatischen Organen Thymus und Milz war ebenfalls eine schwache Gesamtfärbung festzustellen, und auch hier wiesen die Sekundär-Antikörper-Kontrollen keinerlei Färbung auf, so dass die Spezifität gezeigt war. Es konnten zudem auch eindeutige Strukturen ausgemacht werden, an denen SMOC-2 detektiert wurde.

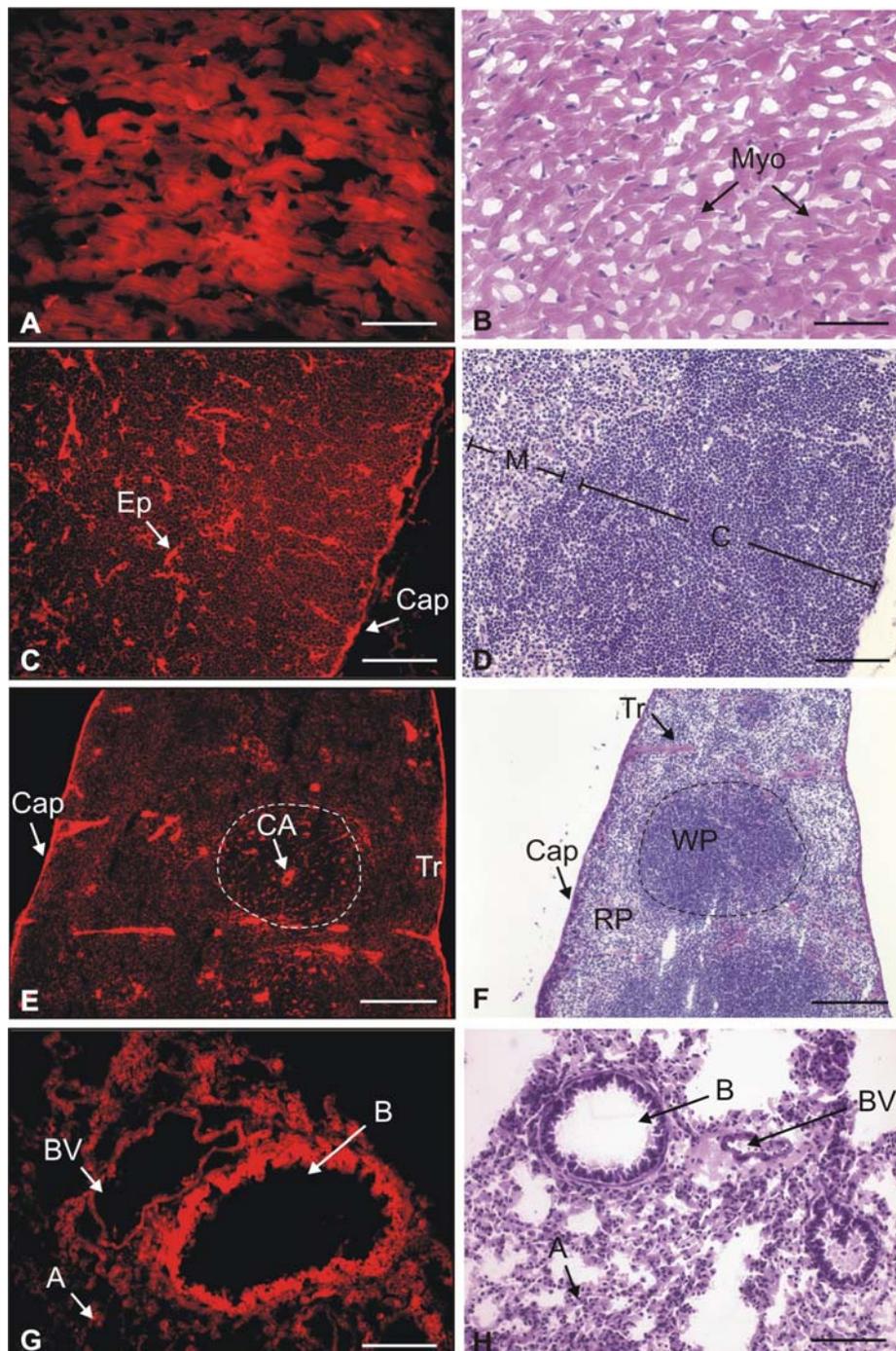
Im Thymus (*Abb. 3.7 C*) waren keine Unterschiede zwischen Cortex und Medulla zu erkennen, die Epithelioretikularzellen aber, epithelialen Ursprungs, recht groß und mit Fortsätzen, waren eindeutig gefärbt, wie auch die Kapsel. Dieses dichte Bindegewebe war auch in der Milz (*Abb. 3.7 E*) positiv für SMOC-2. Zusätzlich waren hier Endothelien der Zentralarterie und Trabekel nachweisbar. Im Lungengewebe (*Abb. 3.7 G*) waren die angefärbten Bronchiolen deutlich zu erkennen. Dies sind Flimmerepithelien auf einer dicken Basalmembran mit elastischen Fasern und glatter Muskulatur. Teilweise sind ihre Wände bereits mit Alveolen besetzt, einem Epithel, an dem der Gasaustausch stattfindet.

Es war auffällig, dass häufig Grenzflächen wie die Kapsel in Thymus und Milz oder Epithelien, die Außen-Innenraum-Übergänge trennen, wie die Bronchiolen, SMOC-2 exprimierten. Das galt auch für weitere Gewebe. So war in der Niere (*Abb. 3.7 I, K*) eine spezifische Färbung in der äußeren Medulla zu erkennen und bei höherer Vergrößerung konnten sogar einzelne Nierengefäße und die Bindegewebszellen der Kapillarschleifen in den Glomeruli dargestellt werden. Hier war auch wieder das Abschlussgewebe, die Kapsel, SMOC-2 positiv.

Die stärkste Expression auf mRNA-Ebene fand sich im Ovar, welches auch deutlich SMOC-2 Protein exprimierte (*Abb. 3.7 M*). Hier waren vor allem die Grenzen der Follikel – und Thekazellen bzw. das Bindegewebe zwischen den Follikeln zu erkennen.

Man konnte also insgesamt von einer breiten SMOC-2 Verteilung sprechen, die auch keineswegs auf die Basalmembranen beschränkt war.

Da die Färbung allerdings an vielen Stellen diffus erschien, wurde auch auf der Ebene der Immunfluoreszenzfärbung ein Spezifitätstest für den SMOC-2 Antikörper aus Meerschweinchen angeschlossen. Es wurde eine definierte Menge an Antikörper mit unterschiedlichen Mengen SMOC-2 Protein vorinkubiert, um die spezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Danach wurde die gewohnte Verdünnung angesetzt und eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt.



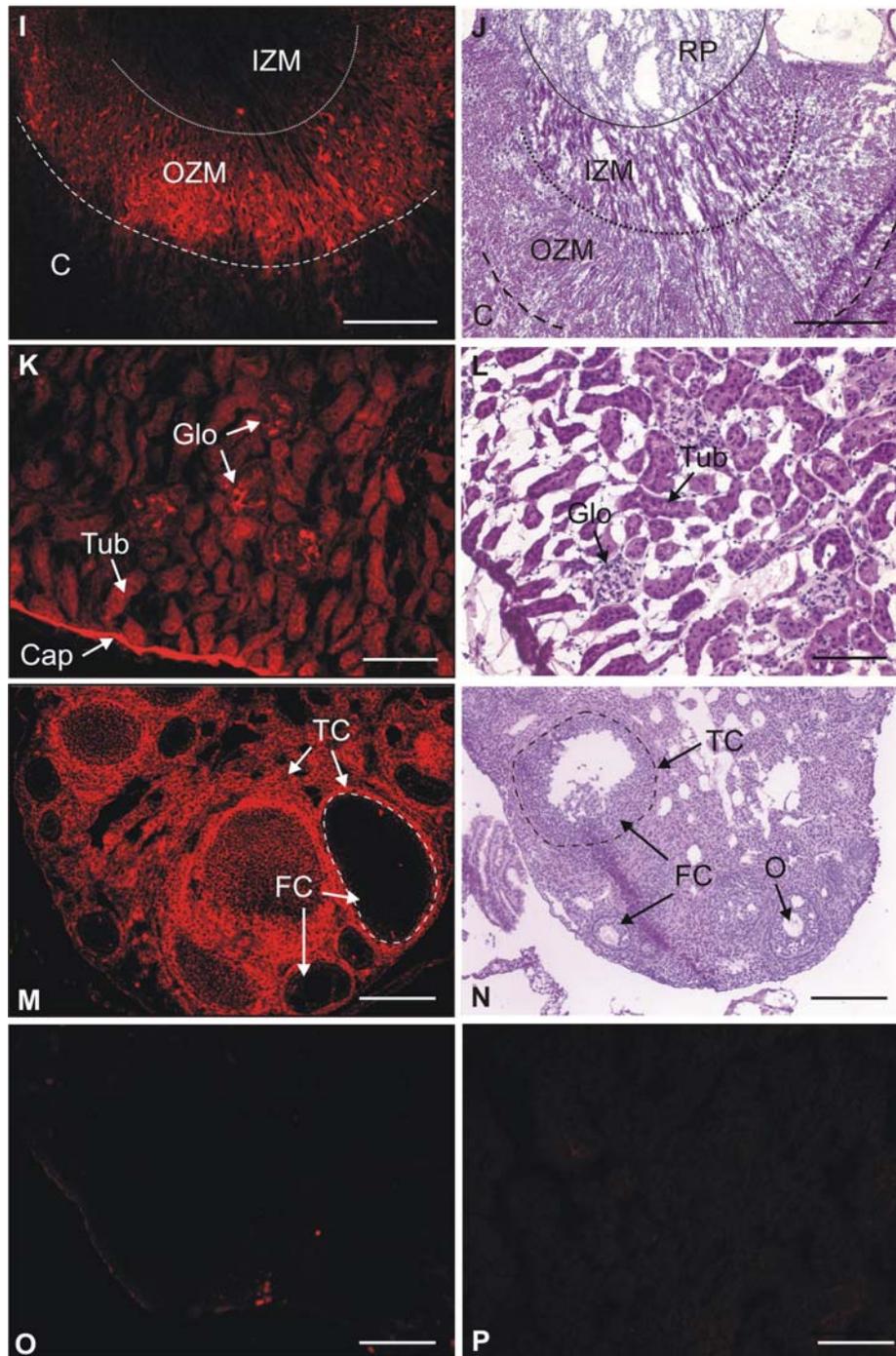


Abb. 3.7: Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie muriner Gewebe mit einem affinitätsgereinigten SMOC-2 Antikörper.

Die Verteilung von SMOC-2 (A, C, E, G, I, K, M, O, P) ist für Herz (A), Thymus (C), Milz (E), Lunge (G), für Niere (I, K) und Ovar (M) dargestellt. Eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung der entsprechenden Gewebe wird parallel gezeigt (B, D, F, H, J, L, N). Die Skalierungsbalken entsprechen 50 μm in A, B und G, 100 μm in C, D, H, K, L und P, 200 μm in E, F, M, N und O und 500 μm in I und J. Die gestrichelte Linie in E und F bezeichnet die Grenze zwischen roter und weißer Pulpa. A, Alveoli; B, Bronchiole; BV, Blutgefäß; C, Cortex; CA, Zentralarterie; Cap, Kapsel; Ep, Epithelioretikularzelle; M, Mark; Myo, Myofibrillen; RP, rote Pulpa; Tr, Trabekel; WP, weiße Pulpa. Die gestrichelte Linie in I und J zeigt die Grenze zwischen Cortex und Medulla auf, in M und N zwischen Follikel- und Thekazellen. Die gepunktete Linie in J trennt Medulla und Nierenpapille. IZM, Innenzone des Marks; OZM, Außenzone des Marks; C, Cortex; RP, Nierenpapille; Glo, Glomerulus; Tub, Gefäße; Cap, Kapsel; TC, Thekazellen; FC, Follikelzelle; O, Oozyte. In O und P ist die Inhibition des affinitätsgereinigten SMOC-2 Antikörpers auf Ovar (O) und Niere (P) nach Vorinkubation im Verhältnis 2:1 (O) oder 1:1 (P) mit rekombinantem Protein gezeigt.

Für Ovar und Niere konnte eindeutig die Spezifität des Antikörpers nachgewiesen werden (*Abb. 3.7 O, P*), da die Färbung nahezu vollständig unterbunden war. Lediglich im Randbereich des Ovars lag eine leichte unspezifische Reaktion vor, die jedoch zu vernachlässigen ist. Damit war die Expression von SMOC-2 auf den genannten Geweben durchaus als realistisch einzuschätzen und sollte nun auch auf der Ebene der Embryonalentwicklung fortgeführt werden, um im weiteren Verlauf dann auch die Frage nach der Funktion, die das Protein an den entsprechenden Stellen übernimmt, klären zu können.

3.4.2 SMOC-2 in der Embryonalentwicklung

Nachdem gezeigt worden war, dass SMOC-2 in der adulten Maus vorkommt und in definierten Organen exprimiert wird, stellte sich die Frage, ob und wann es in der Entwicklung eine Rolle spielte. Aus diesem Grund wurden Embryonen verschiedener Altersstufen präpariert und davon Gefrierschnitte angefertigt. Zur besseren Übersichtlichkeit wird auch hier jeweils eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung gezeigt und die spezifische SMOC-2 Immunfluoreszenz daneben gestellt. Um direkt das Auftreten von SMOC-2 in der Basalmembran feststellen zu können, wurde eine Parallelfärbung mit einem Antikörper gegen Laminin-1 durchgeführt, welches als Marker derselben gilt. Die Negativkontrolle wird beispielhaft gezeigt, um die Spezifität der Antikörper zu bestätigen.

3.4.2.1 SMOC-2 in Mausembryonen von Tag 5,5 bis 6,5

Beginnend mit der Gastrulation und damit der Embryonalentwicklung am Tag 5,5 kann das embryonale Gewebe, das noch im Uterus liegt, dargestellt werden (*Abb. 3.8 A*). Auch der Dottersack nimmt einen großen Teil ein. Dennoch ist bereits die Reichert's Membran nachweisbar (*Abb. 3.8 C*). Diese ist nur bei Nagetieren zu finden und wird zwischen dem embryonalen Entoderm und der Trophoblastenschicht gebildet. SMOC-2 war zu diesem Zeitpunkt noch nicht detektierbar, wurde also zu diesen frühen Stadien nicht exprimiert. Die Färbung beschränkte sich auf das umliegende maternale Gewebe.

Auch für Tag 6,5 bot sich ein ähnliches Bild (*Abb. 3.8 F*). Die Reichert's Membran zeigte eine deutliche Färbung für Laminin-1 (*Abb. 3.8 G*), doch für SMOC-2 war im Bereich des Embryos keinerlei Signal zu erkennen. Das maternale Gewebe zeigte allerdings eine diffuse SMOC-2 Verteilung.

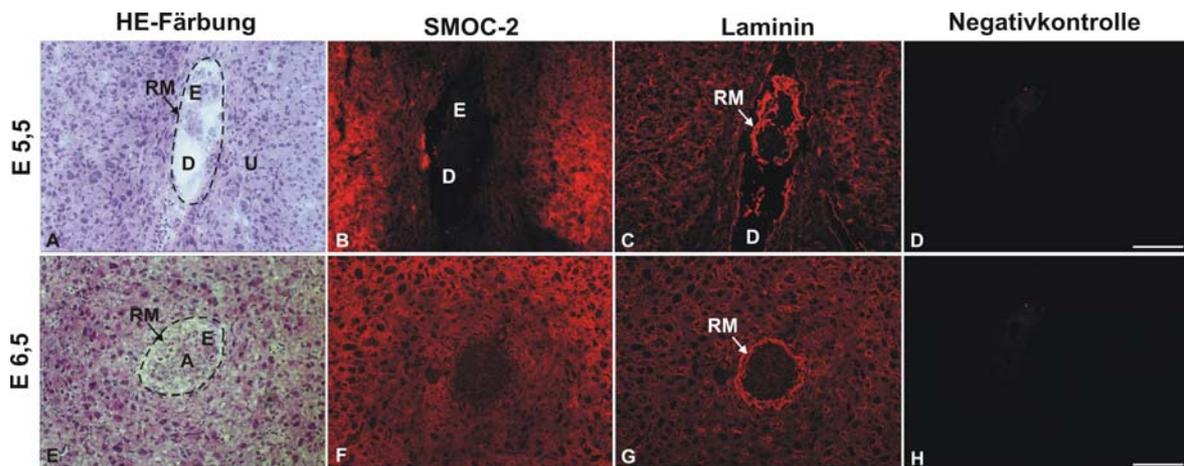


Abb. 3.8: Lokalisation von SMOC-2 in Mausembryonen von Tag 5,5 bis 6,5.

A-D: longitudinaler Schnitt, Balken 50 µm; E-H: transversaler Schnitt, Balken 50 µm

A, E: Hämatoxylin-Eosin-Färbung; RM=Reichert's Membran, E=embryonales Ektoderm, D=Dottersack, U=Uterusschleimhaut, A=Amnionhöhle. Die gestrichelte Linie stellt die Grenze zwischen maternalem und embryonalem Gewebe dar.

B, F: Antikörper gegen SMOC-2; C, G: Antikörper gegen Laminin-1; D, H: Negativkontrolle (kein Primärantikörper)

3.4.2.2 SMOC-2 in Mausembryonen von Tag 7,5 bis 12,5

Ab Embryonaltag 7,5 entsteht das Mesoderm und ein diffuses, jedoch spezifisches Signal für SMOC-2 (*Abb. 3.9 B*) war im Bereich zwischen maternalem und embryonalem Gewebe zu erkennen. Die Färbung im maternalen Bereich war zwar stärker als im Embryo, doch kam auch hier ein SMOC-2 Signal auf. Dieses ließ sich mit der Laminin-Färbung überlagern, die sowohl die Reichert's Membran (eine maternale Basalmembran) wie auch die entstehende Basalmembran des Embryos nachwies, die die beiden Keimblätter Ektoderm und Entoderm voneinander trennt (*Abb. 3.9 C*). Damit konnte der Beginn der Expression von SMOC-2 auf eine frühembryonale Phase eingegrenzt werden.

Auch das Amnion entsteht, der Embryo wächst und wenn mit Tag 8,5 die Organogenese beginnt, entwickelt sich das Herz-Kreislauf-System. Während SMOC-2 nach wie vor nur an der Reichert's Membran nachzuweisen war (*Abb. 3.9 E*), zeigten alle Basalmembranen eine Laminin-1 Färbung (*Abb. 3.9 F*), die an den nun in einer schnellen Entwicklungsfolge klarer erkennbaren Strukturen des Embryos auch an diesen erhalten blieb (*Abb. 3.9 I*). Für SMOC-2 allerdings wurde ab Tag 9,5 erstmals eine zusätzliche Basalmembranfärbung detektierbar (*Abb. 3.9 H*), doch war keines der nun langsam erkennbaren Organe spezifisch gefärbt.

Dies änderte sich mit Embryonaltag 10,5. Da der Embryo nun deutlich größer war, wurde er aus dem Uterus heraus präpariert und auf den angefertigten Gefrierschnitten waren schon einzelne Organe zu erkennen. So waren Leber, Lungenflügel und das Herz mit seinen vier Kammern darstellbar. SMOC-2 wurde im Herz nachgewiesen, ließ sich

allerdings nicht auf Atrium oder Ventrikel eingrenzen (*nicht gezeigte Ergebnisse*). Auch lag keine Überlagerung mit der Basalmembranfärbung von Laminin-1 mehr vor. Es war aber interessant zu sehen, dass SMOC-2, das, wie zuvor gezeigt, im adulten Herz exprimiert wird, dort bereits ab Embryonaltag 10,5 vorkam.

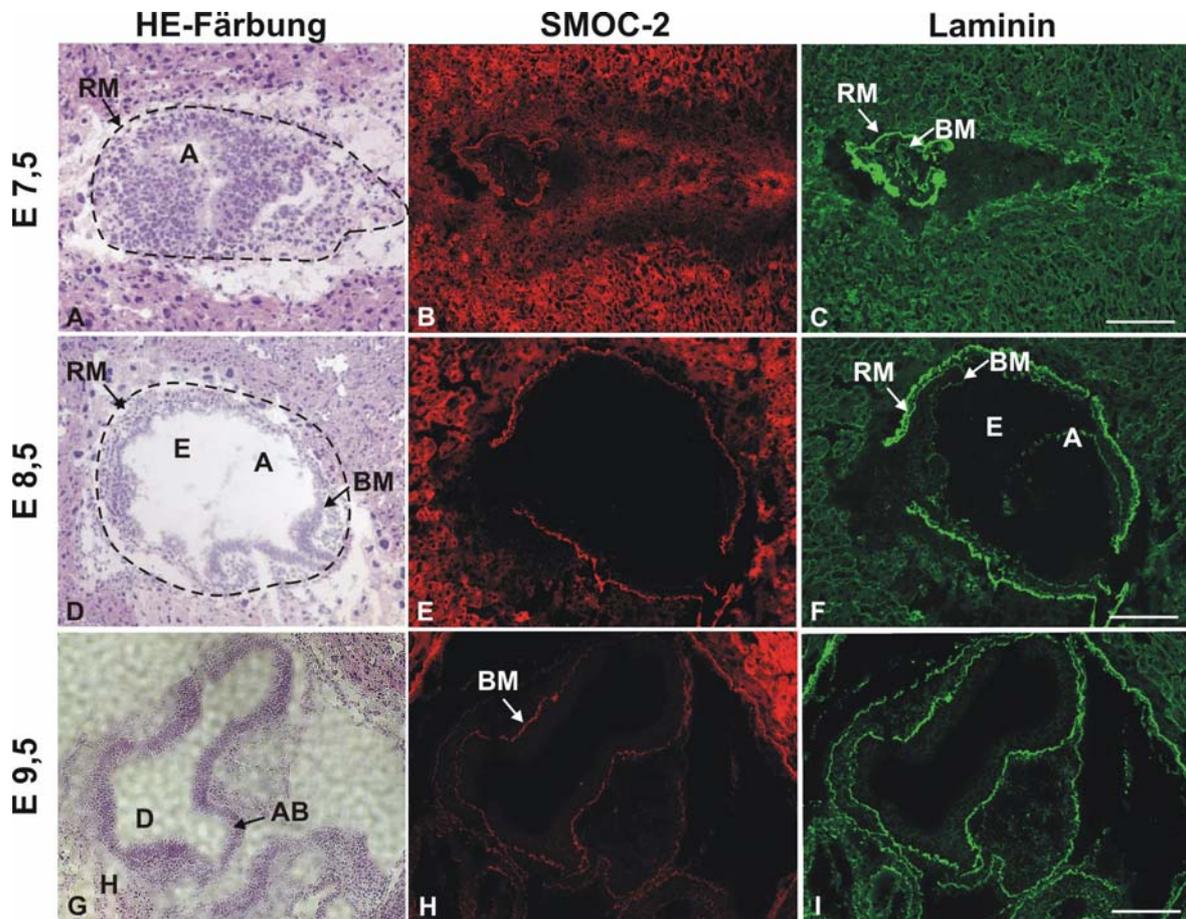


Abb. 3.9: Lokalisation von SMOC-2 in Mausembryonen von Tag 7,5 bis 9,5.

A-C: sagittaler Schnitt, Balken 100 μm ; D-F: sagittaler Schnitt, Balken 200 μm , G-I: transversaler Schnitt, Balken 200 μm . Die gestrichelte Linie stellt die Grenze zwischen maternalem und embryonalem Gewebe dar. In der ersten Schnittreihe kam es beim Aufziehen zu einer Streckung des Gewebes, weshalb sich der Embryo in B und C etwas anders darstellt und kein direkter Vergleich mit der HE-Färbung möglich ist.

A, D, G: Hämatoxylin-Eosin-Färbung; A=Amnion, RM=Reichert's Membran, BM=Basalmembran, E=Exocoelom, AB=Augenbläschen, D=Diocoel (Zwischenhirnlumen), H=Herzanlage; B, E, H: Antikörper gegen SMOC-2; C, F, I: Antikörper gegen Laminin-1

Mit der Weiterentwicklung des Embryos ist dieser ab Tag 12,5 trotz starker Krümmung vom Habitus her klar zu erkennen, wenn auch die Proportionen noch insofern verschoben sind, dass der Kopf ein Drittel des Körpervolumens ausmacht. In diesem Bereich und speziell im Gehirn trat keinerlei SMOC-2 Signal auf, während ansonsten zu der Färbung des Herzens nun weitere hinzukamen. So ließ sich SMOC-2 an verschiedenen Stellen des Urogenitalbereichs nachweisen. SMOC-2 schien in Bereichen sowohl um den Urogenitalsinus wie auch um den Genitalhöcker exprimiert zu werden (*nicht gezeigte Ergebnisse*).

3.4.2.3 SMOC-2 in Mausembryonen von Tag 14,5 bis 16,5

An Tag 14,5 ist der Embryo nahezu komplett, es laufen nun vor allem noch Vaskularisierungs- und Differenzierungsprozesse ab. Die Streckung erklärt sich aus den zunehmend vorhandenen Skelettelementen. So waren Knorpelanlagen und Wirbelsäule in der HE-Färbung deutlich zu erkennen (*Abb. 3.10*) und zeigten auch eine Expression für SMOC-2, worauf später noch eingegangen wird.

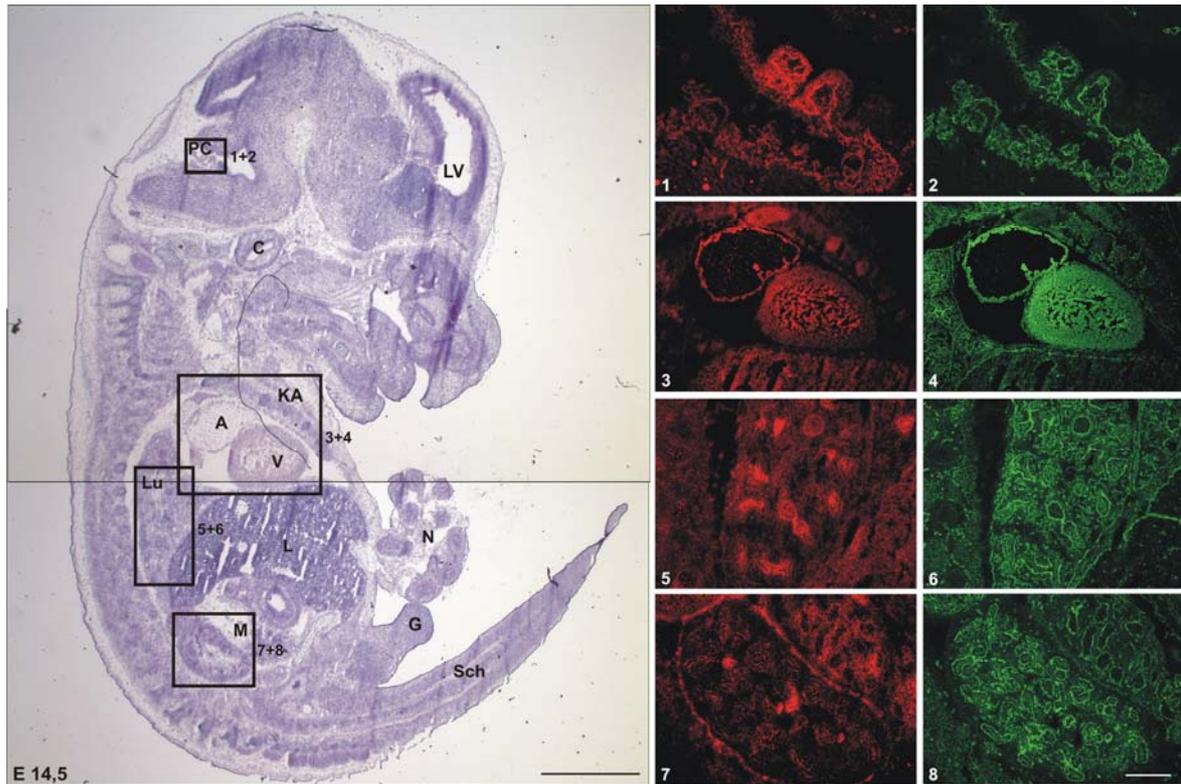


Abb. 3.10: Lokalisation von SMOC-2 im Mausembryo Tag 14,5.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines Sagittalschnitts, Balken 2 mm

LV=Lateralventrikel, PC=Plexus choroideus, C=Cochlea, V=Herzventrikel, A=Atrium, L=Leber, KA=Knorpelanlagen, Lu=Lunge, N=Nabelschnur, G=Genitalhöcker, M=Metanephros, Sch=Schwanz

Die Balken in 1-8 entsprechen 400 µm.

1, 3, 5, 7: Antikörper gegen SMOC-2; 2, 4, 6, 8: Antikörper gegen Laminin-1

Das Herz war in Ventrikel und Atrium (3, 4) positiv für SMOC-2, wie ab Tag 10,5 durchgehend gezeigt werden konnte. Neu dazu kam eine Struktur im Gehirn, der Plexus choroideus (1, 2), dessen zottenbesetzte Oberfläche ein spezifisches SMOC-2 Signal aufwies, das in seiner Verteilung über Basalmembranstrukturen hinausging, wie der Vergleich mit Laminin zeigte. Es handelte sich hierbei wahrscheinlich um eine Färbung des Ependyms, einer ektodermalen einschichtigen Zellauskleidung. Auch in der erstmals SMOC-2 positiven Lunge (5, 6) war nicht nur eine Überlagerung mit Laminin festzustellen. Es waren die Bronchiolen, die sehr stark SMOC-2 exprimierten.

Während allerdings die Lungenkapsel keine Färbung für SMOC-2 aufwies, zeigte die Kapsel des Metanephros, der späteren Niere, ein starkes Signal. Auch für die Bereiche im Nieren-Innern, wo adult Glomeruli und Tubuli gefärbt waren, zeichnete sich bereits SMOC-2 Expression ab (7, 8).

Diese Kontinuität der SMOC-2 Expression deutete daraufhin, dass das Protein in der Entwicklung der Maus durchgehend eine Rolle spielte, was sich auch für den zuletzt analysierten Embryonaltag 16,5 bestätigte. Hier kam weiterhin eine deutliche Färbung der Knorpel hinzu. Diese waren stark SMOC-2 positiv und das zu diesem Stadium noch vorherrschende Skelettelement. Die endochondrale Verknöcherung der Knochenanlagen ist zu diesem Zeitpunkt zwar im Gange, aber noch nicht abgeschlossen. Auffällig war an diesem Tag auch noch die erstmals beobachtete Expression von SMOC-2 in der Unterkiefer-Speicheldrüse (*nicht gezeigte Ergebnisse*).

3.4.2.4 SMOC-2 in der neugeborenen Maus

Nach der Geburt ist die Maus zwar lebensfähig, doch sind noch nicht alle Organe so vollständig entwickelt wie im adulten Stadium. Um eventuelle Unterschiede oder Auffälligkeiten erfassen zu können, wurden auch Neugeborene eingebettet und Gefrierschnitte des Kopfes und Rumpfes angefertigt. Besonders prominent traten Herz, Nieren, Ovar und sämtliche Knorpel hervor. Am Beispiel des Rippenknorpels ist das Expressionsmuster des Proteins dargestellt (*Abb. 3.11 A-D*). Es unterschied sich deutlich von der Laminin-1 Färbung und trat im Knorpel selbst auf (*Abb. 3.11 B*). Ebenso fiel in der neugeborenen Maus die Färbung der Haut auf, die auch im adulten Organismus nachzuweisen ist und auf die im weiteren Verlauf dieser Arbeit noch verstärkt eingegangen wird. Es bleibt festzuhalten, dass die einzelnen Schichten der Haut SMOC-2 unterschiedlich stark exprimieren (*Abb. 3.11 F*). So war die Muskelfaszie gefärbt, was mit den mRNA-Daten, die eine Expression von SMOC-2 in Muskelgewebe vorhergesagt hatten, in Einklang steht. In der Dermis war keinerlei spezifische Struktur zu erkennen, doch wurde SMOC-2 exprimiert, da im Vergleich mit der Negativkontrolle eine klare Färbung vorlag. Eine deutliche und spezifische Expression von SMOC-2 konnte allerdings in der Epidermis gefunden werden (*Abb. 3.11 F*). Welche Zellen genau gefärbt waren, bleibt zu diskutieren, doch dehnte sich die Färbung auch um Anhänge wie die Haarfollikel aus. Im Vergleich mit Laminin (*Abb. 3.11 G*) war wieder deutlich zu erkennen, dass SMOC-2 ein breiteres Expressionsmuster hat und nicht auf Basalmembranen beschränkt ist.

Damit unterschied es sich von SMOC-1, dessen Verteilung zu einem früheren Zeitpunkt bereits beschrieben worden war (Vannahme et al., 2002).

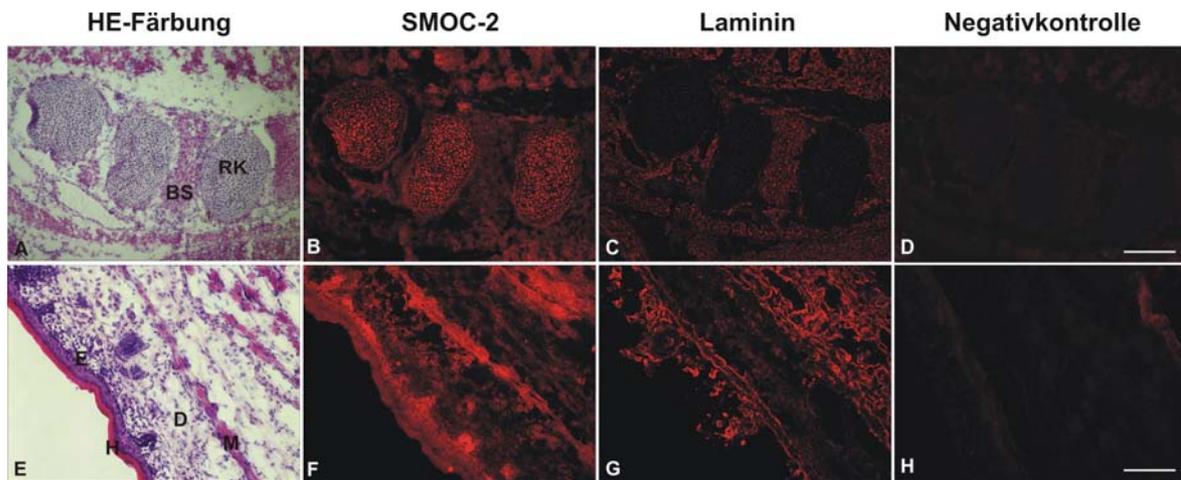


Abb. 3.11: Lokalisation von SMOC-2 in der neugeborenen Maus 1,5 Tage nach der Geburt.

A: RK=Rippenknorpel, BS=Bandscheibe, A-D Balken 200 μ m, E: H=Hornschicht, E=Epidermis, D=Dermis, M=Muskelfaszie, E-H Balken 400 μ m

A, E: Hämatoxylin-Eosin-Färbung; B, F: Antikörper gegen SMOC-2; C, G: Antikörper gegen Laminin-1; D, H: Negativkontrolle (kein Primärantikörper)

3.5 Zelluläre Wechselwirkungen von SMOC-1 und SMOC-2

Da über die beiden SMOCs noch keinerlei funktionelle Aussagen gemacht werden konnten, war es nahe liegend, mit *in vitro* Studien in definierten Systemen zunächst Hinweise zu sammeln, welche Rolle den Proteinen im Organismus zufallen könnte. Da gerade die Lokalisation von SMOC-2 einige Organe eingegrenzt hatte, die eine bedeutende Expression des Proteins zeigten, wurde zunächst nach Zelllinien gesucht, die repräsentativ für diese Organe eingesetzt werden konnten. Dabei wurden z.B. Lungenfibroblasten, Nierenzellen, Chondrosarkomzellen und Keratinozyten getestet.

3.5.1 Zelladhäsionsversuche

Da Proteine der extrazellulären Matrix häufig Einfluss auf die Adhäsion von Zellen an ein bestimmtes Substrat nehmen und diese entweder fördern oder hemmen können, wurde zunächst der Ansatz der Zelladhäsionsversuche gewählt. Dabei wurden die unterschiedlichen Proteinfragmente für SMOC-1 und SMOC-2, jeweils FTST und EC, in Verdünnungsreihen auf Mikrotiterplatten aufgebracht und diese damit beschichtet (Rousselle und Aumailley, 1994). Als Positivkontrolle wurde humanes Fibronectin verwendet, von dem bekannt ist, dass Zellen aufgrund der an ihrer Zelloberfläche befindlichen Integrine daran binden (Gailit und Ruoslahti, 1988). Nach Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden Einzelzellsuspensionen der unterschiedlichen

Zelllinien auf die vorbehandelten Platten aufgebracht. Der Anteil an Zellen, der an die Proteine binden konnte, wurde über eine Kristallviolett-Färbung im ELISA-Reader quantifiziert (*Abb. 3.12*).

Es wurden Zelllinien getestet, die verschiedene Organe repräsentieren und ein breites Integrin-Repertoire abdecken. So werden z.B. häufig HaCaT- und WI26-Zellen für Zelladhäsions-Studien verwendet. Obwohl die Immunfluoreszenz-Färbungen SMOC-2 in der Lunge nachgewiesen hatten, zeigten die humanen Lungenfibroblasten (WI26) keine Zelladhäsion an SMOC-2. Auch die beiden eingesetzten SMOC-1 Fragmente hatten keinen fördernden Einfluß auf die Zellbindung, während die Zellen eine deutliche Bindung an Fibronectin zeigten. Auch die Ratten Chondrosarkom Zellen (RCS), die den Knorpel repräsentierten, konnten an keines der SMOC-Proteinfragmente binden.

Dies war anders in den Zellen, die der Haut entstammten. So wurde zunächst ein Effekt in humanen Melanomzellen (A375) festgestellt, der darin bestand, dass sie nicht nur an Fibronectin, sondern auch an die EC-Domänen der beiden SMOCs binden konnten. Während die FTST-Fragmente die Bindung nicht beeinflussten, konnten die Zellen an SMOC-1 EC in gleichem Maße wie an Fibronectin binden und auch für SMOC-2 EC war eine klare Bindung erkennbar.

Das Ergebnis, dass die extrazelluläre Calcium-bindende Domäne beider SMOCs Zelladhäsion förderte, war umso überzeugender, da es in weiteren Zelllinien gezeigt werden konnte. So konnten humane Keratinozyten (HaCaT) unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen sehr gut binden. Das Resultat war von der Tendenz ähnlich wie im Fall der A375-Zellen. Schon bei einer Konzentration von 10 µg/ml hatte die Bindung der Zellen an SMOC-1 und SMOC-2 EC Sättigung erreicht, was im Fall der HaCaT-Zellen auch für die Fibronectin-Positivkontrolle galt. SMOC-1 und SMOC-2 FTST hatten keinen Einfluß auf die Bindung der Zellen.

Da es sich bei den Proteinen, die für die Experimente verwendet wurden, um murine SMOCs handelte, sollte der Versuch dahingehend noch an Relevanz gewinnen, dass bei der Auswahl der Zellen die gleiche Spezies Verwendung fand. So wurde das Zelladhäsionsexperiment sowohl mit einer murinen Keratinozyten-Zelllinie (PAM212) als auch mit primären Maus-Keratinozyten wiederholt. Beide zeigten die gleiche Tendenz und untermauerten die These, dass Zellen an die EC-Domänen der SMOCs binden konnten, während die restlichen Domänen für diesen Vorgang keine Rolle spielten. Dass die Bindung in jedem Fall stark war, konnte durch den Vergleich mit Fibronectin belegt werden.

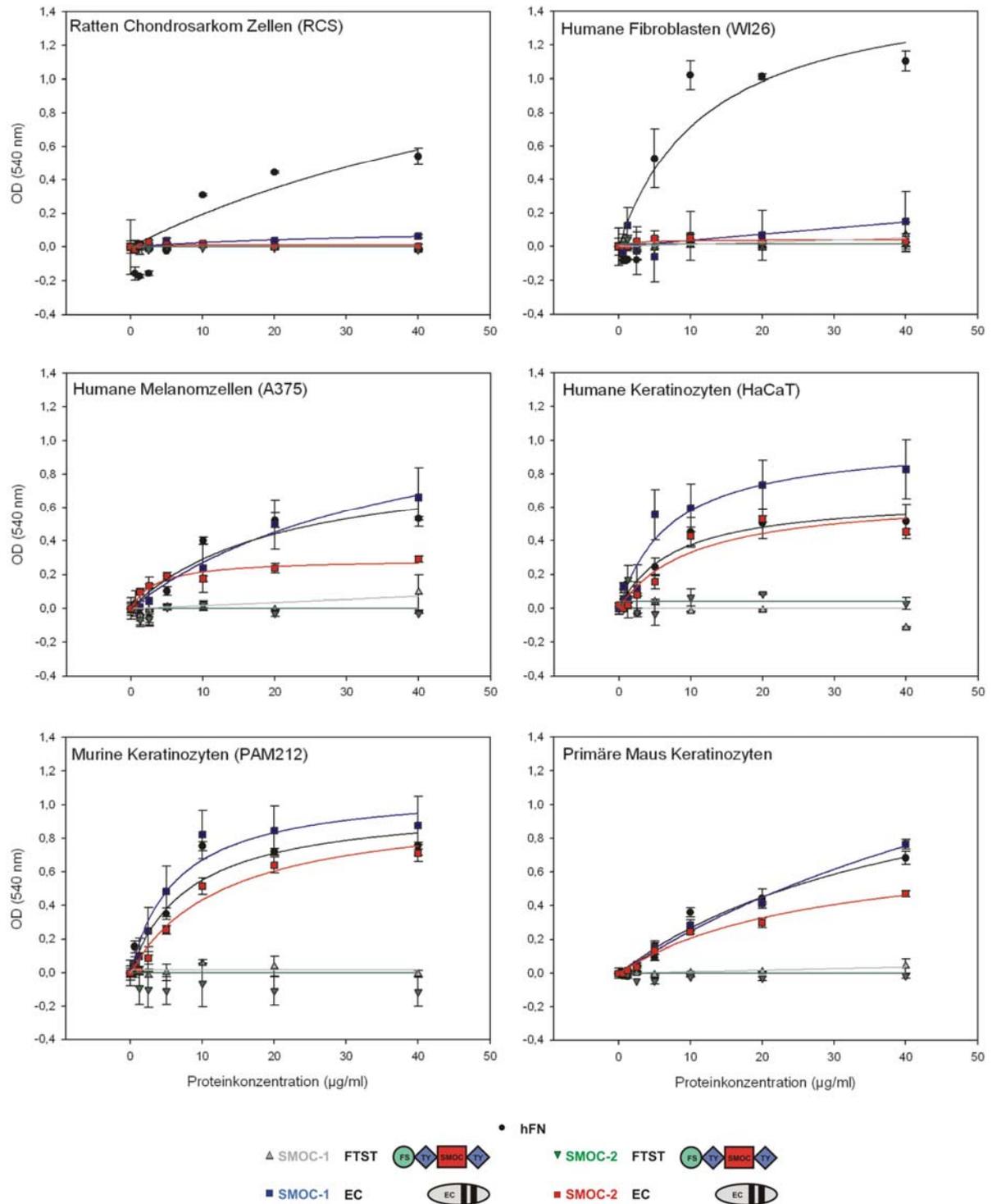


Abb. 3.12: Zellbindung an SMOCs.

Mikrotiter-Platten wurden mit steigenden Konzentrationen von SMOC-1 oder SMOC-2 Proteinfragmenten (FTST oder EC) über Nacht bei 4°C beschichtet. Humanes Fibronectin (hFN) diente als Positivkontrolle. Nach dem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit 1%-iger BSA-Lösung erfolgte eine Inkubation mit Ratten Chondrosarkom Zellen (RCS), humanen Fibroblasten (WI26), humanen Melanomzellen (A375) oder humanen Keratinozyten (HaCaT), murinen Keratinozyten (PAM212) oder primären Maus-Keratinozyten für 30 min bei 37°C. Nach dem Waschen wurden die adhärenierten Zellen fixiert, mit Kristallviolett angefärbt und mit einer Triton-Lösung solubilisiert. Die Extinktion des gelösten Farbstoffs wurde bei 540 nm bestimmt.

Worüber die Bindung der Zellen an die SMOCs vermittelt wurde, war allerdings noch unklar. Da die SMOCs eine breite Verteilung aufwiesen, jedoch besonders die verschiedenen Hautzell-Typen an beide Proteine binden konnten, wurde dieses System detaillierter untersucht. Von den dargestellten Zelllinien waren die HaCaT-Zellen am besten charakterisiert, weshalb sie für weitere Experimente zum Einsatz kamen.

Da sich in den bisherigen Versuchen die EC-Domäne als für die Zellbindung verantwortlich dargestellt hatte, waren Wechselwirkungen mit zweiwertigen Kationen nicht auszuschließen. Zudem ist bekannt, dass das für die Zelladhäsions-Studien als Positivkontrolle verwendete Fibronectin, ein anderes Matrixprotein, an Zellen über Rezeptoren der Integrin-Familie bindet. Da auch Integrine für die Ligandenbindung divalente Kationen benötigen, lag es nahe, den Zelladhäsionsversuch unter diesen Gesichtspunkten zu wiederholen.

Die Beschichtung erfolgte nun allerdings nur noch mit den EC-Domänen der beiden SMOCs in der Konzentration, in der die Sättigung der Bindung erreicht war - 10 µg/ml. Dann wurde EDTA zugesetzt, um sämtliche Kationen aus dem System zu entfernen, wobei als Positivkontrolle Kollagen I verwendet wurde, für dessen Adhäsion Ionen-Abhängigkeit beschrieben ist (Elices et al., 1991; Thamilselvan et al., 2003).

Die Bindung der HaCaT-Zellen an Kollagen I sowie an SMOC-1 EC und SMOC-2 EC war nach Koinkubation der Zellen mit 5 mM EDTA komplett aufgehoben (*Abb. 3.13*). Somit gab es zum einen einen weiteren Hinweis darauf, dass die Bindung Kationen-abhängig war, zum anderen stieg die Wahrscheinlichkeit, dass Rezeptoren aus der Integrin-Familie an dieser Wechselwirkung beteiligt waren.

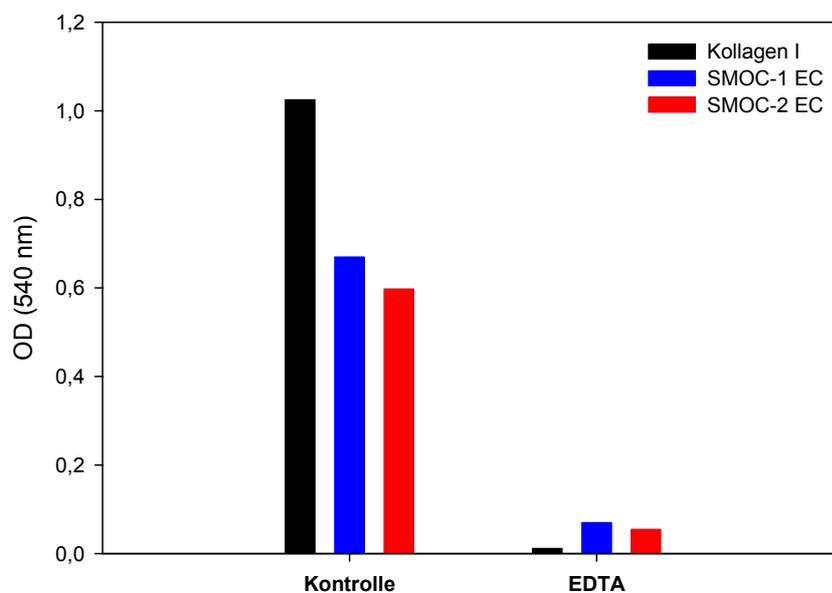


Abb. 3.13: Bindung von HaCaT-Zellen an SMOCs in Abhängigkeit von zweiwertigen Kationen.

10 µg/ml der EC-Domänen von SMOC-1 oder -2 wurden pro Loch an eine 96-well-Platte gebunden und freie Bindungsstellen mit BSA blockiert. Eine Suspension humaner Keratinozyten (HaCaT) in serumfreiem Medium wurde ohne oder mit 5 mM EDTA für 40 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen, angefärbt und die Extinktion bei 540 nm ermittelt. Kollagen I diente als Positivkontrolle.

3.5.2 Integrin-Profil der HaCaT-Zellen und Inhibitionsstudien

Integrine bestehen aus einer α - und einer β -Untereinheit, die in ihrer Kombination 24 unterschiedliche Rezeptoren aufbauen können. Da in verschiedenen Publikationen Integrin-Rezeptoren auf der Oberfläche von HaCaT-Zellen beschrieben sind, wurden diese Integrine auf ihre Wechselwirkung mit SMOC-1 oder SMOC-2 EC getestet. So können laut Literatur folgende Integrine gefunden werden: $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ (Scharffetter-Kochanek et al., 1992) sowie $\alpha 5\beta 1$, $\alpha \nu\beta 1$, $\alpha \nu\beta 6$ (Koivisto et al., 1999) und $\alpha 6\beta 4$ (Hintermann et al., 2001), aber auch die $\alpha 1$ -Untereinheit ist nachweisbar (Becker et al., 2002).

Um Bindungsstudien durchzuführen, wären ELISA-Typ Liganden Bindungs-Assays naheliegend gewesen, doch hätten dazu alle genannten Integrine sowie SMOC-1 EC und SMOC-2 EC in löslicher Form vorliegen müssen. SMOC-1 und SMOC-2 EC hätten an eine Mikrotiterplatte gekoppelt und die Integrine als eventuelle Bindungspartner im Überstand zugegeben werden können. Anhand der Färbung mit einem spezifischen Antikörper wäre so eine Bindung eindeutig nachweisbar gewesen. Da lösliche Integrine rar sind, konnte ein solches Experiment nur für $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ und $\alpha 3\beta 1$ von Dr. Johannes Eble an der Universität Münster durchgeführt werden, der diese Integrine in löslicher Form selbst produziert hatte. Für diese drei Integrine konnte danach jedoch eine Bindung an SMOC-1 und SMOC-2 EC ausgeschlossen werden. Es war gegenüber den Positivkontrollen keinerlei Signal zu erkennen gewesen (*nicht gezeigte Ergebnisse*).

Damit blieben noch $\alpha 5\beta 1$, $\alpha \nu\beta 1$, $\alpha \nu\beta 6$ und $\alpha 6\beta 4$ als mögliche Bindungspartner zur Auswahl. Um diese zu testen, wurde ein Inhibitionsansatz gewählt. Dahinter stand die Idee, die entsprechenden Integrine auf der Zelloberfläche mit blockierenden Antikörpern abzusättigen, so dass sie für die Bindung an den Liganden nicht mehr verfügbar waren. Das Ergebnis einer solchen Studie wäre also die Aufhebung der Zelladhäsion an ein bestimmtes Substrat, im betrachteten Fall SMOC-1 oder SMOC-2 EC.

Dieser Weg wurde für die restlichen Integrine gewählt und zwar über blockierende Antikörper gegen $\beta 1$, $\alpha 6$, $\beta 6$ und $\alpha \nu$. Wieder wurde die Mikrotiterplatte im Konzentrationsbereich der Sättigung der Liganden beschichtet. Danach wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert und HaCaT-Zellen ohne irgendeinen Zusatz oder aber mit 20 $\mu\text{g/ml}$ eines blockierenden Antikörpers gegen das jeweilige Integrin inkubiert. Als Kontrollen wurden humanes Fibronectin und Vitronectin an die Platte gekoppelt (*Abb. 3.14*).

Dass HaCaT-Zellen verschiedene Integrin-Rezeptoren für unterschiedliche Funktionen nutzen, ist bekannt (Koivisto et al., 1999). So erfolgt die Bindung an Fibronectin hauptsächlich über $\alpha 5\beta 1$ -Integrin, das die Tripeptid-Sequenz Arg-Gly-Asp (RGD) erkennt, während die Zellausbreitung eher über $\alpha \nu\beta 6$ vermittelt wird. HaCaT-Zellen können ebenfalls RGD-abhängig über verschiedene $\alpha \nu$ -Integrine an Vitronectin binden. Ob die HaCaT-Zellen auch RGD-vermittelt an die EC-Domänen der SMOCs

binden, wurde daher zunächst über Sequenzanalyse überprüft. Das Tripeptid kam aber in keiner der EC-Domänen vor. Zur Absicherung wurde auch ein Versuch durchgeführt, in dem gleichzeitig mit den Zellen 500 $\mu\text{g/ml}$ RGD-Peptid auf die mit SMOC beschichteten Platten gegeben wurde. Dieses hätte an die entsprechenden Integrine an der Zelloberfläche der HaCaTs binden und sie für jede weitere Interaktion blockieren können. Für Vitronektin erfolgte eine komplette Inhibition der Bindung, nachdem die RGD-vermittelte Wechselwirkung über αv nicht mehr stattfinden konnte. Für Fibronektin wurde nur eine Reduktion des Signals festgestellt, jedoch konnten die Zellen weiterhin adhären, was die Nutzung eines weiteren Integrin-Rezeptors vermuten ließ. Die Bindung an die EC-Domänen von SMOC-1 und SMOC-2 war unverändert, so dass die RGD-Unabhängigkeit bestätigt war (*nicht gezeigte Ergebnisse*).

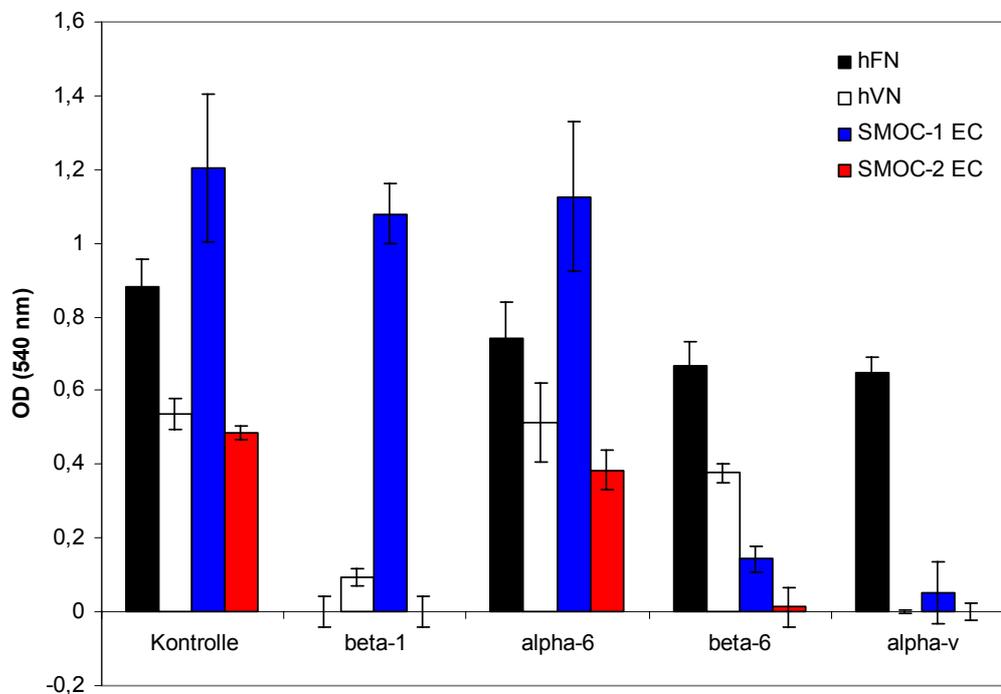


Abb. 3.14: Inhibition der Zellbindung.

10 $\mu\text{g/ml}$ der EC-Domänen von SMOC-1 oder -2 wurden pro Loch an eine 96-well-Platte gebunden und freie Bindungsstellen mit BSA blockiert. Eine Suspension humaner Keratinozyten (HaCaT) in serumfreiem Medium wurde ohne oder mit 20 $\mu\text{g/ml}$ blockierenden Antikörpern gegen $\beta 1$, $\alpha 6$, $\beta 6$ oder αv Integrin für 40 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen, angefärbt und die Extinktion bei 540 nm ermittelt. Als Positivkontrolle dienten humanes Fibronektin (hFN) und humanes Vitronektin (hVN).

Da die Hälfte aller Integrine die $\beta 1$ -Untereinheit trägt, war es besonders wichtig, eine eindeutige Aussage über deren Rolle für die Adhäsion an die SMOCs zu bekommen. Im Verlauf der Inhibitionsstudien wurden viele verschiedene $\beta 1$ -Antikörper, aber auch einige gegen andere Integrin-Untereinheiten als nicht blockierend identifiziert und schließlich nur solche benutzt, die auch in anderen Labors erfolgreich eingesetzt werden. HaCaT-Zellen binden sowohl an Fibronektin wie auch an Vitronektin über Rezeptoren mit

der $\beta 1$ -Untereinheit, da die Bindung signifikant reduziert war, wenn diese aufgrund der Blockierung nicht mehr zur Verfügung stand (*Abb. 3.14*). Auch an SMOC-2 EC konnten die Zellen über eine derartige Wechselwirkung adhären, während SMOC-1 EC nicht als Ligand eines $\beta 1$ -Integrin-Rezeptors in Frage kam, da die Zellen nahezu unverändert weiterhin an das Protein binden konnten.

Keines der im Versuch getesteten Proteine schien Rezeptoren mit der $\alpha 6$ -Untereinheit zu nutzen, da die HaCaT-Zellen auch nach $\alpha 6$ -Blockierung ähnliche Bindungseigenschaften zeigten wie in der unbehandelten Kontrolle. Die Inhibition der $\beta 6$ -Untereinheit hingegen hatte einen deutlichen Einfluß auf die Bindung der Zellen an die EC-Domänen beider SMOCs und hemmte diese um 85% für SMOC-1 und fast vollständig für SMOC-2.

Einerseits bestätigte dies erneut die Bindung der Zellen an SMOCs über Integrin-Rezeptoren, andererseits lag nun die konkrete Identifizierung des Rezeptors auf der Hand, da $\beta 6$ auf den HaCaT-Zellen zusammen mit der αv -Untereinheit auftritt. Um dies zu verifizieren, wurde ein weiterer Antikörper in den Test mit aufgenommen, der αv blockierende Wirkung hat. Das Ergebnis war eindeutig und bestätigte die Annahme (*Abb. 3.14*). Die Bindung der Zellen an SMOC-1 und SMOC-2 EC war vollständig aufgehoben. Vitronektin stellte eine gute Positivkontrolle dar, da die HaCaT-Zellen nach Behandlung mit blockierendem Antikörper gegen αv auch an dieses nicht mehr binden konnten. Der Hauptrezeptor, über den die HaCaT-Zellen an die EC-Domänen von SMOC-1 und SMOC-2 banden, war also $\alpha v\beta 6$ (*Abb. 3.15*).

Integrin-Untereinheit	SMOC-1 EC	SMOC-2 EC
$\beta 1$	-	+
$\alpha 6$	-	-
$\beta 6$	+	+
αv	+	+

Abb. 3.15: Die auf ihre Interaktion mit den SMOCs getesteten Integrin-Untereinheiten im Überblick. Während die Zellbindung an die EC-Domänen von SMOC-1 und -2 nicht über $\alpha 6$ Integrin abzulaufen schien, spielte $\alpha v\beta 6$ Integrin eine bedeutende Rolle für die Bindung an beide SMOCs. $\beta 1$ Integrin war im Fall von SMOC-2 wahrscheinlich über den $\alpha v\beta 1$ Rezeptor auch an Zellbindung beteiligt.

Für SMOC-2 spielte daneben eventuell auch noch $\alpha\beta 1$ eine Rolle, während $\alpha 5\beta 1$ eher nicht in Frage kam. Einer der Gründe dafür ist, dass z.B. WI26-Zellen diesen als Hauptrezeptor an der Oberfläche tragen, aber in keinsten Weise an irgendeine SMOC-Domäne binden konnten (*Abb. 3.12*). Von allen auf den HaCaT-Zellen vorhandenen Integrinen konnte eines eindeutig als Rezeptor für die Bindung an SMOCs identifiziert werden - $\alpha\beta 6$ (*Abb. 3.15*). Dies soll im Folgenden nun auch noch auf den Zellen selbst sichtbar gemacht werden.

3.5.3 Lokalisation von $\alpha\beta 6$ -Integrin auf HaCaT-Zellen

Um das Vorhandensein des $\alpha\beta 6$ -Rezeptors auf der Oberfläche der HaCaT-Zellen zu zeigen und damit auch die physiologische Signifikanz der Bindung zu bestätigen, wurde die Adhäsion von HaCaT-Zellen an SMOCs auf *Lab-Tek®* Objekträgern untersucht. Als Positivkontrolle wurde Fibronectin verwendet, weil bekannt ist, dass $\alpha\beta 6$ im Gegensatz zu Vitronectin und Kollagen I an Fibronectin bindet (Busk et al., 1992) und insbesondere für die schon erwähnte Zellspreitung verantwortlich ist. Dies wurde im folgenden Experiment zunächst bestätigt.

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

Die HaCaT-Zellen adhärten, wie zu erwarten, an den EC-Domänen der beiden SMOCs und auch an Fibronectin (*Abb. 3.16*). Die Färbung mit einem Antikörper gegen $\alpha\beta 6$ (Huang et al., 1998) zeigte, dass das Integrin bei dieser Adhäsion in vinculinpositiven fokalen Kontakten lokalisiert war. Darüberhinaus entsprach die Färbung in der Positivkontrolle (*Abb. 3.16 A-C*) in etwa derjenigen der Adhäsion an die beiden EC-Domänen der SMOCs (*Abb. 3.16 D-I*).

So konnte auch auf dieser Ebene gezeigt werden, dass die Bindung der HaCaT-Zellen an SMOCs vermutlich über $\alpha\beta 6$ -Integrin vermittelt war. Im Fall von Fibronectin und SMOC-2 EC wurde über Färbung mit einem Antikörper gegen $\beta 1$ -Integrin ebenfalls eine Kollokalisierung desselben in Fokalkontakten festgestellt, was die Daten aus den Inhibitionsstudien bestätigte. Doch war die Färbung deutlich schwächer als für $\alpha\beta 6$ -

Integrin (*nicht gezeigte Ergebnisse*), so dass letzterer der Rezeptor für SMOC-1 und SMOC-2 zu sein scheint.

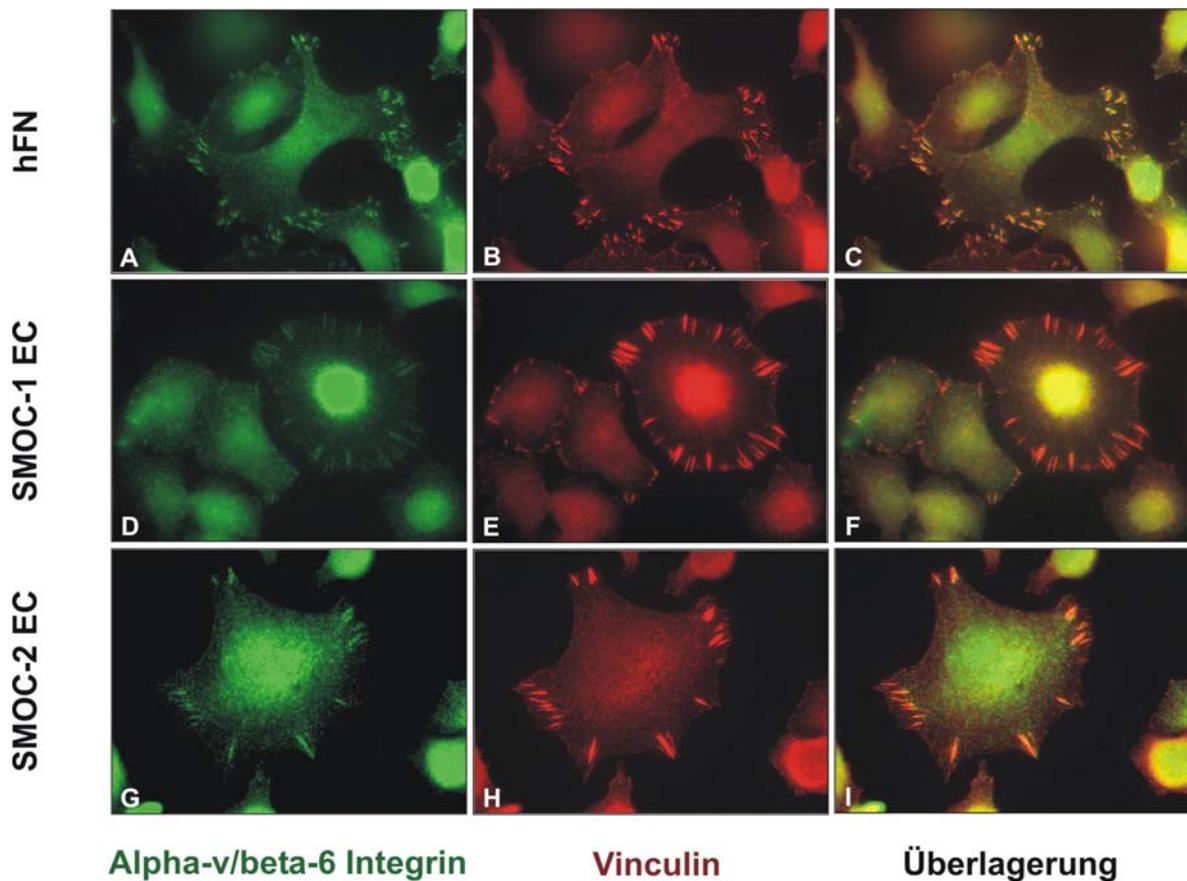


Abb. 3.16: Lokalisierung von $\alpha v \beta 6$ Integrin in HaCaT-Zellen.

HaCaT-Zellen wurden auf *Lab-Tek*® Objektträgern ausplattiert, die mit 10 $\mu\text{g/ml}$ humanem Fibronectin (A, B, C), SMOC-1 EC (D, E, F) oder SMOC-2 EC (G, H, I) beschichtet waren. Die Färbung erfolgte in A, D und G mit einem Antikörper spezifisch für $\alpha v \beta 6$ Integrin (Kaninchen) und einem Alexa488- (grün) markierten Antikörper gegen Kaninchen IgG, in B, E und H mit einem Antikörper gegen Vinculin (Maus) und einem Cy3- (rot) markierten Antikörper gegen Maus IgG. In C, F und I ist die Überlagerung der beiden Färbungen dargestellt.

3.5.4 Migration und Proliferation von HaCaT-Zellen

Nachdem nun gezeigt worden war, dass die EC-Domänen der beiden SMOCs in der Lage waren, Zelladhäsion zu fördern, lagen weitere *in vitro* Studien mit dem beschriebenen Zellsystem auf der Hand. Gerade die Wechselwirkung von Integrinen auf Zellen und einem bestimmten Substrat ließ die Frage aufkommen, ob die SMOCs auch das Migrationsverhalten der HaCaT-Zellen beeinflussen konnten. Dazu müssen bestimmte Integrin-Substrat-Interaktionen nicht nur statisch vorliegen, sondern einem dynamischen Ablauf folgend gelöst und wieder neu aufgebaut werden. Diese Prozesse laufen im lebenden System ständig ab und waren so besonders interessant, um die eindeutigen Ergebnisse der bisherigen Versuche auf die nächste Stufe bringen zu können.

Zu diesem Zweck wurde ein sogenannter *in vitro* Wundheilungsversuch durchgeführt (Tasanen et al., 2004). Dafür wurden mit in der Sättigung der Bindung befindlichen Konzentrationen an SMOC-1 und SMOC-2 EC beschichtete Platten mit den gleichen Mengen von HaCaT-Zellen versehen, die nach Übernacht-Inkubation einen Monolayer gebildet hatten, der sodann „verletzt“ werden konnte. Dies geschah dadurch, dass mit einer Pipettenspitze in der Mitte des Zellrasens senkrecht entlang gekratzt wurde, so dass eine Wunde entstand. Direkt nach Setzen der Wunde wurde ein Foto der Wundränder aufgenommen und diese so lange beobachtet, bis sie wieder vollständig zusammengewachsen waren, der Monolayer also wieder geschlossen vorlag.

Im Vergleich zur Kontrolle ist die Wanderung der HaCaT-Zellen auf SMOC-1 oder SMOC-2 EC nach 0, 8, 24 und 48 h gezeigt (Abb. 3.17), wobei das Ergebnis repräsentativ für eine Reihe unterschiedlicher Experimente dargestellt wird.

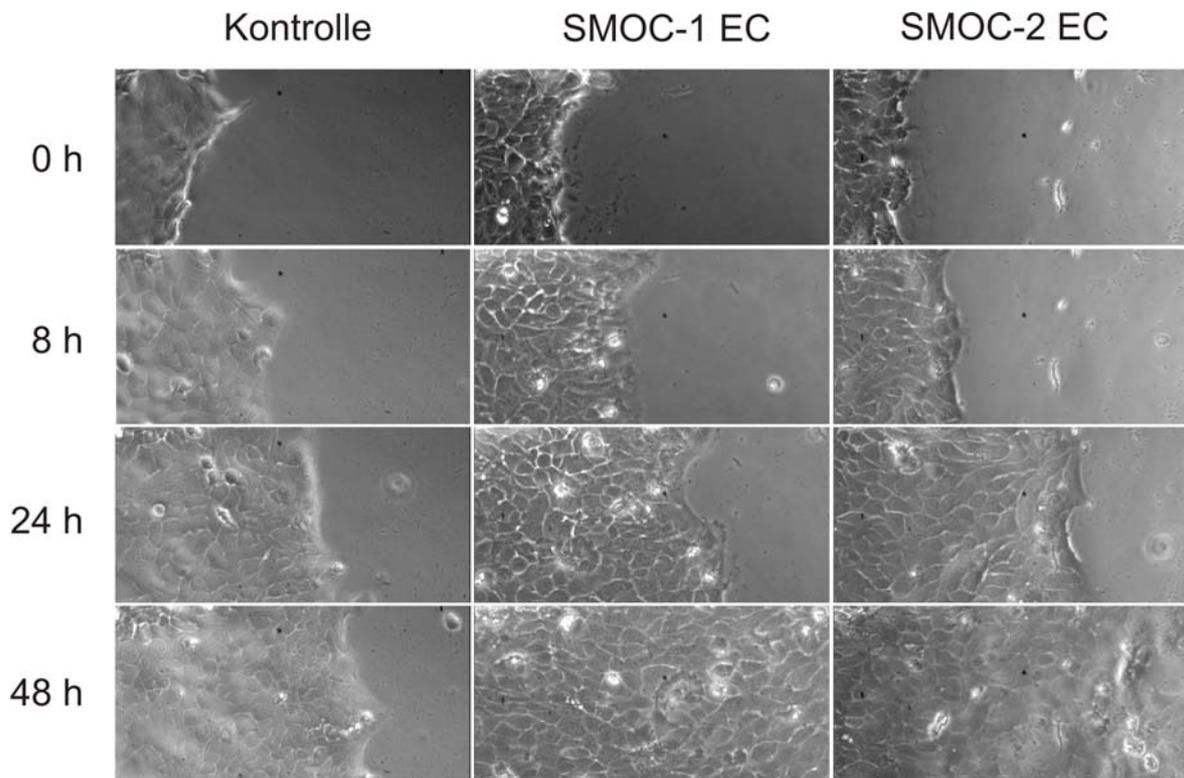


Abb. 3.17: *In vitro* Wundheilungsversuch.

HaCaT-Zellen wurden in der gleichen Dichte auf 24 well-Platten ausgesät, die zuvor mit 10 µg/ml SMOC-1 EC oder SMOC-2 EC beschichtet worden waren. Nach Übernacht-Inkubation wurde der gebildete Monolayer eingeritzt und die Wundränder 0, 8, 24 und 48 h später aufgenommen.

Zu den früheren Zeitpunkten war kaum ein Unterschied zwischen der Wanderung in der Kontrollplatte und auf den Substraten festzustellen (Abb. 3.17). So war nach 8 h der Beginn der Ausbreitung der Zellen zu sehen, nachdem diese sich wieder eine Matrix hergestellt hatten, auf der sie wandern konnten. Nach 24 h war ein deutlicher Fortschritt in der Migration der Zellen zu verzeichnen. Die Zellen wanderten entlang dem Substrat und

wiesen auf SMOC-1 und SMOC-2 EC nun einen kleinen Vorsprung gegenüber den Kontrollzellen auf. Deren verzögerte Migration auf der nur mit BSA blockierten Plastikplatte war nach 48 h ganz deutlich zu sehen (*Abb. 3.17*). Die Wunde in den Ansätzen mit SMOC-1 und SMOC-2 EC konnte schneller geschlossen werden. Der Monolayer war in diesen Fällen wieder hergestellt, während in der Kontrollplatte immer noch eine signifikante Distanz zurückzulegen blieb und im direkten Vergleich zwischen dem 24 und 48 h Wert nur ein kleiner Fortschritt zu beobachten war.

Dieses Ergebnis verdeutlichte, dass nicht nur die Adhäsion der HaCaT-Zellen, sondern auch ihre Migration durch die Inkubation auf SMOC-1 oder SMOC-2 EC gefördert wurde. Diese geht signifikant beschleunigt vonstatten, was auch quantitativ dargestellt werden kann (*Abb. 3.18*).

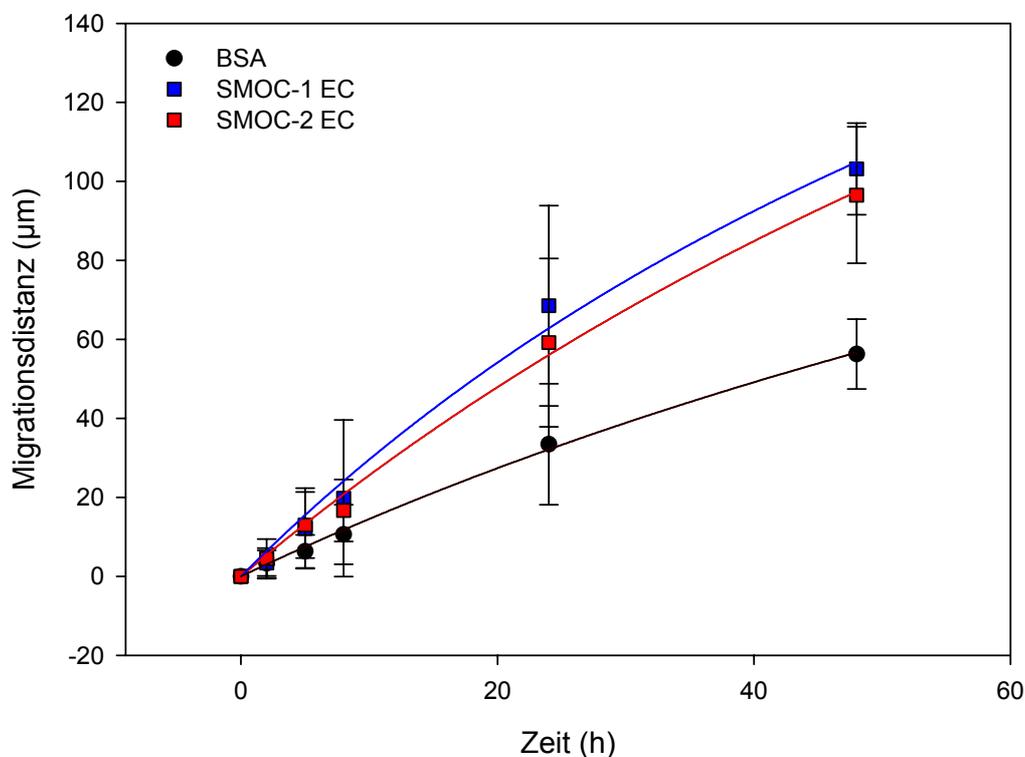


Abb. 3.18: Graphische Darstellung der Migration von HaCaT-Zellen auf verschiedenen Substraten.

Die Wanderung der HaCaT-Zellen wurde auf den Fotos ausgemessen und mittels einer parallel aufgenommenen Vergleichsskala umgerechnet in μm (Distanz, die von den Zellen zwischen dem angegebenen Zeitpunkt und dem Setzen der Wunde zurückgelegt wurde; es wird das Mittel aus fünf Messungen angegeben). Die Ergebnisse stammen aus drei Experimenten, die an unterschiedlichen Tagen durchgeführt wurden.

Eine Frage, die der Versuch aufwarf, blieb allerdings, dass sich nach Zeitintervallen von 24 und 48 h nach Setzen der Wunde die Zellen bereits geteilt haben könnten und so der gemessene Unterschied in der Migrationsrate in Wirklichkeit auf eine unterschiedliche

Proliferationsrate der Zellen in Abhängigkeit vom Substrat zurückzuführen war. So lag es nahe, auch einen Proliferationstest durchzuführen, um jegliche Zweifel auszuschließen.

Dies geschah in Form eines XTT-Assays, wozu wiederum Mikrotiter-Platten unbeschichtet belassen oder mit 10 µg/ml Fibronectin, SMOC-1 oder SMOC-2 EC beschichtet und HaCaT-Zellen in gleichen Mengen ausplattiert wurden. Es wurde XTT zu den Zellen gegeben, die dieses zu Formazan umsetzen. Da diese Substanz wasserlöslich ist, konnte ihre Konzentration zu den entsprechenden Zeiten photometrisch bestimmt werden.

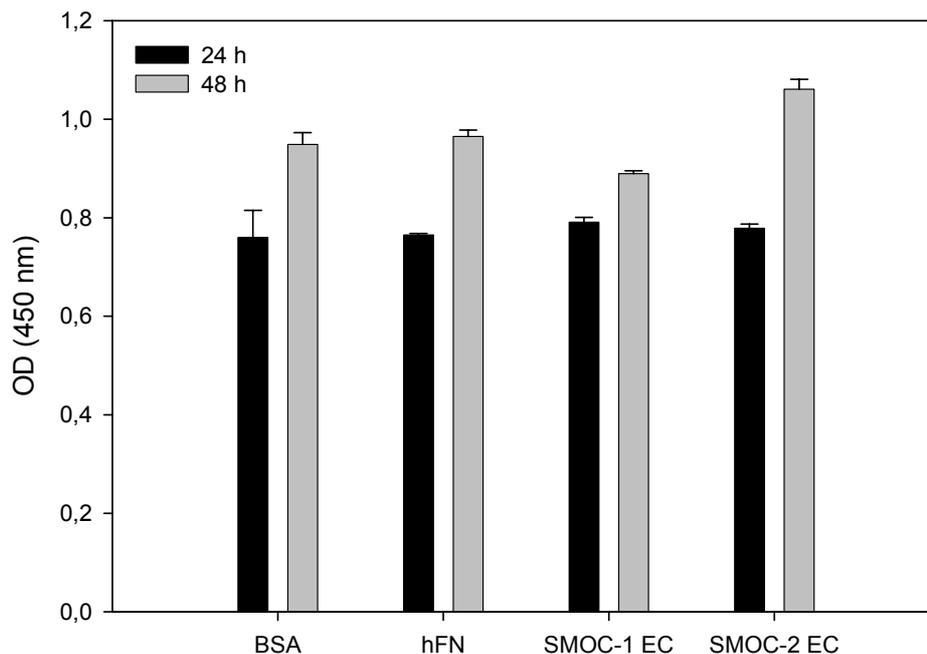


Abb. 3.19: Bestimmung der Proliferationsrate von HaCaT-Zellen mittels XTT-Assay.

Eine Mikrotiter-Platte wurde mit 10 µg/ml SMOC-1 oder SMOC-2 EC bei 4°C üN beschichtet. Humanes Fibronectin (hFN) diente als Positivkontrolle. Nach dem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit BSA wurden gleiche Mengen der humanen Keratinozyten ausgesät und für 24 oder 48 h bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Umsetzung von XTT zu Formazan bestimmt. Die Extinktion des löslichen Farbstoffs wurde bei 450 nm in einem Spektrophotometer festgehalten.

Die Proliferation der Zellen auf SMOC-1 und SMOC-2 EC im Vergleich zu BSA und dem Kontrollsubstrat war nicht signifikant höher (Abb. 3.19). Dies galt ganz besonders für die 24 h Werte, während im konkreten Versuch nach 48 h die Proliferation auf SMOC-1 EC geringer, für SMOC-2 EC etwas höher zu sein schien. Unabhängige Experimente bestätigten aber, dass der Einfluss der Proliferation zu vernachlässigen war und es sich im Fall der beschleunigten Wundheilung im *in vitro* Versuch tatsächlich ausschließlich um eine erhöhte Migrationsrate der Zellen auf SMOC-1 und SMOC-2 EC handelte.

Mit den Ergebnissen aus den *in vitro* Versuchen gab es nun starke Hinweise auf ein erstes System, in dem eine Funktion der SMOCs *in vivo* untersucht werden sollte. Da

Zelladhäsion und Migration in allen Organen eine Rolle spielen, in den vorherigen Versuchen aber gute Erfahrungen mit Keratinozyten gesammelt worden waren und auch schon ein *in vitro* Wundheilungsexperiment durchgeführt worden war, lag es nahe, die Ergebnisse *in vivo* zu überprüfen. SMOC-2 wurde in der Haut neugeborener Mäuse exprimiert (*Abb. 3.11 F*) und so standen nun Versuche an, die die Relevanz der erhaltenen Erkenntnisse über SMOC-1 und SMOC-2 im lebenden System weiter bestätigen sollten.

3.6 Expression und Funktion von SMOC-2 in der Haut

Um sich dem komplexen System Haut anzunähern, wurde mit primären Mauszellen gearbeitet. Diese stellten zwar immer noch ein definiertes Minimalsystem dar, waren aber direkt aus dem lebenden Organismus isoliert worden. Repräsentativ für die zwei Hauptbestandteile der Haut, die Dermis und die Epidermis, wurden zunächst primäre Fibroblasten und Keratinozyten verwendet. Da biochemisch noch nicht überprüft worden war, ob diese auch SMOCs exprimierten, wurden sowohl Zellüberstände abgenommen und gefällt, wie auch Zellextrakte hergestellt, um intrazelluläre Proteine nachweisen zu können. Alle so gewonnenen Proben wurden unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit spezifischen Antikörpern gegen die Proteine inkubiert.

Zunächst fiel auf, dass sowohl die Überstände wie auch die Zellextrakte SMOC-1 und SMOC-2 enthielten (*Abb. 3.20*). Das überraschte nicht, weil es sich bei den SMOCs zwar um sekretierte Proteine handelt, die aber natürlich intrazellulär hergestellt werden und demzufolge dort auch detektierbar sein sollten. Allerdings exprimierten primäre Fibroblasten nur SMOC-2 (*Abb. 3.20 A*), während primäre Keratinozyten sowohl SMOC-2 (*Abb. 3.20 B*) als auch SMOC-1 (*Abb. 3.20 C*) sezernierten. Die Größenunterschiede der beiden Proteine sind im Western Blot eindeutig zu sehen. SMOC-2 läuft bei 64 kDa, SMOC-1 bei 75 kDa. Dass die Proteine im Zellextrakt als Doppelbande vorlagen, kann an einer gesteigerten Proteaseaktivität im hergestellten Zellextrakt liegen. Es ist aber auch möglich, dass die Proteine, die intrazellulär noch nicht vollständig glykosyliert vorliegen, in allen Glykosylierungsformen vom Antikörper detektiert werden (Dinser et al., 2002).

Primäre Keratinozyten exprimierten SMOC-1 und SMOC-2, womit ihnen eventuell auch für die Zelladhäsion und Migration im lebenden System eine Rolle zukam. Das wurde zunächst über die Isolation des entsprechenden ganzen Gewebes untersucht, wobei nur die Gewebelots, bei denen die Detektion mit dem Antikörper gegen SMOC-2 durchgeführt wurde, reproduzierbare Ergebnisse lieferten (*nicht gezeigte Ergebnisse*).

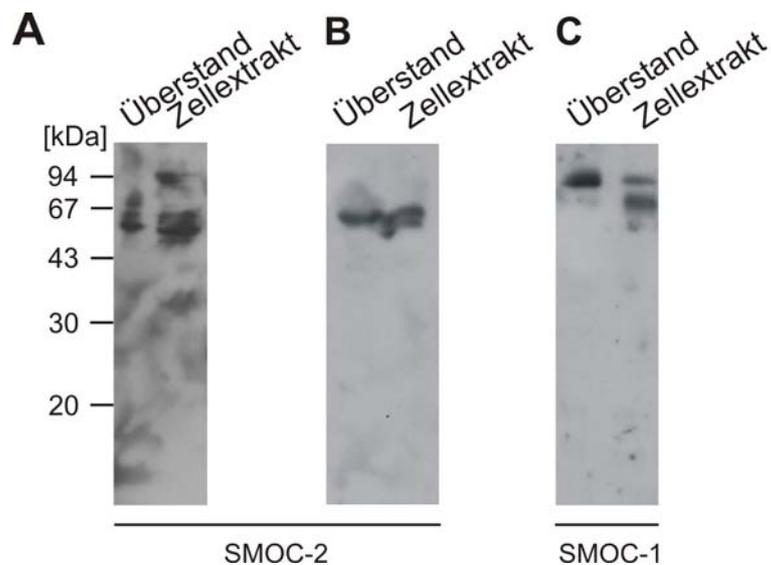


Abb. 3.20: Expression der SMOCs in verschiedenen Hautzelltypen.

1 ml Überstand primärer Fibroblasten (A) und primärer Keratinozyten (B, C) einer 10 cm Platte wurde TCA-gefällt; die Zellen der kompletten Platte wurden lysiert. 0,2% des Gesamtproteins aus dem Überstand und 2% des Proteins aus dem Zellextrakt wurden auf einem 12,5%-igen SDS-Polyacrylamid-Gel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran wurde die Expression mit einem spezifischen Antikörper gegen SMOC-2 (A, B) oder SMOC-1 (C) nachgewiesen. SMOC-1 konnte nur im Überstand und Zellextrakt primärer Keratinozyten nachgewiesen werden.

SMOC-2 konnte in Gesamthaut neugeborener wie auch adulter Mäuse nachgewiesen werden, wobei noch nicht klar war, in welchem Teil der Haut es exprimiert wurde. Um zu untersuchen, ob es in Keratinozyten und Fibroblasten vorkam wurde die *Split-Skin*-Methode angewendet (Hildebrand et al., 2002), um zumindest die schon erwähnten Hauptbestandteile Epidermis und Dermis voneinander zu trennen. Dabei wurde die Rückenhaut von Mäusen entweder an der Lamina lucida in Dermis und Epidermis getrennt oder sie wurde intra-epidermal verdaut.

Beide Trennungsmethoden erbrachten unabhängig voneinander das gleiche Ergebnis: SMOC-2 war in der Haut eindeutig nachweisbar und schien sowohl in Epidermis wie auch in Dermis vorzukommen (*nicht gezeigte Ergebnisse*). Um das Protein aber direkt vor Ort nachzuweisen, wurde auf histologische Untersuchungen zurückgegriffen.

3.6.1 Gewebelokalisation von SMOC-2 in der Haut

Um SMOC-2 in der Haut lokalisieren zu können, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Dazu wurde Haut neugeborener und adulter Mäusen gerichtet eingebettet, so dass alle Haarfollikel die gleiche Orientierung hatten, geschnitten und mit dem spezifischen SMOC-2 Antikörper gefärbt. Um die verschiedenen Hautschichten besser identifizieren zu können, wurden parallel Antikörper gegen Markerproteine eingesetzt. Die Ergebnisse waren für die Haut neugeborener und adulter Mäusen äquivalent.

Zunächst wurde eine Doppelfärbung von SMOC-2 und Cytokeratin-14 angefertigt und beide überlagert (*Abb. 3.21*). Cytokeratin-14 ist ein Markerprotein für basale Keratinozyten und daher in der Epidermis detektierbar (*Abb. 3.21 B*). Für SMOC-2 war ebenfalls ein Signal in der Epidermis erwartet worden, doch nicht nur das war zu sehen, sondern zusätzlich deckte sich die SMOC-2 Färbung nahezu mit der Cytokeratin-14 Färbung (*Abb. 3.21 A*). Eine Färbung in der Hornschicht tritt häufig unspezifisch auf und konnte für weitere Versuche dadurch reduziert werden, dass ein anderer Sekundärantikörper verwendet wurde, der spezifischer an den Primärantikörper band.

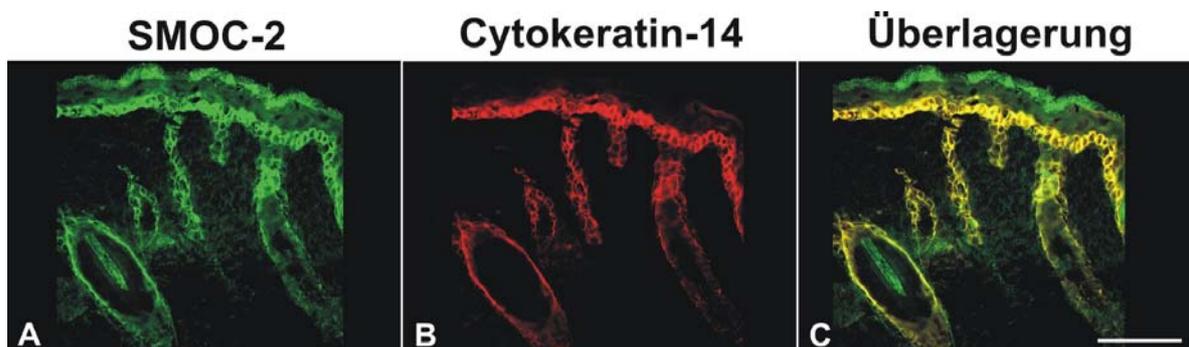


Abb. 3.21: Lokalisierung von SMOC-2 in der Haut adulter Mäuse.

Haut-Gefrierschnitte adulter Mäuse wurden mit Antikörpern gegen SMOC-2 (A) und gegen Cytokeratin-14 (B) gefärbt. In A wurde die Detektion mit einem Alexa488- (grün) markierten Antikörper gegen Meerschweinchen IgG, in B mit einem Cy3- (rot) markierten Antikörper gegen Kaninchen IgG vorgenommen. In A, B und C entspricht der Balken 200 µm. Cytokeratin-14 färbt die basalen Keratinozyten.

Um die Kolo-kalisation von SMOC-2 und Cytokeratin-14 auch biochemisch nachzuweisen, wurde der weiter oben erwähnte Geweblot der Epidermis zusätzlich zu SMOC-2 nun auch auf Cytokeratin-14 getestet. Beide Proteine konnten auch über diese Methode detektiert werden (*Abb. 3.22*). SMOC-2 lief, wie gewohnt, bei 64 kDa, Cytokeratin-14 war auf einer Höhe von 50 kDa nachweisbar.

Damit war nun in zwei unabhängigen Methoden die SMOC-2 Expression in der Epidermis bestätigt worden. Zudem kolo-kalisierte es mit Cytokeratin-14, womit auch die exprimierenden Zellen identifiziert waren - basale Keratinozyten. Diese Zellen sind auch um die Epidermis-Anhänge wie Haarfollikel und Drüsen zu finden, was auch in der Kontrolle mit Cytokeratin-14 sichtbar wurde (*Abb. 3.21 B*).

Da diese Epidermis-Bestandteile jedoch auch weit in die Dermis hineinragen (*Abb. 3.21*), ließ sich die Nachweisbarkeit von SMOC-2 in der Dermis erklären, die im Geweblot der Haut gefunden worden war. Um dies nochmals genauer zu betrachten, wurde ein Bereich der Haut analysiert, in dem kaum Epidermis-Anhänge in der Dermis vorlagen und dort ein Antikörper-Spezifitätstest durchgeführt.

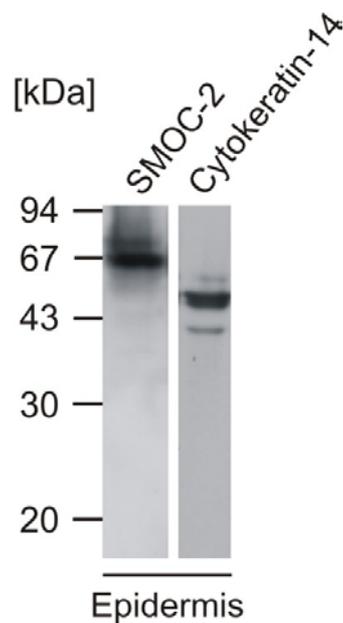


Abb. 3.22: Expression von SMOC-2 und Cytokeratin-14 in der Epidermis.

Nach der Trennung muriner Hautproben wurde das Gewebeeextrakt aus Epidermis in zwei Spuren auf einem 12,5%-igen SDS-Polyacrylamid-Gel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran wurde der Blot geteilt und in Spur 1 die Expression von SMOC-2 mittels Antikörper-Inkubation untersucht, Spur 2 wurde mit einem Antikörper gegen Cytokeratin-14 als Marker für basale Keratinozyten inkubiert.

Im Folgenden wurde der Sekundärantikörper anders gewählt, weshalb die SMOC-2 Färbung nun im Rotkanal liegt, aber eine deutlich schwächere unspezifische Färbung in der Hornschicht und Dermis aufweist als zuvor (*Abb. 3.23 A*). In der Epidermis wird nach wie vor ein starkes, spezifisches SMOC-2 Signal detektiert. Daneben ist zur besseren Orientierung im Gewebe eine Kernfärbung und Überlagerung parallel aufgeführt (*Abb. 3.23 B, C*). Im Spezifitätstest wurde der SMOC-2 Antikörper mit rekombinanten SMOC-2 Protein vorinkubiert, bevor er zur Färbung der Gefrierschnitte eingesetzt wurde. Das Ergebnis war eindeutig, da die spezifische Epidermisfärbung (*Abb. 3.23 A*) nach Vorinkubation mit Protein vollständig verschwunden war (*Abb. 3.23 D*). Der Hintergrund in der Dermis blieb hingegen erhalten und sollte für die nun folgenden Versuche unberücksichtigt bleiben.

SMOC-2 wurde in den basalen Keratinozyten der Epidermis exprimiert, konnte dort also Zelladhäsion beeinflussen. Ob es auch eine Rolle im Verlauf pathologischer Situationen übernahm, war noch unklar. Da aufgrund der Migrationsstudien bereits *in vitro* ein Versuch zur Wundheilung durchgeführt worden war, sollte diese nun auch *in vivo* betrachtet werden. Hinzu kam eine nicht unbedeutende Anzahl von Veröffentlichungen, die das als Rezeptor für SMOC-1 und SMOC-2 EC identifizierte $\alpha\beta 6$ -Integrin im Zusammenhang mit der Wundheilung disuzierten (Häkkinen et al., 2000; Häkkinen et al., 2004).

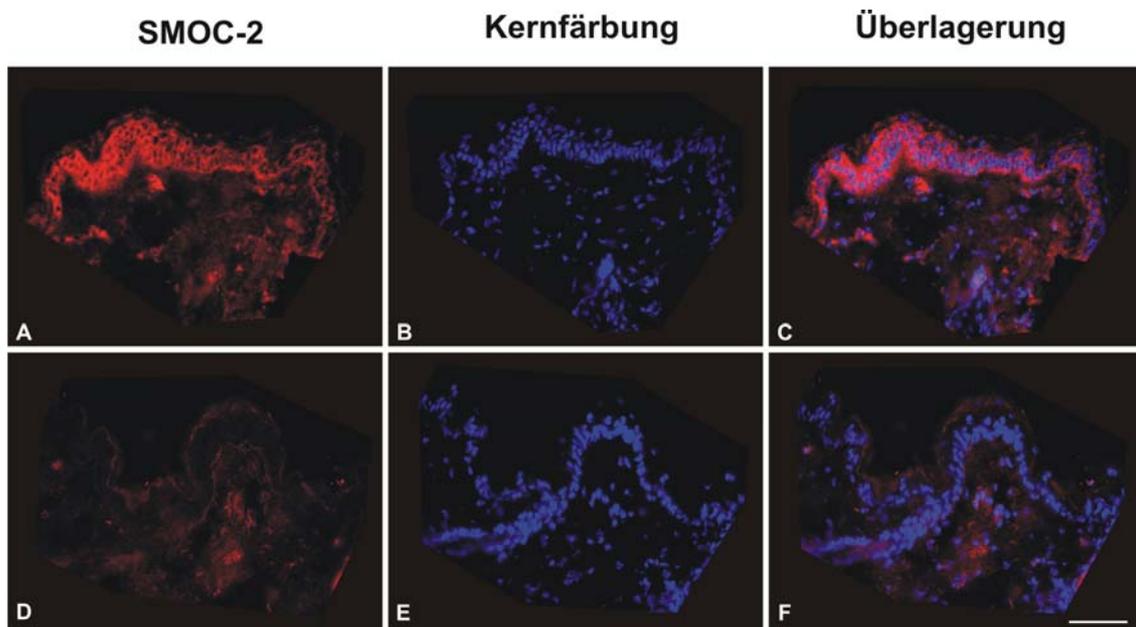


Abb. 3.23: Test auf Spezifität des SMOC-2 Signals in der Haut.

Gefrierschnitte adulter Maus-Haut wurden mit einem Antikörper gegen SMOC-2 gefärbt, der ohne Vorbehandlung (A) eingesetzt wurde oder zuvor mit der zehnfachen Menge an rekombinantem SMOC-2 Protein für 2 h bei RT vorinkubiert worden war (D). In B und E sind jeweils die Kernfärbungen zur besseren Lokalisation des Präparats dargestellt, in C und F die Überlagerung. Der Balken entspricht 200 μm .

3.6.2 SMOC-2 in der Wundheilung und einem Psoriasis-Modell

Die Wundheilung ist ein komplexer Vorgang, der das Zusammenspiel verschiedener Gewebe und Zelltypen voraussetzt. Er lässt sich in mehrere Phasen einteilen, die Migrations- und Proliferationsprozesse beinhalten, aber auch Matrixsynthese, Kontraktion und eine komplette Umverteilung des Integrin-Repertoires (Martin, 1997). Damit ist die Wundheilung ein perfektes Modell zum Test der über die SMOCs neu gewonnenen Erkenntnisse. Die SMOC-2 Expression wurde auf Gefrierschnitten der Wundheilung der Maus im Vergleich zu intakter Maushaut untersucht.

Im Folgenden ist ein Beispiel eines solchen Wundheilungsprozesses dargestellt, wobei auf den entsprechenden Schnitten Unterschiede der SMOC-2 Färbung mit dem bereits eingeführten Marker Cytokeratin-14 verglichen wurden. SMOC-2 wurde in der Epidermis intakter Maushaut exprimiert und kolokalisiert dort mit Cytokeratin-14 in den basalen Keratinozyten (*Abb. 3.24 vor Verwundung*).

Vier Stunden nach der Verwundung war an der Stelle der Stanzung noch nichts zu sehen, da sich in dieser Zeit der Fibrin-Pfropf bildet, der die Wunde nach außen hin zunächst schnell abdichtet, während auf der zellulären Ebene eine Unmenge an Prozessen abläuft. Inflammatorische Zellen, Fibroblasten und neue Gefäße wandern in den Wundbereich ein und bilden ein kontraktiles Granulationsgewebe, das die Wundränder zusammenzieht, während die epidermalen Ränder anfangen zu migrieren, um die Wunde zu schließen. In intakter Haut sind die basalen Keratinozyten mit der Basallamina über Hemidesmosomen verbunden. Die Bindung an Laminin erfolgt in diesem Fall über $\alpha 6\beta 4$ -

Integrin. Im Verlauf der Wundheilung müssen diese hemidesmosomalen Kontakte gelöst werden und die Keratinozyten zunächst proliferieren, dann wandern und abschließend eine neue Matrix ausbilden. Dazu ist auch eine Umverteilung von Integrinen an der Oberfläche der Zellen von Nöten.

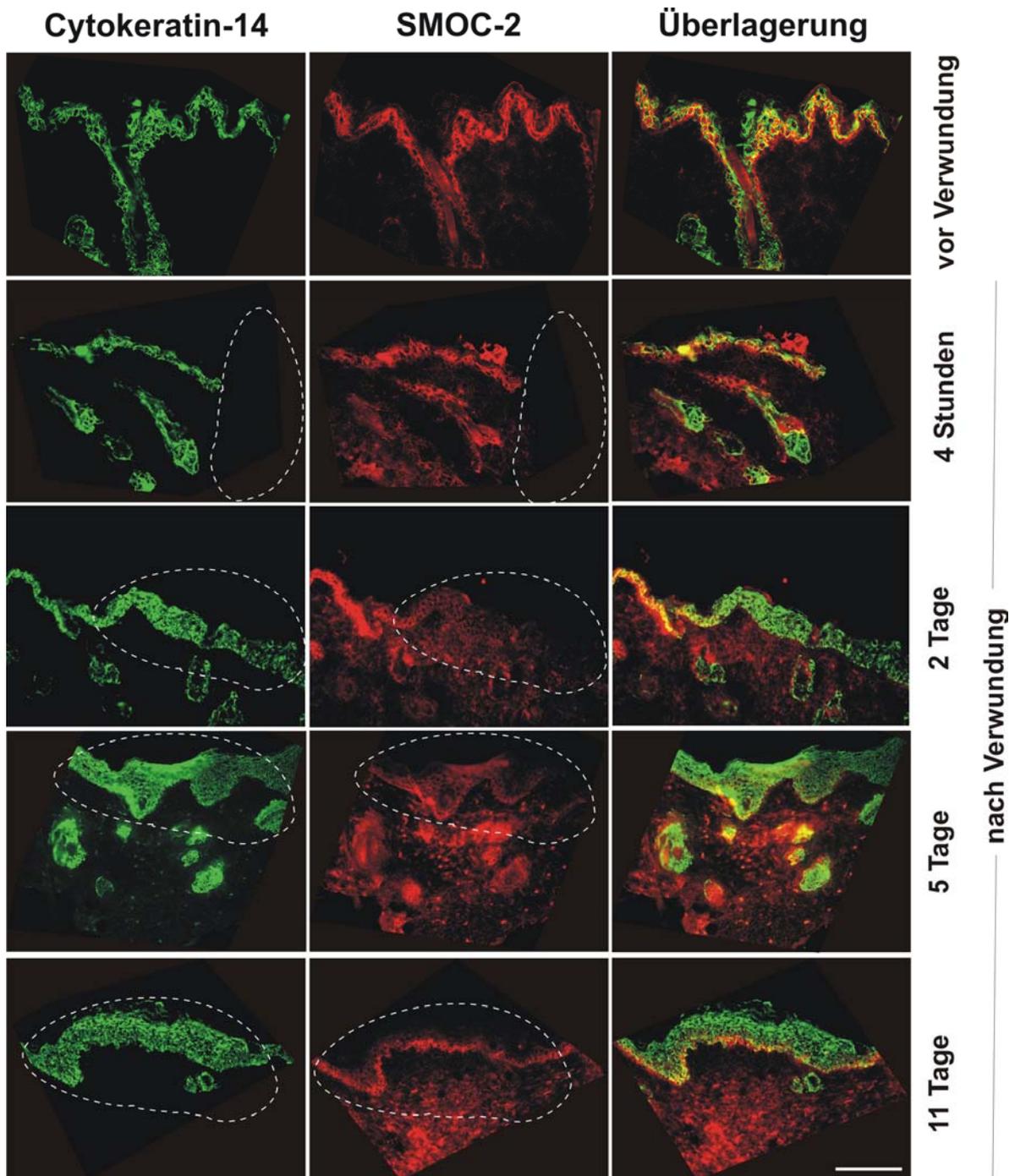


Abb. 3.24: Lokalisierung von SMOC-2 während der Wundheilung.

Die Verteilung von SMOC-2 in der adulten Mauhaut wird für unterschiedliche Zeitpunkte in einem *in vivo* Wundheilungsexperiment gezeigt. Die Hautschnitte wurden dabei vor der Verwundung, vier Stunden nach der Wundsetzung, zwei Tage, fünf Tage und elf Tage später gesammelt. Die gestrichelte Linie markiert den Wundbereich. Es wurde mit Antikörpern gegen Cytokeratin-14 und SMOC-2 gefärbt. Rechts ist die Überlagerung dargestellt, der Balken entspricht 200 μm .

Dass die Wiederherstellung epidermalen Gewebes beginnt, war in den Schnitten nach zwei Tagen zu erkennen. Auffällig war hier vor allem die an der Verbreiterung der Epidermis zu erkennende Hyperproliferation, die in der Cytokeratin-14 Färbung gut zu sehen war. Für SMOC-2 fiel auf, dass dessen Expression zwar in den Wundrändern auftrat, wo noch intakte Epidermis vorlag, jedoch nicht in der neu gebildeten, proliferativen Epidermis. Dies war auch gut in der Überlagerung zu erkennen, wo die Gelbfärbung am Rand dem Grün der nur Cytokeratin-14 positiven Epidermis im Wundbereich wich.

Am Tag fünf nach der Verwundung ist in der Regel der Höhepunkt der Hyperproliferation schon überschritten. Die Epidermis hatte ihren Durchmesser in der Wundregion vervielfacht und zeigte eine breite Cytokeratin-14 Verteilung. Die basalen Keratinozyten proliferierten explosionsartig. Es war keine SMOC-2 Expression zu erkennen, wenn auch an manchen Stellen im basalsten Teil der Epidermis langsam wieder eine Rotfärbung bzw. in der Überlagerung gelbe Ansätze zu erahnen waren. Der hohe Hintergrund in der Dermis ließ sich über die Autofluoreszenz der vielen inflammatorischen Zellen erklären, die zu diesem Zeitpunkt im Wundbereich vagabundierten, um eventuell eingedrungene Krankheitserreger zu eliminieren.

Elf Tage nach Verwundung ist zu erkennen, dass die Hyperproliferation der Epidermis beendet war und sich keine weitere Verdickung derselben mehr abzeichnete. Zwar war die Cytokeratin-14 Färbung immer noch sehr breit angelegt, doch war die Wunde bereits geschlossen und eine Rekonstitution des Normalzustands auf den Weg gebracht mit der nun auch neu beginnenden Bildung der Basallamina. Zu diesem Zeitpunkt wurde auch SMOC-2 ausgehend von der Basalzellschicht wieder exprimiert. Unter der dicken hyperproliferativen Epidermis war eine einschichtige Lage basaler Keratinozyten zu erkennen, die SMOC-2 exprimierten. Nach vierzehn Tagen war die Wunde nicht mehr zu erkennen und der Normalzustand wieder hergestellt.

SMOC-2 wurde also in intakter Epidermis exprimiert, nicht aber während der hyperproliferativen Prozesse der Wundheilung. Um diese Herunterregulierung zu überprüfen, wurde nach anderen pathologischen Situationen gesucht, in denen eine hyperproliferative Epidermis beschrieben ist. Ein in der benachbarten Universitätsklinik generiertes Mausmodell (Pasparakis et al., 2002), bei dem die Tiere einen Psoriasis-Phänotyp aufweisen, schien dafür interessant zu sein.

Die Schuppenflechte ist eine chronische Krankheit der Haut und Gelenke mit erythematöser Plauebildung. Sie wird histologisch charakterisiert durch eine hyperproliferative Epidermis, prominente Blutgefäße und dicke, perivaskuläre lymphatische Infiltrate. Sie zählt zu den Autoimmunerkrankungen (de Rie et al., 2004) und ist durch eine stark beschleunigte Wanderung der Keratinozyten gekennzeichnet. Nachdem Herr Stratis (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ingo Haase, Institut für Dermatologie, Universität zu

Köln) Gefrierschnitte besagter Maushaut zur Verfügung gestellt hatte, konnte diese parallel zu Normalhaut mit Cytokeratin-14 und SMOC-2 gefärbt werden.

Die Cytokeratin-14 Färbung zeigte deutlich, dass die Psoriasis-Maus eine verdickte, also hyperproliferative Epidermis gegenüber der gesunden aufwies (Abb. 3.25 A, D). Für SMOC-2 bestätigten sich die Ergebnisse aus dem Wundheilungsexperiment. Die hyperproliferativen Keratinozyten (Abb. 3.25 E) der Psoriasis-Maus exprimierten im Gegensatz zu den basalen Keratinozyten der Kontrolle (Abb. 3.25 B) kein SMOC-2.

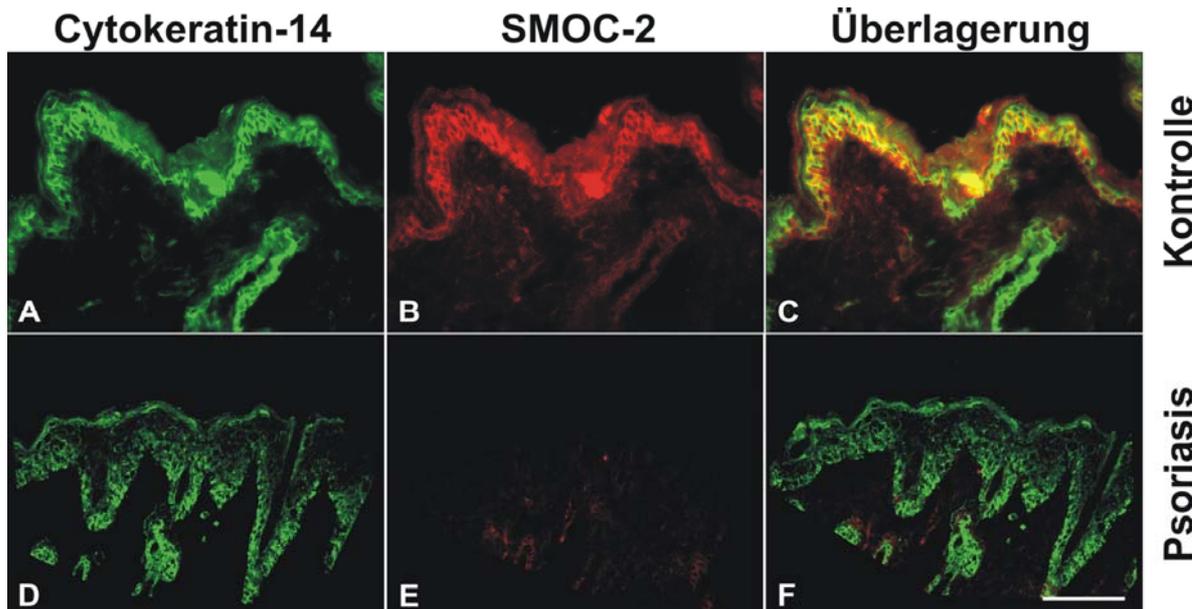


Abb. 3.25: Lokalisierung von SMOC-2 in Normalhaut und im Psoriasis-Modell.

Hautschnitte einer adulten Wildtyp-Maus und einer Psoriasis-Mauslinie wurden mit Antikörpern gegen Cytokeratin-14 (A, D) und SMOC-2 (B, E) gefärbt. Deutlich ist in der Überlagerung (C, F) zu erkennen, dass SMOC-2 im hyperproliferativen Gewebe fehlt. Der Balken entspricht 200 μm .

Die Wundheilungs- und Psoriasischnitte ermöglichten eine klare Veranschaulichung der *in vivo* Funktion von SMOC-2 in der Haut. Um noch weitergehende und umfassendere Aussagen zu SMOC-1 und SMOC-2 machen zu können, wäre es notwendig gewesen, die Proteine im Organismus komplett auszuschalten, da nur für wenige Organe so gute Modellsysteme wie für die Haut existieren, anhand denen alle relevanten Funktionen der SMOCs auf diesem Weg hätten erfasst werden können.

Da sich aber schon frühzeitig abzeichnete, dass die Generierung von Knockout-Mäusen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr zur Analyse eines eventuellen Phänotyps hätte führen können, wurde nach alternativen *in vivo* Systemen gesucht. Dabei weckte das Zebrafisch-Modell besonderes Interesse.

3.7 *In vivo* Studien im Zebrafisch-System

Als Modellsystem wurde der Zebrafisch verwendet, in dem die Expression der SMOCs zunächst festgestellt werden musste, bevor deren Proteintranslation in Form von Morpholino-Studien unterdrückt werden konnte.

3.7.1 Die Klonierung der SMOCs im Zebrafisch

Da das Genom des Zebrafischs noch nicht komplett entschlüsselt ist und auch nicht klar war, wie konserviert die Zebrafisch – und Maussequenzen für die beiden SMOCs sein würden, wurde zunächst über Datenbankrecherche versucht, so viele Informationen wie möglich über die Proteine zu gewinnen. Dies erwies sich als problematisch, da in der Datenbank nur SMOC-2 zu finden war und auch davon nur Teile der Sequenz vorlagen. Für SMOC-1 konnten einzelne Abschnitte nur durch Vergleich mit den bekannten Sequenzen aus anderen Spezies gefunden werden. Dazu kam die Schwierigkeit, dass mit unterschiedlichen Fischstämmen gearbeitet wird und zunächst nicht klar war, ob die Datenbanksequenzen (aus AB-Stamm) mit dem für diese Studie zusätzlich verwendeten Köln-Stamm übereinstimmten.

Aus diesem Grund wurde entschieden, dass SMOC-1 und SMOC-2 aus Zebrafisch zunächst kloniert und durchsequenziert werden mussten. Dazu war eine große Menge an Primern und Primerkombinationen nötig, da zu den bereits erwähnten Widrigkeiten die im Fisch weitverbreiteten Polymorphismen hinzukamen, die eine Bindung der theoretisch bestimmten Primer oft unmöglich machten. Nach Isolation der RNA aller verwendeten Fischstämme, Reverser Transkription und PCR lagen schließlich die Sequenzen vor, so dass auch weitere Fragestellungen angegangen werden konnten.

Hier war nun natürlich auch wieder interessant, ab wann und wo die SMOCs im Zebrafisch exprimiert werden würden. Dazu wurden *in situ* Hybridisierungen durchgeführt.

3.7.2 Expression von SMOC-1 im Zebrafisch

In situ Hybridisierungen von SMOC-2 waren bereits durchgeführt worden (Thisse et al., 2001), weshalb im Folgenden nur die Expression von SMOC-1 auf mRNA-Ebene analysiert wurde. Dazu war es nötig, Sonden herzustellen und sie so zu markieren, dass sie im Gewebe detektierbar waren. Es wurden über unterschiedliche Bereiche von SMOC-1 Sonden kloniert und die effektivste wurde für die folgenden *in situ* Hybridisierungen verwendet (Abb. 3.26). Sie beginnt in der ersten Thyroglobulin-Domäne und beinhaltet zudem die spezifische SMOC-1 Domäne und die zweite Thyroglobulin-ähnliche Domäne.

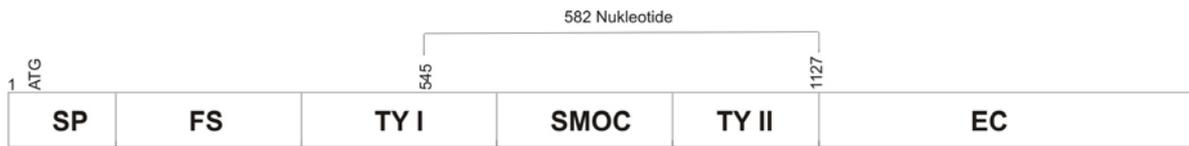


Abb. 3.26: Schematische Darstellung der verwendeten SMOC-1 Sonde.

Die für die *in situ* Hybridisierung von SMOC-1 verwendete Sonde umfasste 582 Nukleotide der ersten Thyroglobulin-, der SMOC-spezifischen und der zweiten Thyroglobulin-Domäne.

Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien wurden gesammelt, so dass eine Kinetik der Expression von SMOC-1 erstellt werden konnte. Diese Embryonen wurden zu den entsprechenden Zeiten fixiert und dechorioniert. Das war notwendig, um die Embryonen für die spätere Färbung zugänglicher zu machen.

Die durchgeführten *in situ* Hybridisierungen wurden von Komplettembryonen angefertigt (*whole mount* Methode). Um die Morphologie der Zebrafische besser zu verstehen, wird neben den Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung das Fotos eines Fisches des Entwicklungsstadiums 24 Stunden nach der Befruchtung (*hours postfertilization*=hpf) dargestellt (Abb. 3.27). 10 hpf ist SMOC-1 zum ersten Mal nachweisbar (Abb. 3.27). Es liegt eine Verteilung im Kopf- und Schwanzbereich und der Epidermis vor, die sich zu diesem Zeitpunkt noch nicht näher definieren ließ.

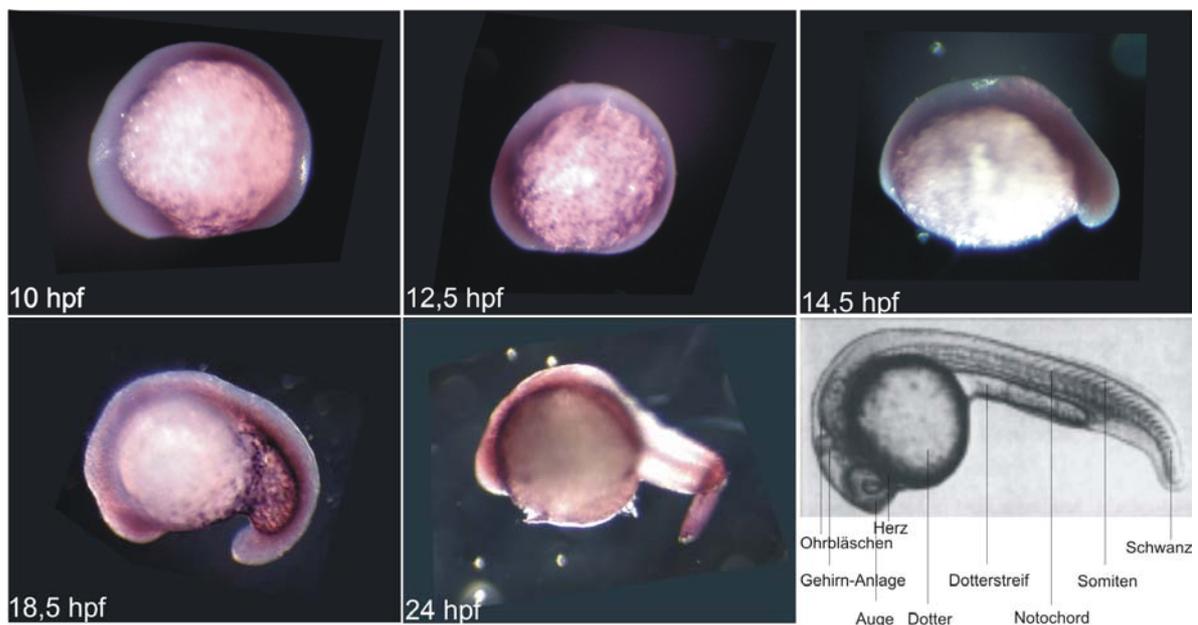


Abb. 3.27: *In situ* Hybridisierung von Zebrafischen mit einer Sonde gegen SMOC-1 und vergleichende Morphologie (nach Nüsslein-Volhard und Dahm, 2002 „Zebrafish“, Appendix 2, Page 220).

Mit Hilfe einer Sonde wurde die SMOC-1 Expression auf unterschiedlich alten Zebrafisch-Embryonen veranschaulicht. Der Kopf ist immer links, der Schwanz rechts lokalisiert. 24 Stunden nach der Befruchtung (hpf) ist parallel ein Zebrafisch dargestellt, in dem die erkennbaren Organe beschriftet sind.

Die Expression blieb auch 12,5 hpf und 14,5 hpf ähnlich (Abb. 3.27), wobei nun deutlicher wurde, dass die laterale Epidermis gefärbt war und SMOC-1 eine sehr breite

Verteilung aufwies. 18,5 hpf (*Abb. 3.27*) wurde das Bild dann etwas klarer und SMOC-1 war eher in der lateralen Epidermis des Schwanzbereichs konzentriert, dort aber in ganz beeindruckendem Ausmaß sowie im Kopfbereich und dort vor allem im Auge. 24 hpf (*Abb. 3.27*) fand sich für SMOC-1 im Kopf eher wieder eine diffuse Verteilung, während das Notochord, die laterale und die Schwanzepidermis deutlichere Signale zeigten. Diese Beobachtungen ergaben zwar noch kein einheitliches Bild und ließen auch auf keine bestimmte Funktion von SMOC-1 schließen, doch war interessant, dass es von sehr frühen embryonalen Stadien an exprimiert wurde und über die Zeit erhalten blieb. Für die Injektion der Morpholinos und damit dem gezielten Ausschalten der Proteinexpression von SMOC-1 und SMOC-2 waren überdies durch die *in situ* Hybridisierung auch schon Vermutungen anstellbar, ab wann morphologische Veränderungen zu erwarten waren.

3.7.3 Morpholino-, *Rescue*- und Überexpressions-Experimente

Nachdem über Dosis-Wirkungs-Tests die effektivste Konzentration der SMOC-Morpholinos bestimmt war, konnten die entsprechenden mRNAs stillgelegt werden. Im Fall von morphologischen Veränderungen des Fisches nach Morpholino-Injektion wurde auch überprüft, ob diese durch *Rescue*-Experimente aufgehoben werden konnten. Dazu wurde synthetisch hergestellte mRNA des Zielgens gleichzeitig mit dem Morpholino injiziert, was eine Produktion des Proteins wieder möglich machte, wodurch sich der Fisch normal entwickeln und keine morphologischen Veränderungen aufweisen sollte. Mit der RNA ließ sich neben dem *Rescue*-Experiment jeweils auch eine Überexpressionsstudie durchführen, die als Kontrolle der Wirksamkeit der RNA herangezogen wurde. Zeigte die RNA Effekte im Überexpressions-Modell, so war sie intakt.

Auch diese Studien werden nur für SMOC-1 gezeigt, da im Verlauf der vorliegenden Arbeit eine Kooperation mit Dr. Przemko Tylzanowski (Abteilung Rheumatologie, Universität Leuven, Belgien) eingegangen wurde, der diese Experimente für SMOC-2 durchführte. Es war also immer ein Vergleich beider Proteine möglich, doch möchte ich im Rahmen dieser Arbeit nur auf eigene Ergebnisse eingehen.

Es wurde im gleichen Experiment entweder SMOC-1 Morpholino oder RNA injiziert und die Embryonen über die Zeit beobachtet. Unterschiede wurden frühestens 10 hpf erwartet, da zu diesem Zeitpunkt die Expression der mRNA erstmals festzustellen gewesen war (*Abb. 3.27*). Der erste Effekt für die Morpholino-injizierten Embryonen war 12 hpf zu sehen (*Abb. 3.28*). Für die mit RNA injizierten Embryonen waren schon vorher morphologische Veränderungen bemerkbar, doch schien es sinnvoll, beide Injektionen im Vergleich zu betrachten. Schon kleinste Unterschiede zwischen injizierten und Kontroll-Embryonen waren zu beachten, um zu analysieren, ob es sich um spezifische Effekte der Injektionen handelte.

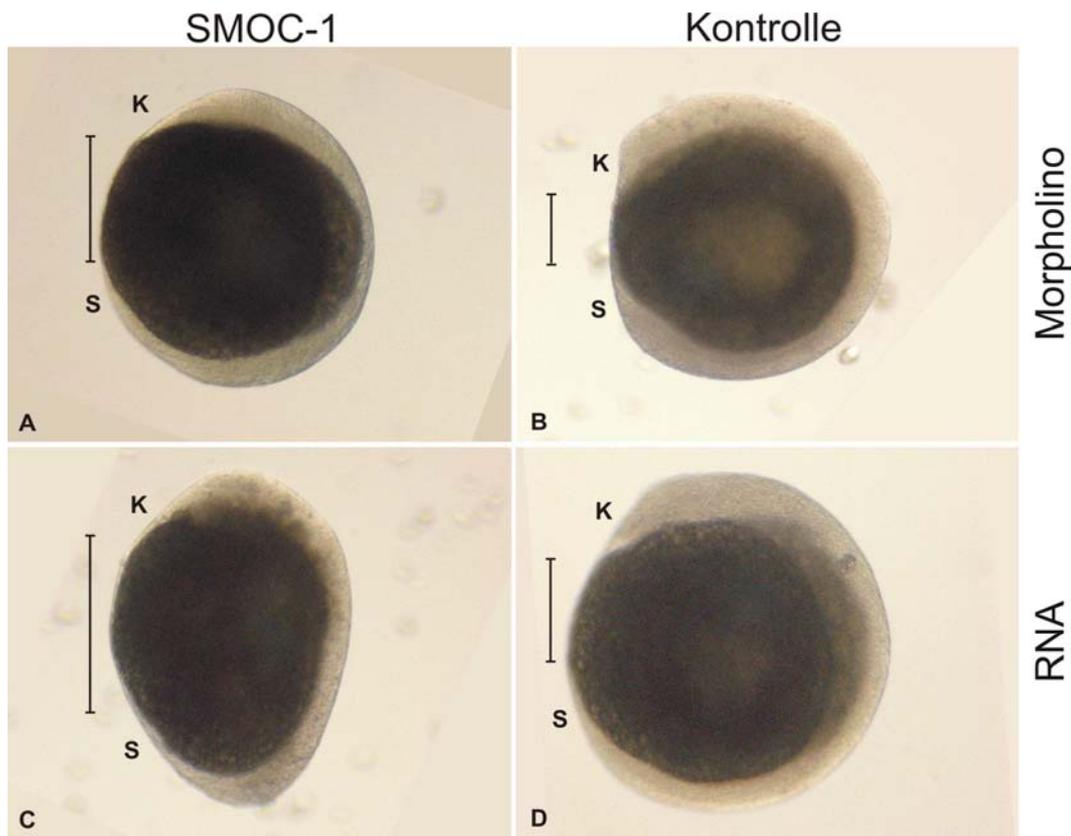


Abb. 3.28: Vergleich der Zebrafisch-Embryonen zum Zeitpunkt der ersten morphologischen Veränderung nach Injektion von SMOC-1 Morpholino bzw. RNA.

Die Embryonen wurden nach Injektion von 2 ng SMOC-1 Morpholino (A) oder 150 pg RNA (C) beobachtet und zum Zeitpunkt 12 hpf wurde der erste Unterschied festgestellt. Dieser ist hier im Vergleich mit Kontroll-Embryonen (B, D) gezeigt. K steht für Kopf, S für Schwanz; der Kopf-Schwanz-Abstand ist jeweils eingezeichnet.

In dem mit SMOC-1 Morpholino injiziertem Embryo (*Abb. 3.28 A*) war im Vergleich zum dargestellten Kontroll-Embryo (*Abb. 3.28 B*) der Abstand zwischen Kopf und Schwanz um das 1,7 fache größer. Die beiden Strukturen waren schwerer voneinander zu unterscheiden, da der Kopf deutlich abgeflacht war und nicht wie im Kontroll-Embryo hervortrat. Da die SMOC-1 RNA deutlich dramatischere Veränderungen der Morphologie des Embryos hervorrief als der Morpholino, war sie intakt und wurde nicht abgebaut. Der Embryo war gestreckt bzw. eiförmig und Kopf und Schwanz waren nicht mehr wirklich als solche erkennbar (*Abb. 3.28 C*).

Nachdem klar war, dass 12 hpf die Morpholino-Injektion erste morphologische Veränderungen im Fisch hervorrief, wurde nun zu späteren Zeitpunkten untersucht, ob diese sich im Fall der Morpholino-injizierten Fische manifestierten bzw. im Fall der Koinjektion mit RNA aufzuheben waren.

22 hpf sehen Fische normalerweise aus wie die dargestellten Kontrolltiere (*Abb. 3.29 A, B*). Wurde SMOC-1 RNA injiziert, traten Überexpressions-Effekte auf (*Abb. 3.29 C, D*), die ganz unterschiedlich sein konnten. 30% der Embryonen waren völlig

verkümmert, so dass der Habitus gar nicht mehr erkennbar war, 10% zeigten Auffälligkeiten wie einen stark verkürzten und gekrümmten Schwanz (*Abb. 3.29 C*), einen kleinen oder gar nicht mehr vorhandenen Dotterstreif oder ein stark deformiertes Notochord (*Abb. 3.29 D*).

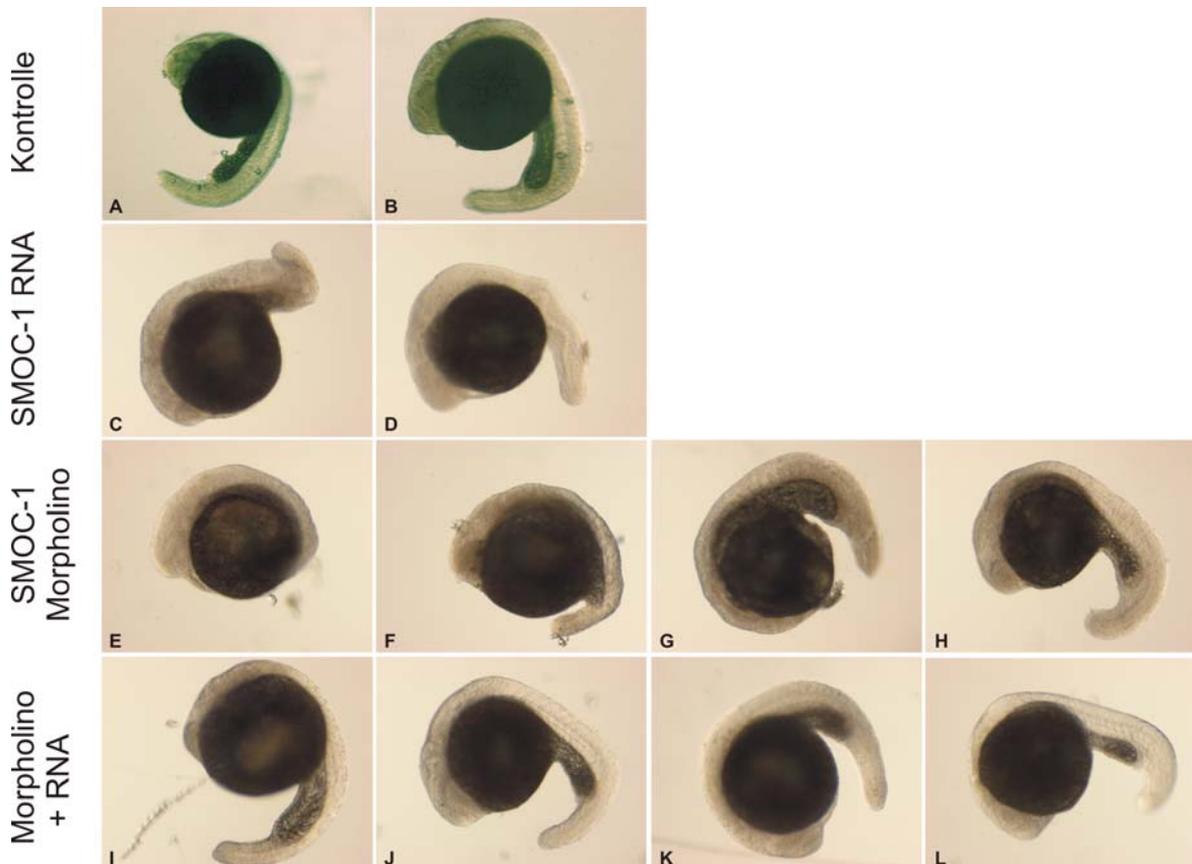


Abb. 3.29: Morphologische Ausprägungen 22 hpf nach Injektion von SMOC-1 RNA, Morpholino oder beidem.

Die Kontroll-Embryonen (A, B) oder solche die mit 150 pg SMOC-1 RNA (C, D), 2 ng SMOC-1 Morpholino (E, F, G, H) oder 2 ng Morpholino plus 1 pg (I, J), 2 pg (K) oder 10 pg (L) SMOC-1 RNA injiziert worden waren, wurden 22 Stunden nach der Befruchtung fotografiert. Die Unterschiede sind deutlich zu erkennen.

Solch gravierende Veränderungen waren teilweise auch bei den mit SMOC-1 Morpholino injizierten Fischen zu finden (*Abb. 3.29 E und F*). Während insgesamt ca. 50% der Fische einen Phänotyp aufwiesen, gab es graduelle Abstufungen in der Schwere der Effekte. Um einen Überblick über die morphologische Bandbreite zu bekommen, sind auch weniger auffällige Ausprägungen dargestellt (*Abb. 3.29 G und H*). Der Schwanzbereich konnte völlig fehlen (*Abb. 3.29 E*), es konnten aber auch Ähnlichkeiten zu den mit RNA-injizierten Fischen mit verkürztem Dotterstreif, abgeknicktem und unzureichend entwickeltem Schwanz festgestellt werden (*Abb. 3.29 F und C*). Manche Fische waren nur bei genauem Betrachten als betroffen einzustufen (*Abb. 3.29 G und H*), weil der Kopf abgeflacht oder unterentwickelt und der Schwanzbereich verkürzt und

verdickt war. Es gab auch Fische, die so schwache morphologische Ausprägungen in Folge der Morpholino Injektion aufwiesen, meist ebenfalls im Bereich des Dotterstreifs und Schwanzes, dass nur bei einem Vergleich mit den Kontrolltieren Unregelmäßigkeiten sichtbar wurden, so z.B. eine leichte Stauchung des gesamten Tiers (*Abb. 3.29 H*).

Wurden Morpholino und RNA koinjiziert, so lässt sich für alle getesteten RNA-Konzentrationen einleitend sagen, dass die Embryonen 22 hpf in ca. 90% der Fälle völlig normal aussahen. Bei Injektion einer Dosis von 5 ng/μl (10 pg) RNA ähnelte der Fisch (*Abb. 3.29 L*) jedoch dem mit SMOC-1 Morpholino injizierten Fisch im Bereich des kürzeren Dotterstreifs und Schwanzes (*Abb. 3.29 H*). Dies deutet darauf hin, dass hier nicht mit der optimalen RNA-Konzentration für ein solches Experiment gearbeitet wurde. Entweder war diese zu niedrig, so dass Morpholino-Effekte durchkamen oder aber sie war zu hoch, so dass sich schon Überexpressions-Effekte manifestieren konnten. Für die niedriger dosierte RNA (*Abb. 3.29 I, J, K*) entsprach die Morphologie der Fische eher den Kontrolltieren. Der Dotterstreif und der Schwanz waren trotz des parallel injizierten Morpholinos normal lang (*Abb. 3.29 I*), der Kopf war gut entwickelt (*Abb. 3.29 J*) und ein schlechterer *Rescue* lag nur beim Einsatz von zu viel RNA (*Abb. 3.29 K*) vor.

3.7.4 Funktion der SMOCs im Zebrafisch

Da alle bisherigen Resultate zwar Effekte und einen Einfluss von SMOC-1 in der Entwicklung des Zebrafischs postulieren ließen und somit auch spätere Entwicklungsstadien interessant waren, wurden die Fische unter Beobachtung weiter gehalten. Experimente mit Beteiligung von RNA waren zu späteren Zeitpunkten allerdings nicht durchführbar, da diese abgebaut wird, doch konnten Morpholino-Effekte bis zu einem Zeitpunkt von 72 hpf verfolgt werden. Danach hatten sich theoretisch auch die Morpholinos soweit verdünnt, dass keine verlässlichen Aussagen mehr möglich waren. Dieser Ansatz wurde nun wieder für beide SMOCs verfolgt.

Die Kontrollen in Form von nichtinjizierten Embryonen (*Abb. 3.30 A-C*) sowie Embryonen, die mit einem *Mismatch*-Morpholino injiziert worden waren (*Abb. 3.30 D-F*) zeigten weder 24 noch 48 oder 72 hpf Abnormalitäten. Sie entwickelten sich wie in der Literatur beschrieben (Kimmel et al., 1995) und es fielen auch keine Unterschiede auf zwischen nichtinjizierten Embryonen und denen, die mit einem *Mismatch*-Morpholino injiziert worden waren. Dem *Mismatch* liegt die gleiche Sequenz wie dem dazugehörigen Morpholino zugrunde, doch sind fünf Basen ausgetauscht, so dass der Morpholino nicht mehr an die Ziel-RNA binden und die Translation unterdrücken kann, weshalb sich die Fische unauffällig entwickeln sollten.

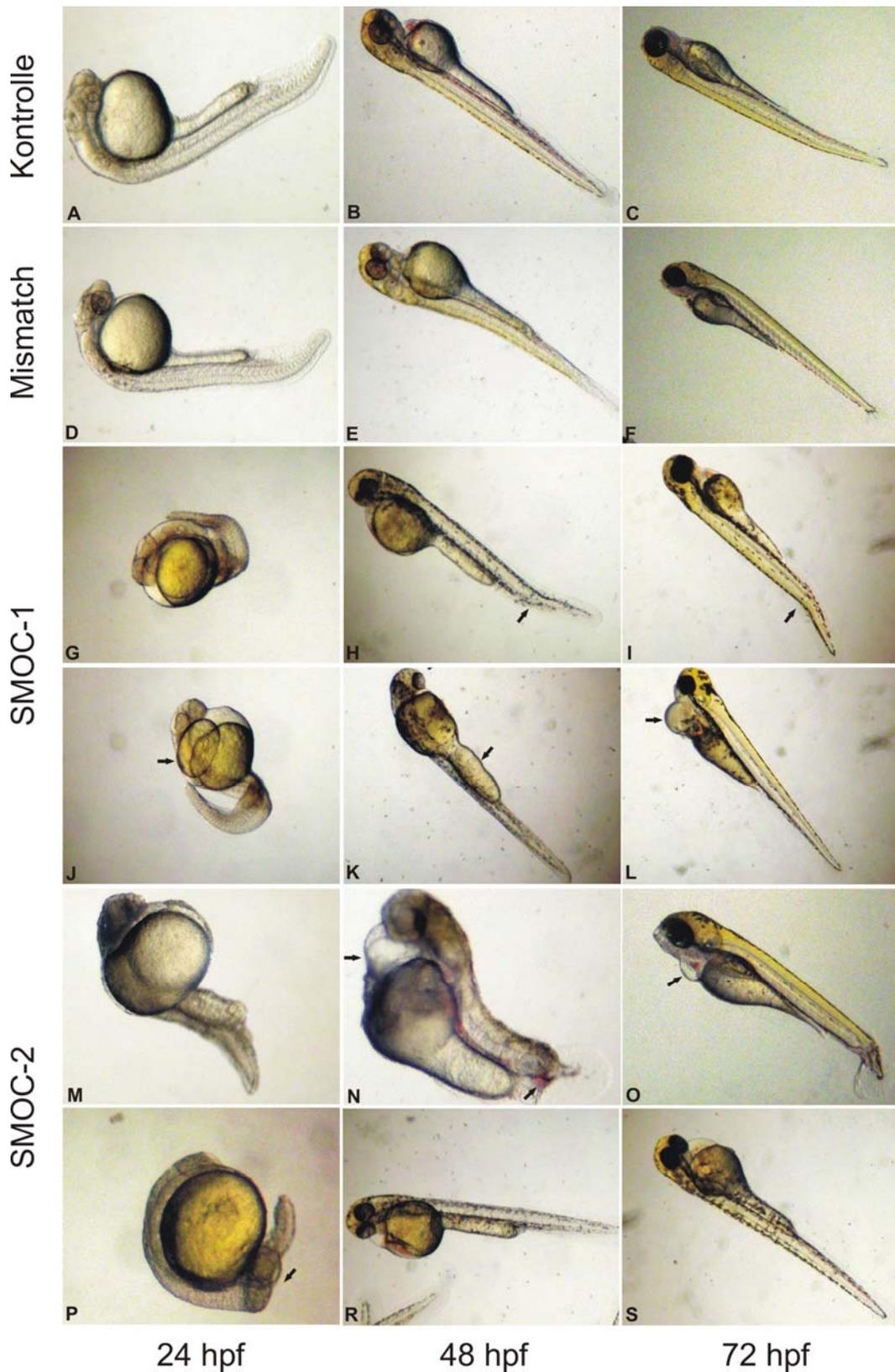


Abb. 3.30: Morphologie der Kontroll-Embryonen und der mit SMOC-1 oder SMOC-2 Morpholinos injizierten Embryonen 24, 48 und 72 Stunden nach der Befruchtung.

Die nichtinjizierten Embryonen (A-C) oder solche, die mit 2 ng eines 5 Basen-Austausch- (D-F), eines SMOC-1 (G-L) oder eines SMOC-2 Morpholinos (M-S) injiziert worden waren, wurden 24, 48 und 72 Stunden nach der Befruchtung fotografiert. Morphologische Auffälligkeiten wurden durch Pfeile markiert.

Die Morpholinos für die beiden SMOCs riefen deutliche Effekte hervor (*Abb. 3.30 G-S*). Für beide SMOCs war, wie bereits für frühere Entwicklungsstadien besprochen, ungefähr die Hälfte der Embryonen von der Morpholino-Injektion so betroffen, dass morphologische Veränderungen deutlich wurden. Es lagen wieder Auffälligkeiten im Schwanzbereich vor, und zwar für SMOC-1 (*Abb. 3.30 H, I*) wie für SMOC-2 (*Abb. 3.30 M, N, O*). Die Schwänze waren verkürzt und gekrümmt, wohingegen die Köpfe recht normal entwickelt aussahen. Allerdings war wieder auf ein recht breites Spektrum der Ausprägungen hinzuweisen. So waren für SMOC-1 (*Abb. 3.30 G*) und für SMOC-2 (*Abb. 3.30 P*) starke Krümmungen des Schwanzes zu notieren. Des Weiteren waren an vielen Stellen Blutstauungen festzustellen (*Abb. 3.30 I und N*).

Ein neuer Effekt, der zu späteren Stadien deutlicher auftrat, war eine augenscheinliche Aufblähung oberhalb des Dottersacks, manchmal als Blase zu erkennen (*Abb. 3.30 J*). Dieser Effekt galt ebenfalls nicht nur für SMOC-1, sondern auch für SMOC-2 (*Abb. 3.30 N*). Hier war die Struktur besser zu lokalisieren und definierbar. Es schien sich um ein perikardiales Ödem zu handeln, das den Fisch offensichtlich beeinträchtigte. Zudem sind in diesem Bild auch wieder der verkürzte und gekrümmte Schwanz und Blutinseln im Schwanz und den an den Dottersack angrenzenden lateralen Epidermisbereichen zu erkennen. Auch der in den früheren Entwicklungsstadien häufig angesprochene veränderte Dotterstreif trat wieder auf (*Abb. 3.30 K*).

Die verschiedenen Beispiele der morphologischen Veränderungen nach Morpholino Injektion wiederholten sich für beide SMOCs. Auch 72 hpf sahen die Fische ähnlich aus und zeigten weitestgehend die bereits beschriebenen Auffälligkeiten. So lag ein abgeknickter Schwanz vor für SMOC-1 (*Abb. 3.30 I*) wie auch für SMOC-2 (*Abb. 3.30 O*). In diesem Bild wies der Fisch allerdings insgesamt einen abnormalen Habitus auf, der gestaucht und verdickt erschien. Das Ödem im perikardialen Bereich war deutlich kleiner, aber definitiv vorhanden. Das Innere der Fische war in den älteren Stadien nicht mehr so gut zu erkennen, da die Transparenz aufgrund der zunehmenden Pigmentierung der Tiere abgenommen hatte.

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse stellte sich nun auch die Frage, ob durch Koinjektion beider SMOC-Morpholinos eine Verstärkung der morphologischen Abnormalitäten zu beobachten sein würde. Tatsächlich stieg die Penetranz um 25% an (*Abb. 3.32*). Das gab schon einen ersten Hinweis darauf, dass es zu einer Verstärkung der morphologischen Veränderungen kam, wenn im Organismus beide SMOC-Proteine nicht hergestellt werden konnten. Sie schienen also ähnliche Aufgaben zu übernehmen. Da häufig und für beide SMOCs Ödembildung auftrat, wurde eine Möglichkeit gesucht, wie man experimentell feststellen konnte, worauf diese morphologische Veränderung zurückzuführen war.

Die Ödembildung kann mehrere Ursachen haben, weist aber vor allem auf Schäden an Herz, Niere oder Haut hin, da es zu vermehrten Wassereinlagerungen nur dann kommt, wenn diese Organe fehlerhaft oder überhaupt nicht arbeiten. Interessant war, dass nun im Vergleich zu den Mausdaten Parallelen auftauchten. Gerade in diesen Organen wird in der Maus zumindest SMOC-2 exprimiert. Fehlt es, werden zunächst natürlich an diesen Orten Effekte zu bemerken sein. Da zu den frühesten Zeitpunkten, zu denen die Ödembildung auftrat, in den beobachteten Fischen bereits Herzaktivität festzustellen war und der Pronephros noch nicht funktionsfähig war, konnten diese beiden Organe ausgeschlossen werden und es lag nahe, in einem Experiment zunächst die Funktionalität der Haut zu untersuchen.

Dazu wurden die Eier nach Injektion zum einen in normalem Medium, zum anderen in Medium mit 250 mM Mannitol gehalten, um eine isoosmotische Umgebung zu schaffen (Hill et al., 2004). Auffälligerweise sank die Penetranz im Mannitol für die Doppelinjektion wieder und war nur leicht höher als für die Einzelinjektionen (*Abb. 3.32*). Der Anstieg, der bei den mit beiden SMOC-Morpholinos injizierten Embryonen festzustellen war, die in normalem Medium gehalten wurden, blieb aus. Ein Teil der Probleme schien also nicht mehr aufzutreten, wenn die Tiere in isoosmotischem Milieu aufgezogen wurden, also bestimmte Organfunktionen ersetzt wurden.

24 hpf waren zunächst sehr ähnliche Ausprägungen der Embryonen in Medium ohne (*Abb. 3.31 A, D*) oder mit Mannitol (*Abb. 3.31 G, J*) festzustellen, doch war die Schwere der Veränderungen in den zwei Beispielen deutlich dramatischer, als wenn die SMOCs einzeln injiziert worden waren (*Abb. 3.30 G, J, M, P*). So waren die Embryonen völlig verkrüppelt (*Abb. 3.31 D und J*) oder trugen zumindest schwere Missbildungen, besonders wieder im Schwanzbereich (*Abb. 3.31 A und G*).

Diese Ausprägung war auch 48 hpf feststellbar, doch bildeten die im isoosmotischen Medium gehaltenen Fische (*Abb. 3.31 H, K*) keine Ödeme, während die anderen (*Abb. 3.31 B, E*) wieder starke perikardiale Wassereinlagerungen und zudem auch Blutstauung direkt unterhalb des Ödems oder im Schwanzbereich zeigten. Diese Tatsache gab einen deutlichen Hinweis darauf, dass die Haut der mit SMOC-Morpholinos injizierten Fische keine ausreichende Barriere gegen einströmendes Wasser bilden konnte.

Auch in den 72 hpf aufgenommenen Embryonen wiesen erneut nur die in normalem Medium gehaltenen Fische (*Abb. 3.31 C, F*) riesige Perikardvergrößerungen aufgrund von Wassereinlagerung auf. Die Behinderung für den Fisch wird in der Vergrößerung besonders deutlich und die Blutansammlung am Boden des Ödems gut sichtbar (*Abb. 3.31 F*). Dagegen hatten die im isoosmotischen Medium aufgezogenen Fische (*Abb. 3.31 I, L*) keine Ödeme, wiesen aber immer noch die anderen morphologischen Veränderungen auf, die beschrieben wurden: einen gekrümmten

Schwanz, veränderten Dotterstreif, Blutstauungen oder einen insgesamt gestauchten Habitus.

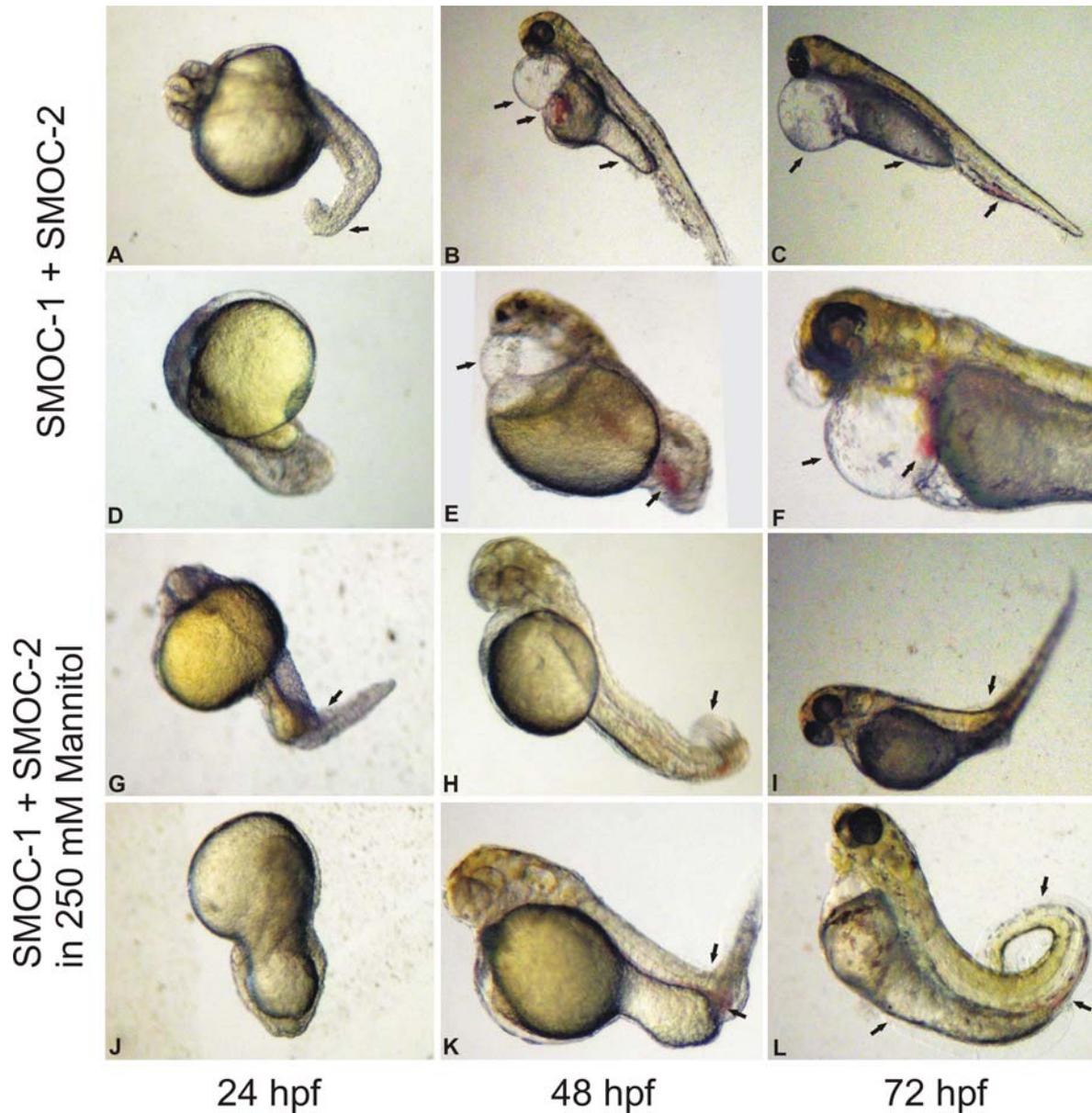


Abb. 3.31: Morphologie der mit beiden SMOC-Morpholinos injizierten Embryonen 24, 48 und 72 Stunden nach der Befruchtung.

Die mit 2 ng SMOC-1 und SMOC-2 Morpholinos injizierten Embryonen wurden in normalem Medium (A-F) oder in Medium mit 250 mM Mannitol gehalten (G-L) und wurden 24, 48 und 72 Stunden nach der Befruchtung fotografiert. Morphologische Auffälligkeiten wurden durch Pfeile markiert.

Abschließend werden alle besprochenen Morpholino-Injektionen statistisch zusammenfasst (Abb. 3.32). Die Penetranz lag in den Kontrollen erwartungsgemäß bei 0%, während von den *Mismatch*-injizierten Embryonen 14% morphologische Veränderungen aufwiesen. Diese sind daher als Fehler auch bei den Morpholino-injizierten Embryonen zu berücksichtigen, bei denen für SMOC-1 und SMOC-2 die gleiche Penetranz von 46% vorlag. Diese stieg um das 1,5 fache an, wenn beide Morpholinos gleichzeitig

injiziert wurden, ging aber wieder zurück, wenn die Embryonen in isoosmotischer Umgebung gehalten wurden, also Funktionen der Haut übernommen wurden.

	Penetranz in %
Kontrolle	0
Mismatch	14
SMOC-1	46
SMOC-2	46
SMOC-1 + SMOC-2	71
SMOC-1 + SMOC-2 mit 250 mM Mannitol	51

Abb. 3.32: Übersicht über die Penetranz der verschiedenen Injektionen.

Die Penetranz, die Häufigkeit, mit der manipulierte Tiere einen Phänotyp aufweisen, wurde in allen Experimenten durch Auszählen der Fische mit normaler und veränderter Morphologie bestimmt, wobei die Gesamtzahl immer ≥ 100 Tiere umfaßte. In der Tabelle sind repräsentativ die Prozentangaben der Penetranz der einzelnen Injektionen zusammengefasst.

Aus der Vielzahl der morphologischen Veränderungen im Fisch kann geschlossen werden, dass die SMOCs vielfältige Funktionen im Organismus übernehmen, die bisher noch nicht genau geklärt werden konnten. Offensichtlich sind sie aber für eine intakte Haut mitverantwortlich. Diese kann, wenn die SMOCs nicht mehr exprimiert werden, ihre Barriereaufgabe nicht ausreichend wahrnehmen, so dass es zur Bildung von Ödemen kommt. Da sowohl aus den *in situ* Daten die Expression der SMOCs in der Epidermis als auch aus den Experimenten mit Maus-Haut eine Involvierung von SMOC-2 in deren Funktion gezeigt werden konnte, war es für dieses System möglich, von den *in vitro* Studien bis hin zum Effekt im lebenden Organismus die Rolle der SMOCs zu beschreiben.

4 Diskussion

4.1 Neue rekombinante SMOC Proteine und ihre Aufreinigung

SMOC-1 und SMOC-2 sind als Mitglieder der BM-40 Familie extrazellulärer Matrixproteine beschrieben (Vannahme et al., 2002; Vannahme et al., 2003), doch war ihre Funktion zu Beginn dieser Arbeit noch weitgehend unbekannt. Während für SMOC-1 bereits erste Studien zur Gewebsverteilung vorlagen (Vannahme et al., 2002), war die Lokalisation von SMOC-2 noch völlig unklar. Ihre Ähnlichkeit zu BM-40/SPARC/Osteonectin (Lane und Sage, 1994; Maurer et al., 1995) sowohl im modularen Aufbau als auch in der Funktionalität der Calcium-Bindung verlangte aber nach einer detaillierteren Analyse der Expression und Funktion der beiden neuen Familienmitglieder, da gerade über BM-40 mittlerweile durch eine große Zahl von Veröffentlichungen die Beteiligung an vielen zellulären Prozessen wie Proliferation, Adhäsion, Angiogenese, Wachstumsfaktor- und Cytokinwechselwirkungen, Um- und Neubildungsprozessen bekannt ist und damit auch der Einfluss auf pathologische Situationen und Entwicklungsvorgänge.

Strukturell teilen sich die SMOCs und BM-40 eine Follistatin-ähnliche und eine extrazelluläre Calcium-bindende Domäne mit zwei EF-Hand-Motiven. Doch sind die beiden Domänen in den SMOCs im Gegensatz zu den anderen beschriebenen Familienmitgliedern wie SC1/Hevin/QR1, TSC-36/FRP/Flik/Fstl-1, den Testicanen oder ECIGs/Fstl-4, -5 nicht direkt benachbart, sondern durch zwei Thyroglobulin-ähnliche Domänen getrennt. Diese werden ihrerseits von einer spezifischen SMOC-Domäne separiert. Welche Aufgaben die SMOCs übernehmen, sollte über eine Analyse der verschiedenen Domänen untersucht werden.

Aus diesem Grund wurden neben den Konstrukten, die die kompletten Proteine codierten, auch kürzere Konstrukte kloniert, die die einzelnen Domänen unterschiedlich kombinierten (*Abb. 3.1*). Dieser Schritt war, wie sich schon bei der Aufreinigung zeigte, sinnvoll, da die Gesamtproteine von den transfizierten Zellen nur in geringen Mengen produziert wurden. SMOC-2 wurde zudem von beiden verwendeten Zelllinien – EBNA-293 und HT1080 - in hohem Maß abgebaut, wobei EBNA-293 Zellen eine größere Menge des Proteins produzierten und so trotz der Degradation noch intaktes SMOC-2 vorlag. Insgesamt war die Aufreinigung der beiden Proteine deutlich aufwendiger als die der

anderen Familienmitglieder, vor allem weil sie bei jedweder Art der Lagerung sehr instabil waren und auch nicht weggefroren werden konnten, da sie beim Auftauen präzipitierten.

Erst mit dem SMOC-2 Proteinfragment, das nur die Follistatin-ähnliche, die beiden Thyroglobulin-ähnlichen und die spezifische SMOC-Domäne enthielt (FTST), konnte eine Aufreinigungsstrategie etabliert werden, die ausreichende Mengen an Protein lieferte, um damit weitergehende Studien durchführen zu können (*Abb. 3.3*). Auch die Wahl der *Tags* zur Aufreinigung konnte damit getroffen werden. Der bisher verwendete N-terminale *His-Myc-Tag* wurde aufgrund seiner Größe nicht mehr verwendet, da dieser eventuell die Faltung der Proteine beeinflusste. Der neu eingeführte C-terminale *Streptavidin-Tag* brachte nicht den gewünschten Erfolg bei der Aufreinigung und so wurden alle weiteren Konstrukte in einen Vektor mit N-terminalem *Octahistidin-Tag* und anschließender Thrombinschnittstelle kloniert und darüber aufgereinigt (*Abb. 3.2*).

Mit dieser Lösung konnte der *Tag* nach der Aufreinigung auch entfernt werden und ging nicht mehr störend in weitere Experimente, wie z.B. die Immunisierung von Tieren zur Antikörper-Produktion, ein. Die Aufreinigung erfolgte über einen Puffer mit 2 M Harnstoff, 50 mM Tris, pH 8, da hiermit die Proteine in Lösung gehalten werden konnten, die beste Wechselwirkung mit der Säule zeigten und zumindest für die Proteinfragmente ohne die EC-Domäne auch einigermaßen stabil bei 4°C gelagert werden konnten. Eine Harnstoff-Konzentration von 2 M wirkt noch nicht denaturierend. Um jeweils die Gesamtproteine in den Versuchen repräsentieren zu können, wurden die FTST- und EC-Fragmente für SMOC-1 und SMOC-2 aufgereinigt und eingesetzt (*Abb. 3.5*). Die EC-Fragmente waren allerdings deutlich schwieriger zu handhaben, weshalb diese Domäne für die Probleme bei der Aufreinigung und Lagerung auch im Fall der sie beinhaltenden Proteine verantwortlich gemacht werden kann. Das gab allerdings auch schon einen Hinweis darauf, dass sie wohl stark an der Bindung an die Matrix beteiligt sein würden.

Für SMOC-1 war die Bindung an andere extrazelluläre Matrixproteine bzw. an Basalmembranproteine für das Kompletprotein bereits gezeigt worden. In Protein-Protein-Interaktionsstudien waren Laminin-1, Nidogen-1 und Perlecan (Fragment IV-1) als Bindungspartner nachgewiesen worden (Heep, 2005) und im Verlauf dieser Arbeit wurde auch eine starke Bindung von SMOC-2 an Laminin nachgewiesen (*nicht gezeigte Ergebnisse*). Das bedeutet, dass dort, wo SMOC-2 eine Basalmembranverteilung aufweist, aller Wahrscheinlichkeit nach Laminin den Bindungspartner darstellt. Um diese Wechselwirkungen nicht nur *in vitro*, sondern auch direkt im Gewebe zeigen zu können, wurde ein spezifischer SMOC-2 Antikörper benötigt.

4.2 SMOC-2 Antikörper und Lokalisation des Proteins

Mit den neu hergestellten Proteinen war es möglich, ein bereits vorliegendes Antiserum gegen SMOC-2 einer Affinitätsreinigung zu unterziehen. Diese verlief erfolgreich, wie ein Spezifitätstest zeigte, bei dem der Antikörper vor der eigentlichen Verwendung mit SMOC-2 Protein vorinkubiert wurde und danach das Protein nicht mehr detektieren konnte, da er spezifisch blockiert war (*Abb. 3.6 A*). Auch lagen keine Kreuzreaktivitäten gegenüber anderen BM-40 Familienmitgliedern mehr vor (*Abb. 3.6 B*).

Mit dem SMOC-2 FTST Protein wurden auch neue Immunisierungen durchgeführt. Neben einem Kaninchen und einem Huhn injizierte die Firma Pineda weiterhin zwei Schafe und zwei Hühner zur Herstellung von Peptid-Antikörpern gegen SMOC-2. Die zwei sequenzierten Peptide sollten theoretisch eine hohe Immunogenität erzeugen, waren 15 Aminosäuren lang und lagen in der zweiten Thyroglobulin- bzw. der EC-Domäne. Alle erhaltenen Seren zeigten allerdings schwächere Reaktivität gegen SMOC-2 und höhere Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen der BM-40 Familie als der affinitätsgereinigte Meerschweinchen-Antikörper. Die Ergebnisse zeigten, dass SMOC-2 ein sehr schwach immunogenes Protein war.

Seine Verteilung in der Maus wurde auf Gefrierschnitten einzelner Organe untersucht. Es ergab sich, wie aus den mRNA-Daten bereits zu erwarten gewesen war (Vannahme et al., 2003), eine sehr breite Verteilung von SMOC-2 in der adulten Maus. Herz, Thymus, Milz, Lunge, Niere und Ovar exprimierten deutlich SMOC-2 (*Abb. 3.7*). Die Färbung beschränkte sich dabei allerdings im Gegensatz zu SMOC-1 nicht auf Basalmembranen (Vannahme et al., 2002), sondern ging darüber hinaus.

Auch ein Vergleich mit BM-40 war möglich, das ebenfalls in Thymus und Lunge, aber auch Nebenhodenepithel (Sage et al., 1989) und Epithelien mit hohen Umsatzraten wie Darm, Haut oder Drüsengewebe (Sage et al., 1989) exprimiert wurde. SMOC-2 war ebenso an epithelialen Strukturen zu finden und lag häufig an Grenzflächen wie Kapseln vor. Im Muskelgewebe war es diffus exprimiert, im Auge oder Gehirn war es allerdings im Gegensatz zu BM-40 (Purcell et al., 1993), SC1 (Guermah et al., 1991; McKinnon und Margolskee, 1996) und Testican-1 (Charbonnier et al., 1997) überhaupt nicht nachweisbar. Vor allem die Tatsache, dass es keine reine Basalmembran-Lokalisation aufwies und an epithelialen wie endothelialen Strukturen vorkam, warf die Frage nach seiner Rolle in der Embryonalentwicklung auf.

Die Expression von SMOC-2 wurde auf Gefrierschnitten sämtlicher Embryonaltage bestimmt. Um direkt einen Vergleich mit einem Basalmembranprotein anstellen zu können, wurde parallel zu dem spezifischen Antikörper gegen SMOC-2 auch mit einem

Antikörper gegen Laminin-1 gefärbt. Das Ergebnis aus der adulten Maus bestätigte sich. SMOC-2 war nicht auf die Basalmembranen beschränkt, trat aber zunächst ab Tag 7,5 (*Abb. 3.9*) dort auf, und zwar an der Reichert's Membran, der ersten Basalmembran, die zwischen embryonalem Entoderm und Trophoblastenschicht zu finden ist. In der früheren Embryonalentwicklung – Tag 5,5 und 6,5 - war SMOC-2 noch nicht detektierbar (*Abb. 3.8*) und ab Tag 10 ging seine Expression dann über Basalmembranstrukturen hinaus. Danach waren zunehmend die bereits im adulten Tier detektierten Organe Herz, Lunge und Niere (*Abb. 3.10*) positiv für SMOC-2. Neben dem Muskelgewebe exprimierten also häufig Abschlussgewebe wie Kapseln oder Innen-Außenraum-Grenzen SMOC-2. In der Lunge waren dies die Bronchiolen, an denen der Gasaustausch stattfindet, in der Niere die Epithelien der Exkretion harnpflichtiger Substanzen und Osmoregulation. Ein weiteres Epithel mit Filterfunktion, die zottenbesetzte Oberfläche des Plexus choroideus war am Embryonaltag 14,5 gefärbt. Das Ependym, die einschichtige Zellauskleidung ist ektodermalen Ursprungs, wie auch die Haut. Deren Funktion als Grenze ist hinreichend bekannt und auch hier wurde das Protein in hohem Maße exprimiert (*Abb. 3.11 F*). Doch gab es neben dem Muskel auch weitere Gewebe mesodermalen Ursprungs, die SMOC-2 exprimierten, wie z.B. die Knorpel (*Abb. 3.11 B*).

Auch BM-40 ist an der Reichert's Membran lokalisiert und eine Involvierung in Prozesse wie Chondro-, Osteo- und Somitogenese wird diskutiert. Darüber hinaus lässt es sich im Embryo in Herz, Thymus, Lunge und Darm nachweisen (Sage et al., 1989). Für Testican wird eher eine Rolle bei der Neurogenese vorgeschlagen, da es während der neuronalen Migration und dem Axonwachstum exprimiert wird und in späteren Entwicklungsstadien an Synapsen vorkommt (Charbonnier et al., 2000). Auch adult bleiben alle drei Testicane im Gehirn erhalten, worin sie sich grundsätzlich von SMOC-2 unterscheiden. Doch liegt Testican-2 auch in Lunge, Testis und endokrinen Organen vor (Charbonnier et al., 2000). Die Gemeinsamkeiten, die SMOC-2 aber mit BM-40 hat, liegen in der Expression in Knochen und Haut (Hunzelmann et al., 1998). Seine Bedeutung im Knochen zeigt sich an BM-40 Knockout-Mäusen, die mit zunehmendem Alter an Osteopenie leiden (Delany et al., 2000). Daher wurde zunächst auch die Bedeutung von SMOC-2 in diesen Organen untersucht.

4.3 Die Rolle von SMOC-1 und SMOC-2 für Zelladhäsion und Migration in Abhängigkeit von $\alpha\beta 6$ -Integrin

In vitro konnten die rekombinant hergestellten SMOC-1 und SMOC-2 Proteinflragmente in Verbindung mit Zelllinien eingesetzt werden, um Hinweise auf die Aufgabe der Proteine finden zu können. So wurden eine Ratten Chondrosarkom Zelllinie, Lungenfibroblasten und verschiedene Zelllinien aus Haut in funktionellen Studien auf Prozesse wie Zelladhäsion und Zellmigration hin untersucht und gleichzeitig ein potentieller Einfluss verschiedener SMOC-Domänen bestimmt.

Während Lungen- und Knorpelzellen nicht an die SMOCs binden konnten, ergab sich für Hautzellen ein anderes Bild. Melanomzellen und Keratinozyten hafteten verstärkt an den EC-Domänen beider SMOCs, besser noch als an dem bekannten Substrat Fibronectin (*Abb. 3.12*). Dies eröffnete die Möglichkeit nach der Suche eines Rezeptors, über den diese Bindung vonstatten ging. Ein solcher ist bisher nicht einmal für das vielbeschriebene BM-40 bekannt. Allerdings ist für BM-40 ein gegenteiliger Effekt beschrieben als die für die SMOCs gezeigte Verstärkung der Zelladhäsion, wenn sie als Substrat genutzt wurden. BM-40 inhibiert die Zellbindung und -spreitung sowohl als Substrat als auch, wenn es zu Zellen gegeben wird, die bereits an einem Substrat haften (Lane und Sage, 1990). Auch für das BM-40 Familienmitglied SC1/Hevin wurde gezeigt, dass es die Adhäsion endothelialer Zellen *in vitro* nicht fördert, sondern die Bindung und Spreitung der Zellen auf Fibronectin verhindert (Girard und Springer, 1996).

Da die Bindung der Zellen an die SMOCs jedoch über die den BM-40 Familienmitgliedern gemeinsame EC-Domäne vermittelt wurde, die bekanntlich Calciumbindungsstellen trägt, wurde untersucht, ob dies für die gezeigte Adhäsion eine Rolle spielte. Das war der Fall, da die Zellen nicht mehr an die SMOCs binden konnten, wenn kein Calcium zur Verfügung stand (*Abb. 3.13*). Doch auch die Bindung an andere Proteine wie Kollagen I oder Fibronectin, die über Rezeptoren der Integrin-Familie vermittelt wird, war ohne divalente Kationen nicht möglich.

Integrine sind die in Vielzellern hauptsächlich genutzten Rezeptoren der Zelladhäsion an extrazelluläre Matrixproteine (Hynes, 2002) und vermitteln auch Zell-Zelladhäsion (Ruoslahti, 1991). Gerade an Fibronectin können zehn verschiedene Mitglieder der Integrinfamilie binden, acht davon RGD-abhängig (Chen et al., 1996). Dieses Motiv aus den drei Aminosäuren Arg-Gly-Asp ist häufig in extrazellulären Matrixproteinen zu finden, z.B. in Fibronectin, Vitronectin, Osteopontin, Kollagenen,

Thrombospondin, Fibrinogen und von Willebrand Faktor (Ruoslahti und Pierschbacher, 1987) und wird von einigen Integrin-Untereinheiten erkannt.

SMOC-1 und SMOC-2 haben beide keine RGD-Sequenz, über die Integrine binden könnten, was nicht nur durch Sequenzanalyse, sondern auch in einem Inhibitionsexperiment gezeigt werden konnte. Dabei wurde mit einem synthetischen RGD-Peptid, das die Bindungsstelle blockieren sollte, die RGD-unabhängige Bindung von Zellen an SMOCs gezeigt, da diese auch bei gleichzeitiger Inkubation mit dem inhibierenden Peptid auftrat (*nicht gezeigte Ergebnisse*). Mittlerweile ist neben RGD auch ein nicht-RGD Bindungsmotiv für Integrine beschrieben: DLXXL (Kraft et al., 1999), das allerdings ebenfalls nicht in der Sequenz der beiden SMOCs vorkommt. Es werden aber eine Reihe weiterer Bindungsmotive diskutiert (Elices et al., 1991; Ruoslahti, 1991).

Integrine bestehen jeweils aus einer α - und einer β -Untereinheit, die als Heterodimer fungieren (*Abb. 1.3*) und den extrazellulären Raum mit dem Cytoskelett verbinden. Für Fibronectin konnten $\alpha 5\beta 1$, $\alpha I\text{Ib}\beta 3$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ und $\alpha v\beta 6$ als Rezeptoren bestätigt werden (Chen et al., 1996). Dazu wurden blockierende Antikörper gegen die einzelnen Integrin-Untereinheiten eingesetzt (Koivisto et al., 1999). Dieser Ansatz wurde auch für SMOC-1 und SMOC-2 verfolgt, womit gezeigt werden konnte, dass die Inhibition der Integrin Untereinheiten αv und $\beta 6$ einen deutlichen Effekt auf die Bindung von Keratinozyten an SMOC-1 und SMOC-2 EC hatte (*Abb. 3.14*). Es war keinerlei Bindung mehr möglich, wenn αv oder $\beta 6$ Integrin auf der Zelloberfläche blockiert waren. Für SMOC-2 war auch eine Bindung über $\alpha v\beta 1$ nicht auszuschließen (*Abb. 3.15*), das bisher als Fibronectin-Rezeptor beschrieben ist (Vogel et al., 1990). Für BM-40 sind in bisherigen Veröffentlichungen ebenfalls zwei αv -Integrine als Rezeptoren in der Diskussion: $\alpha v\beta 3$ und $\alpha v\beta 5$ (Sturm et al., 2002; De et al., 2003).

Das ebenfalls als Fibronectin-Rezeptor bekannte Integrin $\alpha v\beta 6$, das auf epithelialen Zellen beschrieben wurde (Busk et al., 1992), konnte auf den HaCaT-Zellen auch über Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden (*Abb. 3.16*). Dort war es in Fokalkontakten zu finden, wenn die Zellen auf Fibronectin, auf SMOC-1 oder SMOC-2 EC gewachsen waren und kolokalisierte mit Vinculin (Zamir und Geiger, 2001). Fokaladhäsionen bilden die ersten Kontakte mit der Umgebung der Zellen und beinhalten daher auch viele Rezeptoren der Integrinfamilie (Wehrle-Haller und Imhof, 2002). Für BM-40 ist interessanterweise bekannt, dass es in seiner Gegenwart zu einer Abnahme Fokaladhäsions-positiver Zellen kommt. Auch Vinculin kann dann nur noch diffus nachgewiesen werden (Murphy-Ullrich et al., 1995). Für das BM-40 Familienmitglied SC1/Hevin ist der gleiche Effekt beschrieben (Girard und Springer, 1996). SMOC-1 und SMOC-2 hingegen förderten die Bildung von Fokalkontakten, zeigten also erneut ein deutlich anderes Verhalten.

Die Integrin-Expression auf HaCaT-Zellen ist ähnlich der auf primären Keratinozyten, obwohl sie weniger $\alpha 5\beta 1$ -Integrin tragen. HaCaT-Zellen nutzen $\alpha \nu\beta 6$ -Integrin als Hauptrezeptor der Zellspreitung, doch werden die Integrine $\alpha 5\beta 1$, $\alpha \nu\beta 1$ und $\alpha \nu\beta 6$ auch als Mediatoren der Migration von HaCaT-Zellen auf Fibronectin beschrieben (Koivisto et al., 1999). Aus diesem Grund wurden auch Migrationsstudien mit HaCaT-Zellen auf SMOC-1 und SMOC-2 EC durchgeführt.

Die Migration lief beschleunigt ab, wenn die HaCaT-Zellen auf SMOC-1 oder SMOC-2 EC wanderten (*Abb. 3.17*). Es konnte nahezu eine Verdopplung der Wanderungsgeschwindigkeit gegenüber der Kontrolle festgestellt werden, wenn die Zellen ein Substrat zur Verfügung hatten (*Abb. 3.18*). Dass Zellwanderung aber mehr Prozesse bedingt als die Bindung an ein Integrin, zeigt die Migration von Keratinozyten auf Kollagen Typ I (Scharffetter-Kochanek et al., 1992). Es muss sowohl das geeignete Substrat vorliegen, als auch Kollagenase-1 (MMP-1) von den Keratinozyten exprimiert werden. Umgekehrt kann MMP-1 aktiviert werden, wenn die Zellen wandern. HaCaT-Zellen, die kein MMP-1 exprimieren, können auf Kollagen Typ I z.B. auch nicht migrieren (Pilcher et al., 1997). Von $\alpha \nu\beta 6$ ist bekannt, dass es MMPs induzieren kann, vor allem MMP-9 wird hier als verantwortlich für die Migration diskutiert (Thomas et al., 2001). Damit ist es möglich, dass die SMOCs auch mit MMPs in Verbindung stehen, was für BM-40 (Sage et al., 2003) und die Testicane (Nakada et al., 2001; Nakada et al., 2003) bereits bekannt ist.

Da die HaCaT-Zellen auf SMOC-1 und SMOC-2 EC allerdings erst nach 24 bzw. 48 h eine beschleunigte Migration gegenüber der Kontrolle zeigten, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass nach diesen Zeiten bereits Proliferationseffekte sichtbar wurden. Dies konnte über einen Proliferationstest geklärt werden (*Abb. 3.19*). Es war deutlich zu sehen, dass keine gesteigerte Zellteilung vorlag, wenn HaCaT-Zellen auf SMOC-1 oder SMOC-2 EC kultiviert wurden. Zellen, die nur auf BSA oder auf Fibronectin wuchsen, zeigten dieselbe Teilungsrate, der Zellzyklus wurde durch die SMOCs also nicht beeinflusst. Das ist erneut deutlich anders im Fall von BM-40. Für dieses Protein ist eine Inhibition des Zellzyklus in Form eines Arrests zwischen der frühen und mittleren G1-Phase beschrieben, die Zellen können also nicht mehr in die S-Phase eintreten und sich teilen (Funk und Sage, 1991).

Im Fall der auf SMOC-1 oder SMOC-2 EC kultivierten HaCaT-Zellen konnte also eine beschleunigte Zellmigrationsrate detektiert werden, die abhängig war vom Substrat, der Integrin-Expression auf den Zellen und der Integrin-Liganden-Affinität. So sind auch Studien zum SMOC-Rezeptor $\alpha \nu\beta 6$ -Integrin interessant. Keratinozyten von $\beta 6^{-/-}$ Mäusen zeigen gegenüber solchen aus Wildtyp Mäusen eine verlangsamte Migration auf Fibronectin und Vitronectin. Blockierende $\alpha \nu\beta 6$ -Antikörper inhibierten die Adhäsion und Migration auch von Wildtyp-Keratinozyten auf diesen Substraten (Huang et al., 1998).

Diese Ergebnisse ähneln denen aus den Experimenten mit den SMOCs und unterstützen so deren Relevanz. Allerdings kann für eine erfolgreiche Zellwanderung auch die Kombination verschiedener Rezeptoren von Nöten sein. Obwohl nämlich $\alpha\beta6$ der Hauptrezeptor für die Fibronectin-Bindung in HaCaT-Zellen ist, regulieren unterschiedliche Integrin-Rezeptoren verschiedene Arten der Zellbewegung (Koivisto et al., 1999).

Die Zellwanderung von HaCaT-Zellen nutzt also unterschiedliche Integrine wie auch unterschiedliche Substrate (Huang et al., 1998) - $\alpha3\beta1$, $\alpha5\beta1$ und $\alpha\beta6$, Fibronectin und Laminin-5, aber auch die SMOCs seien beispielhaft genannt. Diese werden außerdem durch den Einfluss von Wachstumsfaktoren und Cytokinen beeinflusst. Es ist z.B. bekannt, dass $\alpha\beta6$ -Integrin auf HaCaT-Zellen durch TGF β 1-Behandlung hochreguliert werden kann (Koivisto et al., 1999). Die Grenzen der *in vitro* Systeme sind also klar aufgezeigt und so sollen die Funktionen von SMOC-1 und SMOC-2 im lebenden System weiterbesprochen werden.

4.4 Die Funktion von SMOC-2 in der Haut

Experimente gewinnen immer dann noch an Relevanz, wenn sie im lebenden System durchgeführt werden können, da direkt eine Funktion der untersuchten Proteine postuliert werden kann. Die Zwischenstufe war in dieser Arbeit, von der Haut-Zelllinie auf das gefundene System Haut selbst zu wechseln und es *ex vivo* zu betrachten, in Form primärer Zellen, Gewebeextrakte oder Gefrierschnitte.

Es war bekannt, dass $\alpha\beta6$ auf Keratinozyten exprimiert wird (Haapasalmi et al., 1996). Auch SMOC-1 und SMOC-2 konnten in primären Keratinozyten detektiert werden (Abb. 3.20) und waren in Gewebeblots aus Gesamthaut nachweisbar (*nicht gezeigte Ergebnisse*). Die Lokalisation von SMOC-2 wurde über Immunfluoreszenzfärbungen genauer bestimmt (Abb. 3.21) und konnte auch durch eine Überlagerung mit Cytokeratin-14, einem Marker für basale Keratinozyten, in der Epidermis nachgewiesen werden.

Dass SMOC-2 direkt mit Cytokeratin-14 in den basalen Keratinozyten kolokalisiert, konnte auch über einen Immunoblot von Epidermisextrakt bestätigt werden (Abb. 3.22). Auch $\alpha\beta6$ wird in allen basalen Epithelzellen exprimiert (Adams und Watt, 1991) und kolokalisiert dort mit Cytokeratin-14 (Hildebrand et al., 2002). Damit konnte die Epidermis als das Hautkompartiment identifiziert werden, in dem sowohl SMOC-2 als auch $\alpha\beta6$ exprimiert wurden. Diese Lokalisation von SMOC-2 wurde durch zwei weitere Experimente bestätigt. So konnte es zum einen auch in Überlagerung mit dem Oberflächenprotein E-Cadherin in basalen Keratinozyten gezeigt werden (*nicht gezeigte Ergebnisse*). Cadherine sind eine Familie Calcium-abhängiger interzellulärer

Adhäsionsmoleküle, von denen das epitheliale E-Cadherin auf der Plasmamembran von Keratinozyten lokalisiert ist (Furukawa et al., 1997). Zum anderen konnte die spezifische Färbung der Epidermis in einem Inhibitionstest aufgehoben werden, indem der SMOC-2 Antikörper mit SMOC-2 Protein vorinkubiert worden war (*Abb. 3.23*). SMOC-2 lag also in den basalen Keratinozyten differenzierter, intakter Epidermis vor, in pathologischen Situationen war dies anders.

Im Vergleich mit dem SMOC-2 Rezeptor $\alpha\beta6$ -Integrin, dessen Expression auf Epithelien von Karzinomen oder während der Wundheilung hochreguliert wird (Breuss et al., 1995), wurden diese epithelialen Erneuerungsvorgänge genauer betrachtet. Bei der Wundheilung wandern Zellen der Epidermis über eine provisorische Matrix aus Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin und Tenascin in den Wundbereich ein, wobei vor allem die Interaktion mit Fibronectin und Tenascin über $\alpha\beta6$ vermittelt wird. Tenascin-C, ein großes, hexameres Glykoprotein reguliert stromal-epitheliale Interaktionen im Verlauf der Wundheilung über $\alpha\beta6$ -Integrin (Häkkinen et al., 2000). So ist $\alpha\beta6$ ab Tag sieben verstärkt in basalen Zellen zu finden und bleibt dort bis Tag vierzehn nachweisbar (Clark et al., 1996).

Wie $\alpha\beta6$ wird SMOC-2 in den frühen Stadien der Wundheilung zunächst nicht exprimiert, während es zu späteren Zeitpunkten durchaus nachgewiesen werden kann (*Abb. 3.24*). Fünf Tage nach der Verwundung ist der Beginn der SMOC-2 Expression zu erahnen, elf Tage später ist es in der Basalzellschicht lückenlos zu finden. Damit deckt sich seine Expression mit der von $\alpha\beta6$, das wie einige andere Zelladhäsionsrezeptoren der Integrinfamilie für die Reepithelialisierung von Wunden, also erst in der späten Phase der dermalen und der Wundheilung von Schleimhäuten benötigt wird. Erst ab Tag sieben, wenn die epithelialen Ränder fusioniert haben und das Granulationsgewebe gebildet ist, konzentriert sich $\alpha\beta6$ mit Fibronectin, Tenascin-C (Haapasalmi et al., 1996), aber auch SMOC-2 an den basalen epithelialen Zellen.

In der hyperproliferativen Epidermis war SMOC-2 stark herunterreguliert, was den Erwartungen entsprach (*Abb. 3.19*), da SMOC-2 Proliferation nicht förderte oder in irgendeiner Weise beeinflusste. In der hyperproliferativen Epidermis überwiegt allerdings die Proliferation, da ja in kurzer Zeit viel neues Gewebe geschaffen werden muss, das die Wunde verschließt. Auch für andere pathologische Situationen wie Psoriasis, in denen eine hyperproliferative Epidermis vorliegt, kann SMOC-2 in dem entsprechenden Gewebe nicht nachgewiesen werden (*Abb. 3.25*).

Im Vergleich mit den Migrationsstudien können aber weitere Überlegungen angestellt werden, da im Verlauf der Wundheilung natürlich auch Migrationsvorgänge ablaufen, auf die SMOC-2 einwirken könnte. Wie bekannt ist, läuft im Zuge des Wundheilungsprozesses eine enorme Umverteilung verschiedener Oberflächenmoleküle ab. So muss z.B. $\alpha6\beta4$ -Integrin herunterreguliert werden und dafür die Fibronectin- und

Tenascinrezeptoren $\alpha 5\beta 1$, $\alpha \nu\beta 6$ hochreguliert werden, genauso der Vitronektin-Rezeptor $\alpha \nu\beta 5$ und der Kollagen-Rezeptor $\alpha 2\beta 1$. Es werden also Rezeptoren, die für Zelladhäsion und Stabilisierung von Nöten sind, herunterreguliert. Da die Ergebnisse der Zelladhäsionsstudien deutlich gemacht haben, dass die SMOCs in die Zelladhäsion klar eingreifen und diese unterstützen, sind sie, genau wie die Integrine, denen diese Aufgabe zufällt, im Verlauf der frühen Phase der Wundheilung eher hinderlich, da die Zellen sich schnell bewegen müssen, alte Zell-Zell-Kontakte ab- und neue aufgebaut werden müssen.

Außerdem spielen im komplexen System der Wundheilung deutlich mehr Faktoren eine Rolle als im *in vitro* Migrationsversuch. Das wird nicht nur für die SMOCs, sondern auch für BM-40 deutlich. Es scheint festzustehen, dass BM-40 in Wunden exprimiert wird und an der Kontrolle der Wundheilung beteiligt ist. Wird diese nun aber in Versuchen mit Knockout-Mäusen untersucht, so wird einmal eine signifikant reduzierte Wundheilung im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen beschrieben, bei der die Bildung des Granulationsgewebes und die Produktion der extrazellulären Matrix verlangsamt ist (Basu et al., 2001). Zum anderen ist auch eine signifikante Reduktion der Wundgröße in BM-40 Knockout- im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen beobachtet worden (Bradshaw et al., 2002). Einmal können dermale Fibroblasten der Knockout-Tiere eine Wunde also nur durch Zusatz von BM-40 schließen (Basu et al., 2001), im anderen Fall zeigen Primärkulturen dermalen Fibroblasten von Knockout-Tieren gesteigerte Migration im Vergleich zu denen des Wildtyps *in vitro* (Bradshaw et al., 2002). Hier wird als Ursache eine Rolle des Kollagen-Gehalts der Haut diskutiert. Damit wird wiederum klar, dass möglichst viele Wechselwirkungen betrachtet werden müssen, um Aussagen über die Rolle eines Proteins treffen zu können.

Das als Rezeptor der SMOCs identifizierte $\alpha \nu\beta 6$ -Integrin wird in der adulten Wundheilung erst im Verlauf der Reepithelialisierung hochreguliert (Clark et al., 1996; Haapasalmi et al., 1996; Häkkinen et al., 2000). Kann diese im Fall einer Inaktivierung von $\beta 6$ -Integrin nicht ordnungsgemäß ablaufen, kommt es zu Entzündungsvorgängen der Haut und der Lunge. Im Fall von $\beta 6^{-/-}$ Mäusen wandern Makrophagen in die Haut ein und es akkumulieren aktivierte Lymphozyten in der Lunge. $\alpha \nu\beta 6$ bewirkt also die Modulation epithelialer Entzündung (Huang et al., 1996), wird aber auch in chronischer Wundepidermis hochreguliert und in Alveolar Typ II- und Bronchiolarzellen konstitutiv exprimiert (Huang et al., 1998).

Dass in dieser Arbeit SMOC-2 in der Epidermis, aber auch in Bronchiolarzellen der Lunge nachgewiesen werden konnte, lässt eine Bedeutung des Proteins in Verbindung mit $\alpha \nu\beta 6$ vermuten. Die SMOC-2 Expression in Lunge und das Nicht-Vorhandensein in Leber oder neuroendokrinen Strukturen ist auch interessant im Zusammenhang mit der Expression von $\alpha \nu\beta 6$ in Lungenadenokarzinomen, nicht aber in Leber- oder neuroendokrinen Tumoren (Sipos et al., 2004). Damit könnten SMOC-2 und das Integrin auch eine gemeinsame Rolle in der Tumorigenese haben. Hierbei aktiviert $\alpha \nu\beta 6$ TGF β -1,

dessen Funktion durch die Expression von $\alpha\beta6$ lokal reguliert werden kann (Munger et al., 1999). Erneut kommen also die bereits im Zusammenhang mit den SMOCs in Migrationsstudien erwähnten Wachstumsfaktoren ins Spiel. Diese sind besonders auch in der Betrachtung von Entwicklungsvorgängen interessant, die *in vivo* vorgenommen werden sollte.

4.5 *In vivo* Studien zu SMOC-1 und SMOC-2 im Zebrafisch

Um auch *in vivo* eine Analyse der Funktion der beiden Proteine zu ermöglichen, sollte ein Tier-Modellsystem eingesetzt werden. Die Maus, in der bereits auch andere Mitglieder der BM-40 Familie ausgeschaltet worden waren, z.B. BM-40 selbst, SC1/Hevin und die Testicane, hatte keine befriedigenden Ergebnisse erbracht, was an der Redundanz dieser Proteine liegen kann. Zudem können gerade Entwicklungsvorgänge nicht ideal untersucht werden, da die Embryonen sich im Uterus entwickeln.

Für BM-40 wurden daher bereits Expression-Studien in *Xenopus* Embryonen durchgeführt. Ektopische Expression führte zu schweren Anomalien, was durch Mikroinjektion von BM-40 RNA, Protein oder verschiedenen Peptiden gezeigt wurde und zu unterschiedlichen Phänotypen führte. Vor allem waren axiale Defekte und eine Ventralisierung des Embryos die Folge, was auf eine Inhibition während der Gastrulation hinwies (Damjanovski et al., 1997). Eine andere Variante, die Injektion von Antikörpern gegen BM-40 in die Blastocoel-Höhle von *Xenopus* Embryonen, führte erst in der späten Neurulation zu Entwicklungsdefekten. Allerdings waren auch hier axiale Defekte wie eine Verkürzung und der Verlust von Segmentgrenzen festzustellen, aber auch Deformierungen der Augen und ein Fehlen der Pigmente (Purcell et al., 1993).

Sollen Gene im *Xenopus*-System ausgeschaltet werden, werden normalerweise DNA-Oligonukleotide injiziert. Diese haben oft toxische Effekte und es müssen meist mehrere Konstrukte getestet werden, um eine spezifische Interaktion zu erreichen (Heasman, 2002). In den letzten Jahren hat daher eine andere Technologie zunehmend an Interesse gewonnen, die in *Xenopus*, aber auch in Huhn, Maus und vor allem Zebrafisch Verwendung findet - die Morpholino-Technologie. Morpholinos zeigen eine hohe Sequenzspezifität, bestimmbare und wenig nicht-*antisense* Aktivität, gute Wasserlöslichkeit, Resistenz gegen eine große Zahl von Nukleasen und niedrige Herstellungskosten (Hudziak et al., 1996; Summerton und Weller, 1997).

Damit waren die Morpholinos nicht nur für die ursprüngliche Idee der Behandlung von Krankheiten, sondern auch für die Injektion in Zebrafisch interessant. Es werden zwei mögliche Wirkweisen der Morpholinos verwendet, die entweder eine Veränderung der Transkription oder die Inhibition der Translation bewirken. Im ersten Fall bindet der Morpholino an eine potentielle Intron/Exon-Grenze und führt zu einem veränderten Splice-Vorgang, der dann den Verlust eines Exons nach sich zieht. Im zweiten Fall wird ein Morpholino gegen die 5'-UTR eines Gens hergestellt, der sterisch die Bindung der 40S ribosomalen Untereinheit stören kann, was die Translation des entsprechenden Proteins unterdrückt (Ekker und Larson, 2001).

Daher kann diese Technik auch genutzt werden, um Genfunktionen zu bestimmen, wozu der Morpholino ins 1-4 Zell-Stadium befruchteter Oozyten injiziert werden muss. Hier blockiert er sowohl zygotische wie auch maternale Transkripte und kann komplette Verlustphänotypen hervorrufen. Zudem wird während der ersten beiden Tage nach der Befruchtung komplette Penetranz erreicht, weshalb mit dieser Technik die kritischen Entwicklungsprozesse der Somitogenese und Organogenese verfolgt werden können. Aufgrund der Transparenz und *ex utero*-Entwicklung der Zebrafisch-Eier sind diese Vorgänge auch direkt beobachtbar (Nasevicius und Ekker, 2000).

Aufgrund dieser Tatsachen wurden *in vivo* Studien für SMOC-1 und SMOC-2 im Zebrafisch-System angestrebt. Im Genom von *Fugu rubripes* kommen die beiden Proteine vor (Aparicio et al., 2002), doch waren sie im Zebrafisch noch nicht kloniert. Das war aber die Voraussetzung, um die Sequenz möglicher Morpholinos bestimmen zu können. Dabei stellte sich auch die Verwendung verschiedener Fischstämme als Schwierigkeit dar, weil diese aufgrund von Polymorphismen Unterschiede im genetischen Hintergrund aufwiesen (Ekker, 2000). Für SMOC-1 und SMOC-2 wurden die Sequenzen in den Stämmen AB und Köln bestimmt und konnten so für weitere Versuche zu Grunde gelegt werden.

4.5.1 SMOC-1: Morpholino, Überexpression und *Rescue*

Um die Expression von SMOC-1 im Zebrafisch bestimmen zu können, wurde eine Sonde für die *in situ* Hybridisierung angefertigt (Abb. 3.26), mit deren Hilfe die räumliche und zeitliche Expression von SMOC-1 veranschaulicht werden konnte (Abb. 3.27). SMOC-1 mRNA trat erstmals zehn Stunden nach der Befruchtung (hpf) zu Beginn der Segmentierung auf, die im Zebrafisch von 10-24 hpf abläuft und in der sich die Somiten bilden, die Neuomere und die ersten Organe entstehen (Kimmel et al., 1995). Damit konnte es in die Entwicklung eingreifen, weshalb die Morpholino-Experimente Aufschluss darüber geben konnten, ob es beim Fehlen der SMOCs zu morphologischen Auffälligkeiten kam.

Diese wurden bereits 12 hpf festgestellt (Abb. 3.28 A) und äußerten sich in einem vergrößerten Kopf-Schwanz Abstand und einer Nivellierung dieser beiden

Körperbestandteile, so dass sie nur schwer voneinander zu unterscheiden waren. Da schon zu einem so frühen Zeitpunkt in der Entwicklung Probleme auftraten, stand zu vermuten, dass das Fehlen von SMOC-1 schon die Gastrulation veränderte. Obwohl es verschiedene mögliche Ursachen für einen vergrößerten Kopf-Schwanz Abstand geben kann, war es doch wahrscheinlich, dass Zellbewegungen, die innerhalb der Gastrulation ablaufen, verlangsamt waren. Hierbei gibt es drei Arten der Zellwanderung: die Epibolie, die Involution und Konvergenz/Extensionsbewegungen. Im Verlauf der Konvergenz strömen Zellen auf die dorsale Seite, weshalb das Blastoderm dort dann auch deutlich dicker erscheint und im Verlauf der Extension verlängert sich die primäre embryonale Achse (Abb. 4.1). Im Fall der Injektion mit SMOC-1 Morpholino war der Embryo aber kürzer, was auf eine veränderte Zellwanderung hinwies, wodurch dann auch ein größerer Abstand zwischen Kopf und Schwanz hervorgerufen wurde.

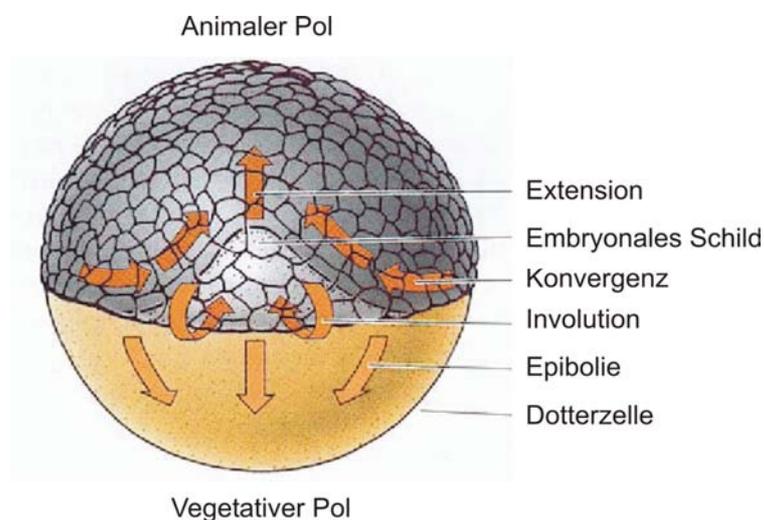


Abb. 4.1: Schematische Übersicht über die innerhalb der Gastrulation ablaufenden Zellwanderungen (nach Scott F. Gilbert „Developmental Biology“, Part II, *Patterns of Development*, Page 220). Dorsalansicht der im Verlauf der Gastrulation des Zebrafisch-Embryos ablaufenden Arten der Zellwanderung: Epibolie, Involution und Konvergenz/Extension.

Veränderte Konvergenz-Extensionsbewegungen treten bei Mutanten für viele Gene auf, z.B. auch bei der Glypican-Mutante *Knypek (kny)* oder bei der *pipetail (ppt)*-Mutante von *Wnt5* (Marlow et al., 2004). Mit einem Glypican ist ein membran-assoziiertes Heparansulfat-Proteoglykan betroffen, das auf Mitglieder der *Wnt*-Familie Einfluss nehmen kann. Die Mutanten haben posterior verkürzte Körper und Schwänze. Auch bei den *trilobite*-Mutanten liegt eine gestörte Konvergenz-Extension vor, also verlangsamte Gastrulationsbewegungen, weshalb die Embryonen eine verkürzte Körperachse aufweisen. In vielen Fällen ist dies gleichzeitig mit einer Veränderung in der dorsoventralen Musterbildung verbunden, nicht aber in den *trilobite*-Mutanten und auch nicht bei der

Injektion von SMOC-1 Morpholino. In den *trilobite*-Mutanten ist vielmehr die Aktivität der *bone morphogenetic proteins* (BMPs) betroffen (Sepich et al., 2000).

Es ist nicht möglich, ein Protein nur für sich zu betrachten. Besonders im Verlauf von Entwicklungsvorgängen gibt es eine Vielzahl von Signalübertragungen, Wechselwirkungen und Liganden-Rezeptor-Interaktionen, so dass sich Ausfälle oder das Fehlen eines Proteins sehr schnell bemerkbar machen. Es ist allerdings auch möglich, dass Funktionen zumindest teilweise durch andere Proteine ersetzt werden können. So haben gerade auch die schon genannten Wnt- und BMP-Familien viele Mitglieder, die in Signalübertragungskaskaden eingreifen. Sie gehören zu den Wachstumsfaktoren, die sich aus vier Proteinfamilien zusammensetzen: der FGF-Familie, der TGF β -Familie mit den Activinen, der Wnt-Familie und Noggin. BMPs sind Mitglieder der TGF β -Superfamilie, die in der Gastrulation und Neurulation eine Rolle spielen und auch an der Entstehung embryonaler Niere, Lunge und Haut beteiligt sind (Hogan, 1996). Das ist in Bezug auf die eine oder andere Wechselwirkung mit den SMOCs interessant, weil sowohl Interaktionen mit TGF β bereits im vorherigen Kapitel im Zusammenhang mit dem SMOC-Rezeptor $\alpha\beta$ 6-Integrin erwähnt wurden als auch die genannten Organe SMOC-Expression aufwiesen. Hier scheinen also Gemeinsamkeiten zwischen dem Maus- und Zebrafischsystem vorzuliegen, was auf eine allgemeinere Bedeutung der Ergebnisse hinweist. Auch in der Chondrogenese spielen BMPs, aber auch Wnts eine Rolle (Tuan, 2003) und müssen sich mit ihren Gegenspielern Follistatin und Noggin die Waage halten (Hogan, 1996). Das sind Moleküle, denen die SMOCs entweder im Aufbau ähnlich sind (Follistatin-Domäne) oder die sie binden können (Noggin, *nicht gezeigte Ergebnisse*).

Um ein klareres Bild über die Moleküle zu bekommen, mit denen SMOC-1 wechselwirkt, wurde auch eine Injektion von SMOC-1 mRNA durchgeführt, die zu einer ektopischen Expression des Proteins führte. Das ist zwar unphysiologisch, zieht deshalb normalerweise aber auch immer einen Phänotyp nach sich und wurde für viele Embryonen gezeigt (Ekker, 1999). Die betroffenen Signalübertragungswege werden gestört und so kommt es z.B. im Fall der Überexpression der schon genannten BMPs zu einer verstärkten Entwicklung ventralen Mesoderms (Heasman, 1997). Im Idealfall wird also durch die Verschiebung der Signalkaskade die Funktion der einzelnen Proteine deutlich. So sind die BMPs in die dorsoventrale Musterbildung involviert (Imai und Talbot, 2001).

Die Überexpression von SMOC-1 RNA zeigte zunächst, dass diese intakt war und in der Lage, *in vivo* Effekte hervorzurufen (Abb. 3.28 C). Es waren schwere Veränderungen am Embryo zu erkennen, so eine Streckung des Embryos in Ei- oder Ellipsenform und, wie im Fall der mit Morpholino injizierten, ein vergrößerter Kopf-Schwanz Abstand. Diese Art Phänotyp ist ebenfalls in verschiedenen Publikationen für die Überexpression von mRNA beschrieben (Ando et al., 2005). Es kam also auch hier zu einer Verkürzung der Körperachse, was zu späteren Zeitpunkten noch deutlicher wird

(Abb. 3.29 C, D). So wiesen die Embryonen 22 hpf deutliche Entwicklungsschäden auf. Vor allem der verkürzte oder vollkommen fehlende Dotterstreif und eine auffällige Deformierung des Notochords ließen auf Probleme im Verlauf der Segmentierung schließen. Normalerweise entstehen Notochord und Dotterstreif ungefähr zur gleichen Zeit, im 14-Somiten Stadium, also ungefähr 16 hpf (Kimmel et al., 1995). Dass die Entwicklung beider Strukturen fehlerhaft war, wies auf den Bedarf von SMOC-1 zu diesem Zeitpunkt hin.

Auch die Embryonen, die mit SMOC-1 Morpholino injiziert worden waren, zeigten durchweg Effekte im posterioren Teil des Körpers, im Schwanzbereich und im Dotterstreif (Abb. 3.29 E-H). Zu einer synergistischen Rumpf- und Schwanzverkürzung kommt es durch Veränderungen in der Segmentierung, wie schon für die bereits eingeführten *Knypek* (*kny*)- und *pipetail* (*ppt*)-Mutanten bekannt (Marlow et al., 2004). Auch hier sind Regulatoren der BMP- und Wnt-Familie, BMP4 und Wnt5 involviert. Während sich die Entwicklung im anterioren Teil des Körpers, vor allem auch im Kopfbereich immer unauffällig vollzog, waren im posterioren Teil sowohl im Fall der mit SMOC-1 RNA injizierten als auch im Fall der mit SMOC-1 Morpholino injizierten Tiere ähnliche morphologische Veränderungen festzustellen. Das bedeutet, dass ein Fehlen wie auch ein Überschuss des Proteins denselben Signalübertragungsweg negativ beeinflusst. Eine mögliche Erklärung wäre, dass SMOC-1 nicht selbst Teil dieser Kaskade ist, aber eventuell regulatorisch auf Signalübertragungsmoleküle Einfluss nehmen kann.

Im Zusammenhang mit den Unterschieden in der Entwicklung anteriorer gegenüber posteriorer Körperteile sind in jüngster Zeit im Zebrafisch Proteine beschrieben worden, die erneut an die Ergebnisse der SMOC-Studien im Maussystem erinnern. So wurden $\alpha 5$ -Integrin und Fibronectin als verantwortlich für die Grenzbildung zwischen den anterioren Somiten beschrieben (Chong und Jiang, 2005; Jülich et al., 2005; Koshida et al., 2005). Integrine spielen also auch im Zebrafisch an Fokalkontakten und Somitengrenzen eine Rolle (Crawford et al., 2003), wodurch auch die SMOCs als Substrate wieder an Bedeutung gewinnen und ihr Fehlen oder ihre ektopische Expression aus diesen Gründen zu morphologischen Veränderungen im Bereich der Somiten führen kann.

Ob diese aufgehoben werden konnten, wurde durch Koinjektion von SMOC-1 RNA und Morpholino überprüft. Dieses Experiment sollte vollständig normale Fische zur Folge haben. Die Methode des *Rescue*-Experiments zur Aufhebung von Morpholino-Effekten ist allgemein anerkannt. Da die mRNA durch Injektion jedoch ektopisch exprimiert vorliegt, können Rettungseffekte durch Veränderungen, die die Überexpression hervorruft, maskiert werden. Daher sind die Mengen injizierter RNA genau auszutitrieren und möglichst gering zu halten (Ekker, 1999). So wurden hier unterschiedliche RNA-Mengen parallel mit dem Morpholino injiziert und die Tiere ebenfalls 22 hpf fotografiert (Abb. 3.29 I-L). Außerdem ist schon beim Herstellen der mRNA darauf zu achten, dass

diese keine Überlappung mit der Sequenz des Morpholinos hat, diesen binden und dadurch seine Aktivität unterdrücken kann (Heasman, 2002). Die Ergebnisse sind unter den genannten Gesichtspunkten differenziert zu betrachten, da gleichzeitig zwei von außen zugegebene Konstrukte auf die Embryonen einwirken, die in ihrer Dosis-Wirkungs-Beziehung aufeinander und auf den Fisch die Gefahr von Nebeneffekten bergen. Daraus ergibt sich auch die Frage, ob eine komplette Rettung überhaupt möglich ist. Doch sprach die Zahl von über 90% an sich gut entwickelnden Embryonen für einen Einsatz der Methode. Beim Vergleich der Fische wurde auch deutlich, dass ein *Rescue* erzielt werden konnte, wenn das richtige Verhältnis Morpholino:RNA eingesetzt wurde (*Abb. 3.29*).

Die Fische wiesen eine normale Körperlänge auf und Schwanz und Dotterstreif zeigten keinerlei Verkümmierungen. Es war auch auffällig, dass die kleinsten Mengen an mRNA (1 pg) ausreichten, um einen *Rescue* zu erreichen, während bereits bei Injektion von 10 pg Überexpressionseffekte auftraten. Die erfolgreiche Aufhebung der durch Morpholino-Injektion herbeigeführten morphologischen Veränderungen konnte in vielen Fällen gezeigt werden (Ando et al., 2005), mittlerweile werden auch andere *Rescue*-Techniken diskutiert. So können auch mRNAs von Genen, die vor den durch Morpholino-Injektion stillgelegten auf demselben Entwicklungspfad liegen, injiziert werden oder aber es wird ein *Rescue* erreicht durch die Injektion genomischer DNA-Fragmente, die in BAC- oder Bakteriophagenvektoren kloniert wurden (Ekker, 1999).

4.5.2 Funktion von SMOC-1 und SMOC-2 im Zebrafisch

Die genaue Funktion der SMOCs im Zebrafisch war noch unklar, weshalb die Fische im Verlauf der weiteren Entwicklung beobachtet wurden. Für die Experimente mit Beteiligung von mRNA war dies nur bis 24 hpf sinnvoll, da diese dann abgebaut ist und keine Effekte mehr hervorrufen kann. Die Morpholinos sind allerdings während der ersten beiden Tage völlig penetrant (Nasevicius und Ekker, 2000) und Effekte der reduzierten Proteinexpression konnten bis zu 72 hpf detektiert werden (van der Sar et al., 2002).

Aus diesem Grund wurden die Fische 24, 48 und 72 hpf aufgenommen und ein Vergleich angestellt zwischen Kontrolltieren, solchen, die mit einem *Mismatch*-, einem SMOC-1 oder einem SMOC-2 Morpholino injiziert worden waren (*Abb. 3.30*). *Mismatch*-Morpholinos gelten als Kontrolle für nichtspezifische, toxische Kontaminierungen (Heasman, 2002). Allerdings ist die Möglichkeit nicht auszuschließen, dass diese experimentellen Oligonukleotide unerwartet an eine mRNA binden und dann auch Morpholino-Effekte hervorrufen. Das geschah zu einem geringen Prozentsatz (14%) auch in den beschriebenen Experimenten (*Abb. 3.32*). Da diese Penetranz aber erklärbar war, ist sie als Schwellenwert im Vergleich zu den anderen Injektionen zu betrachten. Die meisten *Mismatch*-injizierten Embryonen zeigten wie die Kontrolltiere keinerlei morphologische Auffälligkeiten (*Abb. 3.30 A-F*).

Die mit SMOC-1 oder SMOC-2 Morpholino injizierten Tiere wiesen neben den schon genannten Anomalien, die den Schwanz und den Dotterstreif betrafen (*Abb. 3.30 H, I, K, P*), weitere, sehr deutliche Auffälligkeiten auf. Dazu gehörten perikardiale Ödeme und Bluteinlagerungen im Bereich derselben oder auch in den ventralen Gefäßen um den Pronephros und den Schwanz. Die Entwicklung der Gefäße sowie der Perikardhöhle beginnt ungefähr zeitgleich ab 24 hpf (Kimmel et al., 1995). Hier scheint es sich also im Gegensatz zu den bisher genannten Auffälligkeiten, die auf Fehler in der Segmentierung zurückgehen, um Verlustphänotypen einer späteren Entwicklungsstufe zu handeln.

Das Morpholino-System weist weitere Vorteile gegenüber z.B. der Maus auf, wie die Möglichkeit, mehrere Morpholinos gleichzeitig injizieren zu können. Das gilt für Morpholinos gegen dieselbe mRNA, aber auch für solche gegen unterschiedliche, womit Mehrfach-Knockdowns innerhalb einer Injektion möglich werden (Ekker, 2000).

Vor dem Hintergrund der bisher gefundenen Phänotypen, die für SMOC-1 und SMOC-2 sehr ähnlich ausfielen und darauf hinwiesen, dass beide Proteine ähnliche, eventuell redundante Funktionen übernahmen, versprach man sich von der Koinjektion eine Verstärkung der Phänotypen, um so auch eine bessere Aussage über die Funktion der SMOCs zu erhalten. Es kam additiv zu einer Verschlimmerung des Phänotyps (*Abb. 3.31 A-F*). Dass die Deformationen nicht auf Defekte bei der Knorpelbildung zurückzuführen waren, konnte über Alcianblau-Experimente verdeutlicht werden (*nicht gezeigte Ergebnisse*).

Da die SMOCs schon sehr früh, nämlich 10 hpf, exprimiert werden, wäre ihr Einfluss sowohl auf späte Prozesse der Gastrulation wie alle folgenden Entwicklungsperioden denkbar. Es wurden dabei bereits Prozesse der Segmentierung besprochen, wo am ehesten eine Interaktion mit Wachstumsfaktoren diskutiert werden kann. Es gibt keine Hinweise darauf, dass die SMOCs selbst als Signalüberträger dienen, doch könnte ihnen eine regulatorische Rolle in der Aktivierung und/oder Inhibition verschiedener Mitglieder der BMP- oder Wnt-Familie zukommen.

Die Folgen von Fehlern bei der Segmentierung in Form von Veränderungen im Körperbau, wie posterior verkürzt, gebogen, verkümmertem Schwanz oder Dotterstreif sind eventuell auf diese Einflüsse zurückzuführen. Doch die erst später gefundenen Auffälligkeiten im Perikard- und Gefäßsystem können andere Ursachen haben. Daher sollen hier auch die drei Organe angesprochen werden, die für diese Fehler verantwortlich sein könnten: Herz, Niere und Haut. Interessanterweise waren sie alle schon in vorherigen Kapiteln Thema, werden die SMOCs auch in der Maus in diesen Organen exprimiert und übernehmen dort offensichtlich Funktionen.

Das Herz beginnt im Pharyngula-Stadium (24-48 hpf) zu schlagen und schien auch in den Morpholino-injizierten Fischen seine Funktion auszuüben. Da die Embryonen transparent sind, war die rhythmische Bewegung durch einfache Betrachtung gut zu sehen.

Die Niere bzw. der Pronephros wird im 8-Somiten Stadium (13 hpf) angelegt und entwickelt sich zu zwei Nephronen mit fusionierten Glomeruli und zwei ventral zu Notochord und dorsaler Aorta verlaufenden Tubuli. Der Beginn der glomerulären Filtration fällt mit der Vaskularisierung des Zebrafischs 40-48 hpf zusammen (Drummond et al., 1998) und die auffälligen Blutansammlungen könnten durchaus im Bereich der Niere lokalisiert sein (*Abb. 3.30 und 31*). Damit wäre ein Hinweis auf einen Einfluss der SMOCs sowohl auf die Entwicklung der Niere gegeben als auch auf das Blutgefäßsystem. Im Fall der Niere wäre wiederum eine Wechselwirkung mit Wachstumsfaktoren der genannten BMP- und Wnt-Familien denkbar, da BMP7 wie Wnt11 für die Nephrogenese verantwortlich sind (Schedl und Hastie, 2000). Außerdem wurde die Niere bereits auch in früheren Kapiteln im Maussystem als wichtiges Organ der SMOC-Expression beschrieben. In der Maus wurde auch die Expression der SMOCs in vielen Epithelien erwähnt, so auch in der Wand von Blutgefäßen, im Endothel. Eine mögliche Rolle der SMOCs wäre eine Verstärkung der Adhäsion von Endothelzellen, weshalb ihr Fehlen zu Undichtigkeiten und damit zur Bildung von Blutinseln führen könnte. So ist eine Funktion der SMOCs weder für die Niere noch für das Blutgefäßsystem, auch im Zebrafisch, auszuschließen. Da die Embryonen jedoch in den ersten beiden Tagen das osmotische Gleichgewicht ohne die Niere herstellen, ist sie, wie auch das Blutgefäßsystem, kaum für die Entstehung der Perikardialödeme verantwortlich.

Das dritte Organ, die Haut, konnte durch ein Experiment noch näher untersucht werden. Die Epidermis entsteht aus embryonalem Ektoderm und bildet 9 hpf eine Einzelzellschicht sowie das Periderm; die Dermis entsteht aus paraxialem Mesoderm (Le Guellec et al., 2004). Es ist wichtig, dass der Fisch schon früh eine schützende Barriere gegen das umliegende Wasser bilden und so auch den Gradienten der hyperosmotischen Körperflüssigkeiten gegenüber dem Wasser aufrecht erhalten kann. Ist diese Barriere defekt, kann Wasser einströmen, was dann auch zur Bildung von Ödemen führen kann (Hill et al., 2004).

Um die Funktion der Haut dahingehend zu untersuchen, ist es möglich, den osmotischen Gradienten aufzuheben, indem man die Osmolarität des Wassers mit Mannitol erhöht (*Abb. 3.31 G-L*). Als Ergebnis dieses Versuchs hatten die Fische zwar immer noch eine deformierte Körperform (*Abb. 3.31 G, H, I, K, L*) und auch die Blutansammlungen blieben erhalten (*Abb. 3.31 H, K, L*), doch waren die perikardialen Ödeme vollständig verschwunden.

Dass dieser Defekt von großer Bedeutung war, zeigt auch die Penetranz (*Abb. 3.32*). Diese gibt an, welcher Anteil der Fische von der Morpholino-Injektion morphologisch betroffen war. Die Kontrolltiere und die *Mismatch*-Morpholino injizierten Fische wurden bereits weiter oben diskutiert und waren kaum oder nicht verkrüppelt. Im Fall der mit den SMOC-Morpholinos einzeln injizierten Fischen wies ungefähr die Hälfte

einen Phänotyp auf. Dazu ist zu sagen, dass sowohl die Injektionen von Fisch zu Fisch als auch die Schwere der Ausprägungen variieren können (Heasman, 2002), weshalb keine vollständige Penetranz erreicht wird. Im Fall der Koinjektion der beiden SMOC-Morpholinos stieg die Penetranz aber deutlich, um 25% an, was ein Zeichen für die additive Wirkung der beiden Proteine war. Allerdings ging die Penetranz wieder deutlich zurück, wenn die doppelt injizierten Tiere statt in normalem Medium, in Medium mit 250 mM Mannitol isoosmotisch gehalten wurden. Das bedeutet, dass 28% der mit beiden SMOC-Morpholinos injizierten Fische nur ein Perikardialödem ausgebildet hatten, im Gegensatz zu den 72%, die zusätzliche oder nur andere Schäden aufgrund des Fehlens der beiden Proteine aufwiesen.

Damit war eindeutig gezeigt, dass die beiden SMOCs eine Rolle in der frühen Entwicklung der Fische spielten und ihr Fehlen die Tiere beeinträchtigte. Eine Funktion konnte sogar genauer beschrieben werden - die Rolle der Haut bei der Entstehung der Ödeme. So wurde deutlich, dass das Fehlen von SMOC-1 und SMOC-2 zu Defekten in der Barrierefunktion der Haut führte.

4.6 Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse der Experimente im Zebrafisch korrelieren mit den im ersten Teil dieser Arbeit beschriebenen *in vitro* Versuchen und den im Maussystem durchgeführten Experimenten. In der Haut war zunächst neben Herz, Milz, Thymus, Lunge, Niere und Ovar die Expression von SMOC-1 (Vannahme et al., 2002) und SMOC-2 nachgewiesen worden. Über Zellkulturversuche verschiedener Haut-Zelllinien wurde deren Adhäsion an die extrazelluläre Domäne von SMOC-1 und SMOC-2 beschrieben und als Rezeptor dieser Bindung das Integrin $\alpha\beta 6$ nachgewiesen. Dieses spielt zusammen mit den SMOCs eine Rolle in der Epidermis der Maus und wahrscheinlich auch weiterer Spezies. SMOC-2 wird in den basalen Keratinozyten der Epidermis exprimiert und übernimmt vor allem im intakten Gewebe, aber auch in pathologischen Situationen wie der Wundheilung, Aufgaben im Verlauf der Reepithelialisierung.

Im Zusammenhang mit *in vivo* Experimenten im Zebrafisch-System konnte gezeigt werden, dass die SMOCs wichtig sind, um die Barrierefunktion der Haut aufrecht zu erhalten und damit einen unabdingbaren Bestandteil der Epidermis darstellen. Zusätzlich konnte hier eine frühere Rolle dieser beiden Proteine in der Entwicklung des Fisches festgestellt werden, die wahrscheinlich schon in der späten Gastrulation und frühen Segmentierung der Tiere beginnt. Dass die Tiere, in denen SMOC-1 überexprimiert ist oder aber fehlt, Deformationen im posterioren Körperbereich und im Schwanz aufweisen,

könnte an gestörten Signalkaskaden im Verlauf der Segmentierung liegen. Dabei könnten die SMOCs regulatorische Funktionen in Form der Aktivierung oder Inhibition von Signalmolekülen übernehmen.

In diesem Zusammenhang werden Mitglieder der Wnt- und BMP-Superfamilien diskutiert, zu denen auch in Zukunft über *in vitro* und *in vivo* Versuche noch genauere Studien durchzuführen sind. So wären vor allem Noggin, BMP2, BMP4, BMP7, Wnt2, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a und Wnt11 zu betrachten, die auch in der Mausentwicklung eine wichtige Rolle spielen. Hier könnten Embryonen, aber auch weitere Organe der SMOC-2 Expression, wie Herz, Lunge, Niere, Ovar oder Knorpel näher untersucht werden. Auch könnte die Rolle der SMOCs in der Wundheilung der Maus in Verbindung mit den Wachstumsfaktoren Wnt10b und Wnt4 und Matrix-Metalloproteasen weiter vertieft werden, die jüngst in diesem Zusammenhang beschrieben wurden (Okuse et al., 2005). Die in dieser Arbeit als SMOC-Rezeptoren im Maussystem gefundenen Integrine sollten im Gegenzug im Zebrafisch-System weiter analysiert werden.

Es gibt also noch viele offene Fragen über die Rolle der beiden SMOCs, doch konnte mit dieser Arbeit eine wertvolle Analyse der Expression und Funktion von SMOC-1 und SMOC-2 eingeleitet werden, die weitere Studien sehr erleichtern wird. Durch eine Identifikation der interessanten Organe, Signalkaskaden, Rezeptoren auf der einen und der für die Wechselwirkung verantwortlichen Domänen auf der Seite der Proteine, die durch die Herstellung einzelner Proteinfragmente möglich war, können nun fokussiert Experimente durchgeführt werden. Für das Haut-System konnte die Bedeutung der SMOCs in der vorliegenden Arbeit sogar bereits von *in vitro* Studien bis hin zum *in vivo* Experiment aufgezeigt werden.

5 Literaturverzeichnis

- Adams, J. C. and F. M. Watt** (1991). "Expression of beta 1, beta 3, beta 4, and beta 5 integrins by human epidermal keratinocytes and non-differentiating keratinocytes." *J Cell Biol* 115(3): 829-41.
- Alliel, P. M., J. P. Perin, P. Jolles and F. J. Bonnet** (1993). "Testican, a multidomain testicular proteoglycan resembling modulators of cell social behaviour." *Eur J Biochem* 214(1): 347-50.
- Amthor, H., D. Connolly, K. Patel, B. Brand-Saberi, D. G. Wilkinson, J. Cooke and B. Christ** (1996). "The expression and regulation of follistatin and a follistatin-like gene during avian somite compartmentalization and myogenesis." *Dev Biol* 178(2): 343-62.
- Ando, H., M. Kobayashi, T. Tsubokawa, K. Uyemura, T. Furuta and H. Okamoto** (2005). "Lhx2 mediates the activity of Six3 in zebrafish forebrain growth." *Dev Biol* 287(2): 456-68.
- Aparicio, S., J. Chapman, E. Stupka, N. Putnam, J. M. Chia, P. Dehal, A. Christoffels, S. Rash, S. Hoon, A. Smit, M. D. Gelpke, J. Roach, T. Oh, I. Y. Ho, M. Wong, C. Detter, F. Verhoef, P. Predki, A. Tay, S. Lucas, P. Richardson, S. F. Smith, M. S. Clark, Y. J. Edwards, N. Doggett, A. Zharkikh, S. V. Tavtigian, D. Pruss, M. Barnstead, C. Evans, H. Baden, J. Powell, G. Glusman, L. Rowen, L. Hood, Y. H. Tan, G. Elgar, T. Hawkins, B. Venkatesh, D. Rokhsar and S. Brenner** (2002). "Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*." *Science* 297(5585): 1301-10.
- Barber, R. D., A. S. Woolf and R. M. Henderson** (1997). "Potassium conductances and proliferation in conditionally immortalized renal glomerular mesangial cells from the H-2Kb-tsA58 transgenic mouse." *Biochim Biophys Acta* 1355(2): 191-203.
- Barker, T. H., P. Framson, P. A. Puolakkainen, M. Reed, S. E. Funk and E. H. Sage** (2005). "Matricellular homologs in the foreign body response: hevin suppresses inflammation, but hevin and SPARC together diminish angiogenesis." *Am J Pathol* 166(3): 923-33.
- Bassuk, J. A., T. Birkebak, J. D. Rothmier, J. M. Clark, A. Bradshaw, P. J. Muchowski, C. C. Howe, J. I. Clark and E. H. Sage** (1999). "Disruption of the Sparc locus in mice alters the differentiation of lenticular epithelial cells and leads to cataract formation." *Exp Eye Res* 68(3): 321-31.
- Basu, A., L. H. Kligman, S. J. Samulewicz and C. C. Howe** (2001). "Impaired wound healing in mice deficient in a matricellular protein SPARC (osteonectin, BM-40)." *BMC Cell Biol* 2(1): 15.
- Becker, C., P. Buttler and H. G. Graber** (2002). "Influence of anti-CD49f and anti-CD29 monoclonal antibodies on mitotic activity of epithelial cells (HaCaT) and gingival fibroblasts in vitro." *Eur J Oral Sci* 110(2): 137-43.
- Begemann, G.** (2004). "Zebrafischgenetik", *Universität Konstanz*.
- Berridge, M. J.** (1997). "Elementary and global aspects of calcium signalling." *J Physiol* 499 291-306.
- Bode, W. and R. Huber** (1991). "Proteinase-protein inhibitor interaction." *Biomed Biochim Acta* 50(4-6): 437-46.
- Bonnet, F., J. P. Perin, F. Charbonnier, A. Camuzat, G. Roussel, J. L. Nussbaum and P. M. Alliel** (1996). "Structure and cellular distribution of mouse brain testican.

- Association with the postsynaptic area of hippocampus pyramidal cells." *J Biol Chem* 271(8): 4373-80.
- Bonnet, F., J. P. Perin, P. Maillet, P. Jolles and P. M. Alliel** (1992). "Characterization of a human seminal plasma glycosaminoglycan-bearing polypeptide." *Biochem J* 288 565-9.
- Bork, P., A. K. Downing, B. Kieffer and I. D. Campbell** (1996). "Structure and distribution of modules in extracellular proteins." *Q Rev Biophys* 29(2): 119-67.
- Bosman, F. T. and I. Stamenkovic** (2003). "Functional structure and composition of the extracellular matrix." *J Pathol* 200(4): 423-8.
- Boukamp, P., R. T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham and N. E. Fusenig** (1988). "Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line." *J Cell Biol* 106(3): 761-71.
- Bradshaw, A. D., M. J. Reed and E. H. Sage** (2002). "SPARC-null mice exhibit accelerated cutaneous wound closure." *J Histochem Cytochem* 50(1): 1-10.
- Brekken, R. A. and E. H. Sage** (2000). "SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix." *Matrix Biol* 19(7): 569-80.
- Breuss, J. M., J. Gallo, H. M. DeLisser, I. V. Klimanskaya, H. G. Folkesson, J. F. Pittet, S. L. Nishimura, K. Aldape, D. V. Landers, W. Carpenter and et al.** (1995). "Expression of the beta 6 integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling." *J Cell Sci* 108 (Pt 6): 2241-51.
- Busk, M., R. Pytela and D. Sheppard** (1992). "Characterization of the integrin alpha v beta 6 as a fibronectin-binding protein." *J Biol Chem* 267(9): 5790-6.
- Carter, W. G., E. A. Wayner, T. S. Bouchard and P. Kaur** (1990). "The role of integrins alpha 2 beta 1 and alpha 3 beta 1 in cell-cell and cell-substrate adhesion of human epidermal cells." *J Cell Biol* 110(4): 1387-404.
- Charbonnier, F., C. Chanoine, C. Cifuentes-Diaz, C. L. Gallien, F. Rieger, P. M. Alliel and J. P. Perin** (2000). "Expression of the proteoglycan SPOCK during mouse embryo development." *Mech Dev* 90(2): 317-21.
- Charbonnier, F., J. P. Perin, G. Roussel, J. L. Nussbaum and P. M. Alliel** (1997). "[Cloning of testican/SPOCK in man and mouse. Neuromuscular expression perspectives in pathology]." *C R Seances Soc Biol Fil* 191(1): 127-33.
- Chazin, W. J.** (1995). "Releasing the calcium trigger." *Nat Struct Biol* 2(9): 707-10.
- Chen, J., T. Maeda, K. Sekiguchi and D. Sheppard** (1996). "Distinct structural requirements for interaction of the integrins alpha 5 beta 1, alpha v beta 5, and alpha v beta 6 with the central cell binding domain in fibronectin." *Cell Adhes Commun* 4(4-5): 237-50.
- Chong, S. W. and Y. J. Jiang** (2005). "Off limits--integrins holding boundaries in somitogenesis." *Trends Cell Biol* 15(9): 453-7.
- Clark, R. A., G. S. Ashcroft, M. J. Spencer, H. Larjava and M. W. Ferguson** (1996). "Re-epithelialization of normal human excisional wounds is associated with a switch from alpha v beta 5 to alpha v beta 6 integrins." *Br J Dermatol* 135(1): 46-51.
- Crawford, B. D., C. A. Henry, T. A. Clason, A. L. Becker and M. B. Hille** (2003). "Activity and distribution of paxillin, focal adhesion kinase, and cadherin indicate cooperative roles during zebrafish morphogenesis." *Mol Biol Cell* 14(8): 3065-81.
- Damjanovski, S., X. Karp, S. Funk, E. H. Sage and M. J. Ringuelette** (1997). "Ectopic expression of SPARC in *Xenopus* embryos interferes with tissue morphogenesis: identification of a bioactive sequence in the C-terminal EF hand." *J Histochem Cytochem* 45(5): 643-55.

- de Rie, M. A., A. Y. Goedkoop and J. D. Bos** (2004). "Overview of psoriasis." *Dermatol Ther* 17(5): 341-9.
- De, S., J. Chen, N. V. Narizhneva, W. Heston, J. Brainard, E. H. Sage and T. V. Byzova** (2003). "Molecular pathway for cancer metastasis to bone." *J Biol Chem* 278(40): 39044-50.
- Delany, A. M., M. Amling, M. Priemel, C. Howe, R. Baron and E. Canalis** (2000). "Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice." *J Clin Invest* 105(9): 1325.
- Dinser, R., F. Zaucke, F. Kreppel, K. Hultenby, S. Kochanek, M. Paulsson and P. Maurer** (2002). "Pseudoachondroplasia is caused through both intra- and extracellular pathogenic pathways." *J Clin Invest* 110(4): 505-13.
- Drummond, I. A., A. Majumdar, H. Hentschel, M. Elger, L. Solnica-Krezel, A. F. Schier, S. C. Neuhauss, D. L. Stemple, F. Zwartkruis, Z. Rangini, W. Driever and M. C. Fishman** (1998). "Early development of the zebrafish pronephros and analysis of mutations affecting pronephric function." *Development* 125(23): 4655-67.
- Dziadek, M., M. Paulsson, M. Aumailley and R. Timpl** (1986). "Purification and tissue distribution of a small protein (BM-40) extracted from a basement membrane tumor." *Eur J Biochem* 161(2): 455-64.
- Eckenhoff, R. G.** (1989). "Perinatal changes in lung surfactant calcium measured in situ." *J Clin Invest* 84(4): 1295-301.
- Ekker, M.** (1999). "Saving zebrafish mutants." *Bioessays* 21(2): 94-8.
- Ekker, S. C.** (2000). "Morphants: a new systematic vertebrate functional genomics approach." *Yeast* 17(4): 302-306.
- Ekker, S. C. and J. D. Larson** (2001). "Morphant technology in model developmental systems." *Genesis* 30(3): 89-93.
- Elices, M. J., L. A. Urry and M. E. Hemler** (1991). "Receptor functions for the integrin VLA-3: fibronectin, collagen, and laminin binding are differentially influenced by Arg-Gly-Asp peptide and by divalent cations." *J Cell Biol* 112(1): 169-81.
- Evenas, J., A. Malmendal and S. Forsen** (1998). "Calcium." *Curr Opin Chem Biol* 2(2): 293-302.
- Fässler, R. and M. Meyer** (1995). "Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice." *Genes Dev* 9(15): 1896-908.
- Finnegan, D. J.** (1989). "Eukaryotic transposable elements and genome evolution." *Trends Genet* 5(4): 103-7.
- Funk, S. E. and E. H. Sage** (1991). "The Ca²⁺(+)-binding glycoprotein SPARC modulates cell cycle progression in bovine aortic endothelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(7): 2648-52.
- Furukawa, F., K. Fujii, Y. Horiguchi, N. Matsuyoshi, M. Fujita, K. Toda, S. Imamura, H. Wakita, S. Shirahama and M. Takigawa** (1997). "Roles of E- and P-cadherin in the human skin." *Microsc Res Tech* 38(4): 343-52.
- Gailit, J. and E. Ruoslahti** (1988). "Regulation of the fibronectin receptor affinity by divalent cations." *J Biol Chem* 263(26): 12927-32.
- Gilbert, S. F.** (1997). "Developmental Biology". Fifth Edition, Part II, Patterns of Development, Page 220, *Sinauer Associates, INC. Publishers, Sunderland, Massachusetts*.
- Gilmour, D. T., G. J. Lyon, M. B. Carlton, J. R. Sanes, J. M. Cunningham, J. R. Anderson, B. L. Hogan, M. J. Evans and W. H. Colledge** (1998). "Mice deficient for the secreted glycoprotein SPARC/osteonectin/BM40 develop normally

- but show severe age-onset cataract formation and disruption of the lens." *Embo J* 17(7): 1860-70.
- Girard, J. P. and T. A. Springer** (1995). "Cloning from purified high endothelial venule cells of hevin, a close relative of the antiadhesive extracellular matrix protein SPARC." *Immunity* 2(1): 113-23.
- Girard, J. P. and T. A. Springer** (1996). "Modulation of endothelial cell adhesion by hevin, an acidic protein associated with high endothelial venules." *J Biol Chem* 271(8): 4511-7.
- Gu, J. and N. Taniguchi** (2004). "Regulation of integrin functions by N-glycans." *Glycoconj J* 21(1-2): 9-15.
- Guermah, M., P. Crisanti, D. Laugier, P. Dezelee, L. Bidou, B. Pessac and G. Calothy** (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(10): 4503-7.
- Guncar, G., G. Pungercic, I. Klemencic, V. Turk and D. Turk** (1999). "Crystal structure of MHC class II-associated p41 Ii fragment bound to cathepsin L reveals the structural basis for differentiation between cathepsins L and S." *Embo J* 18(4): 793-803.
- Gustafsson, E. and R. Fässler** (2000). "Insights into extracellular matrix functions from mutant mouse models." *Exp Cell Res* 261(1): 52-68.
- Haapasalmi, K., K. Zhang, M. Tonnesen, J. Olerud, D. Sheppard, T. Salo, R. Kramer, R. A. Clark, V. J. Uitto and H. Larjava** (1996). "Keratinocytes in human wounds express alpha v beta 6 integrin." *J Invest Dermatol* 106(1): 42-8.
- Häkkinen, L., H. C. Hildebrand, A. Berndt, H. Kosmehl and H. Larjava** (2000). "Immunolocalization of tenascin-C, alpha9 integrin subunit, and alphavbeta6 integrin during wound healing in human oral mucosa." *J Histochem Cytochem* 48(7): 985-98.
- Häkkinen, L., L. Koivisto, H. Gardner, U. Saarialho-Kere, J. M. Carroll, M. Lakso, H. Rauvala, M. Laato, J. Heino and H. Larjava** (2004). "Increased expression of beta6-integrin in skin leads to spontaneous development of chronic wounds." *Am J Pathol* 164(1): 229-42.
- Hambrock, H. O., B. Kaufmann, S. Muller, F. G. Hanisch, K. Nose, M. Paulsson, P. Maurer and U. Hartmann** (2004). "Structural characterization of TSC-36/Flik: analysis of two charge isoforms." *J Biol Chem* 279(12): 11727-35.
- Hambrock, H. O., D. P. Nitsche, U. Hansen, P. Bruckner, M. Paulsson, P. Maurer and U. Hartmann** (2003). "SC1/hevin. An extracellular calcium-modulated protein that binds collagen I." *J Biol Chem* 278(13): 11351-8.
- Harlow, E. and D. Lane** (1988). "Antibodies: A laboratory manual", *Cold Spring Harbor Laboratory*.
- Hartmann, U. and P. Maurer** (2001). "Proteoglycans in the nervous system--the quest for functional roles in vivo." *Matrix Biol* 20(1): 23-35.
- Hasselaar, P., D. J. Loskutoff, M. Sawdey and E. H. Sage** (1991). "SPARC induces the expression of type 1 plasminogen activator inhibitor in cultured bovine aortic endothelial cells." *J Biol Chem* 266(20): 13178-84.
- Hayflick, L.** (1961). "The establishment of a line (WISH) of human amnion cells in continuous cultivation." *Exp Cell Res* 23: 14-20.
- Heasman, J.** (1997). "Patterning the *Xenopus* blastula." *Development* 124(21): 4179-91.
- Heasman, J.** (2002). "Morpholino oligos: making sense of antisense?" *Dev Biol* 243(2): 209-14.
- Hechler, D.** (2003). "Lokalisation von Testican-3 in Maus und Untersuchungen von alternativen Splicevarianten." *Diplomarbeit*, Universität zu Köln

- Heep, D.** (2005). "In vitro und in vivo Studien zur Charakterisierung von Testican-2 und SMOC-1, zweier neuer Mitglieder der BM-40 Familie." *Dissertation*, Universität zu Köln
- Hildebrand, H. C., L. Häkkinen, C. B. Wiebe and H. S. Larjava** (2002). "Characterization of organotypic keratinocyte cultures on de-epithelialized bovine tongue mucosa." *Histol Histopathol* 17(1): 151-63.
- Hill, A. J., S. M. Bello, A. L. Prash, R. E. Peterson and W. Heideman** (2004). "Water permeability and TCDD-induced edema in zebrafish early-life stages." *Toxicol Sci* 78(1): 78-87.
- Hintermann, E., M. Bilban, A. Sharabi and V. Quaranta** (2001). "Inhibitory role of alpha 6 beta 4-associated erbB-2 and phosphoinositide 3-kinase in keratinocyte haptotactic migration dependent on alpha 3 beta 1 integrin." *J Cell Biol* 153(3): 465-78.
- Hogan, B. L.** (1996). "Bone morphogenetic proteins in development." *Curr Opin Genet Dev* 6(4): 432-8.
- Hohenadl, C., K. Mann, U. Mayer, R. Timpl, M. Paulsson and D. Aeschlimann** (1995). "Two adjacent N-terminal glutamines of BM-40 (osteonectin, SPARC) act as amine acceptor sites in transglutaminaseC-catalyzed modification." *J Biol Chem* 270(40): 23415-20.
- Hohenester, E., P. Maurer, C. Hohenadl, R. Timpl, J. N. Jansonius and J. Engel** (1996). "Structure of a novel extracellular Ca(2+)-binding module in BM-40." *Nat Struct Biol* 3(1): 67-73.
- Hohenester, E., P. Maurer and R. Timpl** (1997). "Crystal structure of a pair of follistatin-like and EF-hand calcium-binding domains in BM-40." *Embo J* 16(13): 3778-86.
- Huang, X., J. Wu, S. Spong and D. Sheppard** (1998). "The integrin alphavbeta6 is critical for keratinocyte migration on both its known ligand, fibronectin, and on vitronectin." *J Cell Sci* 111 (Pt 15): 2189-95.
- Huang, X., J. Wu, W. Zhu, R. Pytela and D. Sheppard** (1998). "Expression of the human integrin beta6 subunit in alveolar type II cells and bronchiolar epithelial cells reverses lung inflammation in beta6 knockout mice." *Am J Respir Cell Mol Biol* 19(4): 636-42.
- Huang, X. Z., J. F. Wu, D. Cass, D. J. Erle, D. Corry, S. G. Young, R. V. Farese, Jr. and D. Sheppard** (1996). "Inactivation of the integrin beta 6 subunit gene reveals a role of epithelial integrins in regulating inflammation in the lung and skin." *J Cell Biol* 133(4): 921-8.
- Hudziak, R. M., E. Barofsky, D. F. Barofsky, D. L. Weller, S. B. Huang and D. D. Weller** (1996). "Resistance of morpholino phosphorodiamidate oligomers to enzymatic degradation." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 6(4): 267-72.
- Hunzelmann, N., M. Hafner, S. Anders, T. Krieg and R. Nischt** (1998). "BM-40 (osteonectin, SPARC) is expressed both in the epidermal and in the dermal compartment of adult human skin." *J Invest Dermatol* 110(2): 122-6.
- Hynes, R. O.** (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." *Cell* 110(6): 673-87.
- Imai, Y. and W. S. Talbot** (2001). "Morpholino phenocopies of the bmp2b/swirl and bmp7/snailhouse mutations." *Genesis* 30(3): 160-3.
- Johnston, I. G., T. Paladino, J. W. Gurd and I. R. Brown** (1990). "Molecular cloning of SC1: a putative brain extracellular matrix glycoprotein showing partial similarity to osteonectin/BM40/SPARC." *Neuron* 4(1): 165-76.

- Johnston, I. M., H. J. Spence, J. N. Winnie, L. McGarry, J. K. Vass, L. Meagher, G. Stapleton and B. W. Ozanne** (2000). "Regulation of a multigenic invasion programme by the transcription factor, AP-1: re-expression of a down-regulated gene, TSC-36, inhibits invasion." *Oncogene* 19(47): 5348-58.
- Jülich, D., R. Geisler and S. A. Holley** (2005). "Integrin α 5 and delta/notch signaling have complementary spatiotemporal requirements during zebrafish somitogenesis." *Dev Cell* 8(4): 575-86.
- Kimmel, C. B., W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann and T. F. Schilling** (1995). "Stages of embryonic development of the zebrafish." *Dev Dyn* 203(3): 253-310.
- Kjellen, L. and U. Lindahl** (1991). "Proteoglycans: structures and interactions." *Annu Rev Biochem* 60: 443-75.
- Kohfeldt, E., P. Maurer, C. Vannahme and R. Timpl** (1997). "Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican." *FEBS Lett* 414(3): 557-61.
- Koivisto, L., K. Larjava, L. Häkkinen, V. J. Uitto, J. Heino and H. Larjava** (1999). "Different integrins mediate cell spreading, haptotaxis and lateral migration of HaCaT keratinocytes on fibronectin." *Cell Adhes Commun* 7(3): 245-57.
- Koshida, S., Y. Kishimoto, H. Ustumi, T. Shimizu, M. Furutani-Seiki, H. Kondoh and S. Takada** (2005). "Integrin α 5-dependent fibronectin accumulation for maintenance of somite boundaries in zebrafish embryos." *Dev Cell* 8(4): 587-98.
- Kraft, S., B. Diefenbach, R. Mehta, A. Jonczyk, G. A. Luckenbach and S. L. Goodman** (1999). "Definition of an unexpected ligand recognition motif for α 6 β 6 integrin." *J Biol Chem* 274(4): 1979-85.
- Kretsinger, R. H. and C. E. Nockolds** (1973). "Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description." *J Biol Chem* 248(9): 3313-26.
- Kupprion, C., K. Motamed and E. H. Sage** (1998). "SPARC (BM-40, osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells." *J Biol Chem* 273(45): 29635-40.
- Laemmli, U. K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-5.
- Lane, T. F. and E. H. Sage** (1990). "Functional mapping of SPARC: peptides from two distinct Ca²⁺-binding sites modulate cell shape." *J Cell Biol* 111(6 Pt 2): 3065-76.
- Lane, T. F. and E. H. Sage** (1994). "The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions." *Faseb J* 8(2): 163-73.
- Le Guellec, D., G. Morvan-Dubois and J. Y. Sire** (2004). "Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (*Danio rerio*)." *Int J Dev Biol* 48(2-3): 217-31.
- Lenarcic, B. and T. Bevec** (1998). "Thyropins--new structurally related proteinase inhibitors." *Biol Chem* 379(2): 105-11.
- Mann, K., R. Deutzmann, M. Paulsson and R. Timpl** (1987). "Solubilization of protein BM-40 from a basement membrane tumor with chelating agents and evidence for its identity with osteonectin and SPARC." *FEBS Lett* 218(1): 167-72.
- Marlow, F., E. M. Gonzalez, C. Yin, C. Rojo and L. Solnica-Krezel** (2004). "No tail cooperates with non-canonical Wnt signaling to regulate posterior body morphogenesis in zebrafish." *Development* 131(1): 203-16.
- Marr, H. S., M. A. Basalamah, T. W. Bouldin, A. W. Duncan and C. J. Edgell** (2000). "Distribution of testican expression in human brain." *Cell Tissue Res* 302(2): 139-44.

- Martin, P.** (1997). "Wound healing--aiming for perfect skin regeneration." *Science* 276(5309): 75-81.
- Maurer, P., C. Hohenadl, E. Hohenester, W. Gohring, R. Timpl and J. Engel** (1995). "The C-terminal portion of BM-40 (SPARC/osteonectin) is an autonomously folding and crystallisable domain that binds calcium and collagen IV." *J Mol Biol* 253(2): 347-57.
- Mayer, U., M. Aumailley, K. Mann, R. Timpl and J. Engel** (1991). "Calcium-dependent binding of basement membrane protein BM-40 (osteonectin, SPARC) to basement membrane collagen type IV." *Eur J Biochem* 198(1): 141-50.
- McKinnon, P. J. and R. F. Margolskee** (1996). "SC1: a marker for astrocytes in the adult rodent brain is upregulated during reactive astrocytosis." *Brain Res* 709(1): 27-36.
- McKinnon, P. J., S. K. McLaughlin, M. Kapsetaki and R. F. Margolskee** (2000). "Extracellular matrix-associated protein Sc1 is not essential for mouse development." *Mol Cell Biol* 20(2): 656-60.
- Menon, G. K., S. Grayson and P. M. Elias** (1985). "Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry." *J Invest Dermatol* 84(6): 508-12.
- Michel, U., P. Farnworth and J. K. Findlay** (1993). "Follistatins: more than follicle-stimulating hormone suppressing proteins." *Mol Cell Endocrinol* 91(1-2): 1-11.
- Molina, F., M. Bouanani, B. Pau and C. Granier** (1996). "Characterization of the type-1 repeat from thyroglobulin, a cysteine-rich module found in proteins from different families." *Eur J Biochem* 240(1): 125-33.
- Mukhopadhyay, K., V. Lefebvre, G. Zhou, S. Garofalo, J. H. Kimura and B. de Crombrughe** (1995). "Use of a new rat chondrosarcoma cell line to delineate a 119-base pair chondrocyte-specific enhancer element and to define active promoter segments in the mouse pro-alpha 1 (II) collagen gene." *J Biol Chem* 270(46): 27711-9.
- Munger, J. S., X. Huang, H. Kawakatsu, M. J. Griffiths, S. L. Dalton, J. Wu, J. F. Pittet, N. Kaminski, C. Garat, M. A. Matthay, D. B. Rifkin and D. Sheppard** (1999). "The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis." *Cell* 96(3): 319-28.
- Murphy-Ullrich, J. E., T. F. Lane, M. A. Pallero and E. H. Sage** (1995). "SPARC mediates focal adhesion disassembly in endothelial cells through a follistatin-like region and the Ca(2+)-binding EF-hand." *J Cell Biochem* 57(2): 341-50.
- Myllyharju, J. and K. I. Kivirikko** (2004). "Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms." *Trends Genet* 20(1): 33-43.
- Nagayoshi, T., D. Sanborn, N. J. Hickok, D. R. Olsen, M. J. Fazio, M. L. Chu, R. Knowlton, K. Mann, R. Deutzmann, R. Timpl and et al.** (1989). "Human nidogen: complete amino acid sequence and structural domains deduced from cDNAs, and evidence for polymorphism of the gene." *DNA* 8(8): 581-94.
- Nakada, M., H. Miyamori, J. Yamashita and H. Sato** (2003). "Testican 2 abrogates inhibition of membrane-type matrix metalloproteinases by other testican family proteins." *Cancer Res* 63(12): 3364-9.
- Nakada, M., A. Yamada, T. Takino, H. Miyamori, T. Takahashi, J. Yamashita and H. Sato** (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(24): 8896-902.
- Nasevicius, A. and S. C. Ekker** (2000). "Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish." *Nat Genet* 26(2): 216-20.

- Nicholson, C., G. T. Bruggencate, R. Steinberg and H. Stockle** (1977). "Calcium modulation in brain extracellular microenvironment demonstrated with ion-selective micropipette." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(3): 1287-90.
- Nishimoto, S., Y. Hamajima, Y. Toda, H. Toyoda, K. Kitamura and T. Komurasaki** (2002). "Identification of a novel smooth muscle associated protein, smap2, upregulated during neointima formation in a rat carotid endarterectomy model." *Biochim Biophys Acta* 1576(1-2): 225-30.
- Norose, K., J. I. Clark, N. A. Syed, A. Basu, E. Heber-Katz, E. H. Sage and C. C. Howe** (1998). "SPARC deficiency leads to early-onset cataractogenesis." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39(13): 2674-80.
- Nüsslein-Volhard, C. and R. Dahm** (2002). "Zebrafish". A practical approach, *Oxford University Press*.
- Okuse, T., T. Chiba, I. Katsuumi and K. Imai** (2005). "Differential expression and localization of WNTs in an animal model of skin wound healing." *Wound Repair Regen* 13(5): 491-7.
- Pasparakis, M., G. Courtois, M. Hafner, M. Schmidt-Supprian, A. Nenci, A. Toksoy, M. Krampert, M. Goebeler, R. Gillitzer, A. Israel, T. Krieg, K. Rajewsky and I. Haase** (2002). "TNF-mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of IKK2." *Nature* 417(6891): 861-6.
- Paulsson, M.** (1992). "Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 27(1-2): 93-127.
- Pilcher, B. K., J. A. Dumin, B. D. Sudbeck, S. M. Krane, H. G. Welgus and W. C. Parks** (1997). "The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix." *J Cell Biol* 137(6): 1445-57.
- Prydz, K. and K. T. Dalen** (2000). "Synthesis and sorting of proteoglycans." *J Cell Sci* 113 Pt 2: 193-205.
- Purcell, L., J. Gruia-Gray, S. Scanga and M. Ringuette** (1993). "Developmental anomalies of *Xenopus* embryos following microinjection of SPARC antibodies." *J Exp Zool* 265(2): 153-64.
- Raines, E. W., T. F. Lane, M. L. Iruela-Arispe, R. Ross and E. H. Sage** (1992). "The extracellular glycoprotein SPARC interacts with platelet-derived growth factor (PDGF)-AB and -BB and inhibits the binding of PDGF to its receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(4): 1281-5.
- Rehm, H.** (2000). "Der Experimentator: Proteinchemie". 3. Auflage, *Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg*.
- Reitz, R. E., T. A. Daane, J. R. Woods and R. L. Weinstein** (1977). "Calcium, magnesium, phosphorus, and parathyroid hormone interrelationships in pregnancy and newborn infants." *Obstet Gynecol* 50(6): 701-5.
- Rousselle, P. and M. Aumailley** (1994). "Kalinin is more efficient than laminin in promoting adhesion of primary keratinocytes and some other epithelial cells and has a different requirement for integrin receptors." *J Cell Biol* 125(1): 205-14.
- Ruoslahti, E.** (1991). "Integrins." *J Clin Invest* 87(1): 1-5.
- Ruoslahti, E. and M. D. Pierschbacher** (1987). "New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins." *Science* 238(4826): 491-7.
- Sage, E. H., M. Reed, S. E. Funk, T. Truong, M. Steadele, P. Puolakkainen, D. H. Maurice and J. A. Bassuk** (2003). "Cleavage of the matricellular protein SPARC by matrix metalloproteinase 3 produces polypeptides that influence angiogenesis." *J Biol Chem* 278(39): 37849-57.

- Sage, H., J. Decker, S. Funk and M. Chow** (1989). "SPARC: a Ca²⁺-binding extracellular protein associated with endothelial cell injury and proliferation." *J Mol Cell Cardiol* 21 Suppl 1: 13-22.
- Sage, H., C. Johnson and P. Bornstein** (1984). "Characterization of a novel serum albumin-binding glycoprotein secreted by endothelial cells in culture." *J Biol Chem* 259(6): 3993-4007.
- Sage, H., R. B. Vernon, J. Decker, S. Funk and M. L. Iruela-Arispe** (1989). "Distribution of the calcium-binding protein SPARC in tissues of embryonic and adult mice." *J Histochem Cytochem* 37(6): 819-29.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich** (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* 239(4839): 487-91.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis** (1989). "Molecular cloning : a laboratory manual." *Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sasaki, T., W. Gohring, K. Mann, P. Maurer, E. Hohenester, V. Knauper, G. Murphy and R. Timpl** (1997). "Limited cleavage of extracellular matrix protein BM-40 by matrix metalloproteinases increases its affinity for collagens." *J Biol Chem* 272(14): 9237-43.
- Sasaki, T., E. Hohenester, W. Gohring and R. Timpl** (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(6): 1625-34.
- Scharffetter-Kochanek, K., C. E. Klein, G. Heinen, C. Mauch, T. Schaefer, B. C. Adelmann-Grill, G. Goerz, N. E. Fusenig, T. M. Krieg and G. Plewig** (1992). "Migration of a human keratinocyte cell line (HACAT) to interstitial collagen type I is mediated by the alpha 2 beta 1-integrin receptor." *J Invest Dermatol* 98(1): 3-11.
- Schedl, A. and N. D. Hastie** (2000). "Cross-talk in kidney development." *Curr Opin Genet Dev* 10(5): 543-9.
- Schnepf, A.** (2004). "Testican-2 – Studien zu Expression und Funktion eines neuen Proteoglykans." *Dissertation*, Universität zu Köln
- Schnepf, A., P. Komp Lindgren, H. Hulsmann, S. Kroger, M. Paulsson and U. Hartmann** (2005). "Mouse testican-2. Expression, glycosylation, and effects on neurite outgrowth." *J Biol Chem* 280(12): 11274-80.
- Sepich, D. S., D. C. Myers, R. Short, J. Topczewski, F. Marlow and L. Solnica-Krezel** (2000). "Role of the zebrafish trilobite locus in gastrulation movements of convergence and extension." *Genesis* 27(4): 159-73.
- Shibanuma, M., J. Mashimo, A. Mita, T. Kuroki and K. Nose** (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(1): 13-9.
- Shimasaki, S. and N. Ling** (1991). "Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 and -6)." *Prog Growth Factor Res* 3(4): 243-66.
- Sipos, B., D. Hahn, A. Carceller, J. Piulats, J. Hedderich, H. Kalthoff, S. L. Goodman, M. Kosmahl and G. Kloppel** (2004). "Immunohistochemical screening for beta6-integrin subunit expression in adenocarcinomas using a novel monoclonal antibody reveals strong up-regulation in pancreatic ductal adenocarcinomas in vivo and in vitro." *Histopathology* 45(3): 226-36.
- Streuli, C.** (1999). "Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation." *Curr Opin Cell Biol* 11(5): 634-40.

- Sturm, R. A., K. Satyamoorthy, F. Meier, B. B. Gardiner, D. J. Smit, B. Vaidya and M. Herlyn** (2002). "Osteonectin/SPARC induction by ectopic beta(3) integrin in human radial growth phase primary melanoma cells." *Cancer Res* 62(1): 226-32.
- Sumitomo, K., A. Kurisaki, N. Yamakawa, K. Tsuchida, E. Shimizu, S. Sone and H. Sugino** (2000). "Expression of a TGF-beta1 inducible gene, TSC-36, causes growth inhibition in human lung cancer cell lines." *Cancer Lett* 155(1): 37-46.
- Summerton, J. and D. Weller** (1997). "Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7(3): 187-95.
- Takeichi, M.** (1995). "Morphogenetic roles of classic cadherins." *Curr Opin Cell Biol* 7(5): 619-27.
- Tasanen, K., L. Tunggal, G. Chometon, L. Bruckner-Tuderman and M. Aumailley** (2004). "Keratinocytes from patients lacking collagen XVII display a migratory phenotype." *Am J Pathol* 164(6): 2027-38.
- Termine, J. D., H. K. Kleinman, S. W. Whitson, K. M. Conn, M. L. McGarvey and G. R. Martin** (1981). "Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen." *Cell* 26(1 Pt 1): 99-105.
- Thamilselvan, V., M. Fomby, M. Walsh and M. D. Basson** (2003). "Divalent cations modulate human colon cancer cell adhesion." *J Surg Res* 110(1): 255-65.
- Thisse, B., S. Pflumio, M. Fürthauer, B. Loppin, V. Heyer, A. Degrave, R. Woehl, A. Lux, T. Steffan, X. Q. Charbonnier and C. Thisse** (2001). "Expression of the zebrafish genome during embryogenesis".
- Thomas, G. J., S. Poomsawat, M. P. Lewis, I. R. Hart, P. M. Speight and J. F. Marshall** (2001). "alpha v beta 6 Integrin upregulates matrix metalloproteinase 9 and promotes migration of normal oral keratinocytes." *J Invest Dermatol* 116(6): 898-904.
- Timpl, R. and J. C. Brown** (1996). "Supramolecular assembly of basement membranes." *Bioessays* 18(2): 123-32.
- Tuan, R. S.** (2003). "Cellular signaling in developmental chondrogenesis: N-cadherin, Wnts, and BMP-2." *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 2: 137-41.
- van der Flier, A. and A. Sonnenberg** (2001). "Function and interactions of integrins." *Cell Tissue Res* 305(3): 285-98.
- van der Sar, A. M., D. Zivkovic and J. den Hertog** (2002). "Eye defects in receptor protein-tyrosine phosphatase alpha knock-down zebrafish." *Dev Dyn* 223(2): 292-7.
- Vannahme, C., S. Gosling, M. Paulsson, P. Maurer and U. Hartmann** (2003). "Characterization of SMOC-2, a modular extracellular calcium-binding protein." *Biochem J* 373(Pt 3): 805-14.
- Vannahme, C., S. Schubel, M. Herud, S. Gosling, H. Hulsmann, M. Paulsson, U. Hartmann and P. Maurer** (1999). "Molecular cloning of testican-2: defining a novel calcium-binding proteoglycan family expressed in brain." *J Neurochem* 73(1): 12-20.
- Vannahme, C., N. Smyth, N. Miosge, S. Gosling, C. Frie, M. Paulsson, P. Maurer and U. Hartmann** (2002). "Characterization of SMOC-1, a novel modular calcium-binding protein in basement membranes." *J Biol Chem* 277(41): 37977-86.
- Vogel, B. E., G. Tarone, F. G. Giancotti, J. Gailit and E. Ruoslahti** (1990). "A novel fibronectin receptor with an unexpected subunit composition (alpha v beta 1)." *J Biol Chem* 265(11): 5934-7.
- Wehrle-Haller, B. and B. Imhof** (2002). "The inner lives of focal adhesions." *Trends Cell Biol* 12(8): 382-9.
- Wolpert, L.** (1999). "Entwicklungsbiologie", Modellorganismen: Wirbeltiere Seite 47, *Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg*.

- Wuttke, M., S. Muller, D. P. Nitsche, M. Paulsson, F. G. Hanisch and P. Maurer** (2001). "Structural characterization of human recombinant and bone-derived bone sialoprotein. Functional implications for cell attachment and hydroxyapatite binding." *J Biol Chem* 276(39): 36839-48.
- Yurchenco, P. D. and J. C. Schittny** (1990). "Molecular architecture of basement membranes." *Faseb J* 4(6): 1577-90.
- Zamir, E. and B. Geiger** (2001). "Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions." *J Cell Sci* 114(Pt 20): 3583-90.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
Ak	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
BCA	Bichinolincarbonsäure
bp	Basenpaare
BM	Basalmembran
BM-40	Basalmembranprotein mit einer molaren Masse von 40 kDa
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CD	Circular Dichroismus
cDNA	<i>complementary DNA</i> (revers von mRNA transkribierte DNA)
CNBr	Cyanbromid
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEAE	Diethylaminoethyl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
E	Embryonaltag
EBNA	Epstein-Barr Nuclear Antigen
EC	extrazellulär calciumbindend
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm Tumor
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FL	<i>full length</i> (Volllänge)
FN	Fibronectin
FS	Follistatin-ähnlich
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
G-418	Geneticin
GAG	Glykosaminoglykan
h	Stunde

hpf	<i>hours postfertilization</i> (Stunden nach Befruchtung)
kb	Kilo Basen
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
M	Molar
min	Minute
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
NCR	<i>non coding region</i>
NGS	<i>normal goat serum</i> (normales Ziegenserum)
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Natriumchloridlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i> (Tris-Kochsalz-Puffer)
TCA	Trichloracetat
TE	Tris-EDTA Lösung
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
TY	Thyroglobulin
U	<i>Unit(s)</i> Einheit der Enzymaktivität
üN	über Nacht
UTR	<i>untranslated region</i> , nicht translatierte Region
UV	ultraviolettes Licht
WT	Wildtyp
ZMMK	Zentrum für Molekulare Medizin Köln

Anhang

Aminosäuresequenz-Vergleich von SMOC-1 in Zebrafisch, Maus und Mensch. Die Aminosäuresequenzen zweier Zebrafisch-Stämme (AB und Köln) werden mit den Sequenzen aus Maus und Mensch verglichen. Sind alle vier Sequenzen identisch, ist der Hintergrund blau, bei drei Sequenzen grün. Gibt es paarweise Übereinstimmungen, ist der Hintergrund hellrot, fehlen diese, wird dunkelrot eingefärbt.

	1	10	20	30	40																																			
SMOC-1_AB	M	N	C	H	N	-	-	L	A	L	C	V	F	M	Y	L	M	V	M	R	L	P	A	A	S	T	Q	K	S	T	G	P	R	W	L	I	G	D	R	E
SMOC-1_Köln	M	N	C	H	N	-	-	L	A	L	C	V	F	M	Y	L	M	V	M	R	L	P	A	A	S	T	Q	K	S	T	G	P	R	W	L	I	G	D	R	E
SMOC-1_Maus	M	L	P	A	R	-	V	R	L	L	T	P	H	L	L	V	L	V	Q	L	S	P	A	G	G	H	R	T	T	G	P	R	F	L	I	S	D	R	D	
SMOC-1_Human	M	L	P	A	R	C	A	R	L	L	T	P	H	L	L	V	L	V	Q	L	S	P	A	R	G	H	R	T	T	G	P	R	F	L	I	S	D	R	D	
	50	60	70	80																																				
SMOC-1_AB	S	P	C	S	T	S	C	S	R	S	H	G	K	P	V	C	G	S	D	G	R	S	Y	D	T	N	C	D	L	E	R	A	K	C	R	D	R	T	L	T
SMOC-1_Köln	S	P	C	S	T	S	C	S	R	S	H	G	K	P	V	C	G	S	D	G	R	S	Y	D	T	N	C	D	L	E	R	A	K	C	R	D	R	T	L	T
SMOC-1_Maus	P	P	C	N	P	H	C	P	R	T	Q	E	K	P	I	C	A	S	D	G	R	S	Y	E	S	M	C	E	Y	Q	R	A	K	C	R	D	P	A	L	A
SMOC-1_Human	P	Q	C	N	L	H	C	S	R	T	Q	E	K	P	I	C	A	S	D	G	R	S	Y	E	S	M	C	E	Y	Q	R	A	K	C	R	D	P	T	L	G
	90	100	110	120																																				
SMOC-1_AB	L	A	H	R	G	R	C	K	G	K	N	W	V	R	I	D	Q	P	L	L	V	P	T	L	V	S	E	V	K	E	L	T	G	M	K	E	A	G	Q	T
SMOC-1_Köln	L	A	H	R	G	R	C	K	G	K	N	W	V	R	I	D	Q	P	L	L	V	P	T	L	V	S	E	V	K	E	L	T	G	M	K	E	A	G	Q	T
SMOC-1_Maus	V	V	H	R	G	R	C	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SMOC-1_Human	V	V	H	R	G	R	C	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	130	140	150	160																																				
SMOC-1_AB	K	C	R	L	E	R	A	Q	A	L	K	Q	A	K	K	P	Q	E	S	I	F	I	P	E	C	N	D	D	G	T	F	A	Q	V	Q	C	H	T	L	T
SMOC-1_Köln	K	C	R	L	E	R	A	Q	A	L	E	Q	A	K	K	P	Q	E	S	I	F	I	P	E	C	N	D	D	G	T	F	A	Q	V	Q	C	H	T	L	T
SMOC-1_Maus	K	C	R	L	E	R	A	Q	A	L	E	Q	A	K	K	P	Q	E	A	V	F	V	P	E	C	G	E	D	G	S	F	T	Q	V	Q	C	H	T	Y	T
SMOC-1_Human	K	C	R	L	E	R	A	Q	A	L	E	Q	A	K	K	P	Q	E	A	V	F	V	P	K	C	G	E	D	G	S	F	T	Q	V	Q	C	H	T	Y	T
	170	180	190	200																																				
SMOC-1_AB	G	Y	C	W	C	V	T	P	D	G	K	P	V	S	G	S	S	V	Q	N	K	T	P	V	C	S	G	N	F	R	E	F	M	G	T	H	A	G	T	S
SMOC-1_Köln	G	Y	C	W	C	V	T	P	D	G	K	P	V	S	G	S	S	V	Q	N	K	T	P	V	C	S	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SMOC-1_Maus	G	Y	C	W	C	V	T	P	D	G	K	P	I	S	G	S	S	V	Q	N	K	T	P	V	C	S	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SMOC-1_Human	G	Y	C	W	C	V	T	P	D	G	K	P	I	S	G	S	S	V	Q	N	K	T	P	V	C	S	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	210	220	230	240																																				
SMOC-1_AB	G	L	S	G	S	V	T	D	K	P	P	G	P	P	S	S	G	K	K	D	D	G	S	K	P	T	P	T	M	E	P	H	V	V	P	E	G	E	E	I
SMOC-1_Köln	-	-	-	-	S	V	T	D	K	P	P	G	P	P	S	S	G	K	K	D	D	G	S	K	P	T	P	T	M	E	P	H	V	V	P	E	G	E	E	I
SMOC-1_Maus	-	-	-	-	P	V	T	D	K	P	L	S	Q	G	N	S	G	R	K	D	D	G	S	K	P	T	P	T	M	E	T	Q	P	V	F	D	G	D	E	I
SMOC-1_Human	-	-	-	-	S	V	T	D	K	P	L	S	Q	G	N	S	G	R	K	D	D	G	S	K	P	T	P	T	M	E	T	Q	P	V	F	D	G	D	E	I
	250	260	270	280																																				
SMOC-1_AB	T	A	P	T	L	W	I	K	Q	L	V	Y	K	E	N	K	Q	N	S	S	N	S	R	K	S	E	K	V	P	S	C	D	Q	E	R	Q	T	A	Q	D
SMOC-1_Köln	T	A	P	T	L	W	I	K	Q	L	V	Y	K	E	N	K	Q	N	S	S	N	S	R	K	S	E	K	V	P	S	C	D	Q	E	R	Q	T	A	Q	D
SMOC-1_Maus	T	A	P	T	L	W	I	K	H	L	V	I	K	D	S	K	L	N	N	T	N	V	R	N	S	E	K	V	H	S	C	D	Q	E	R	Q	S	A	L	E
SMOC-1_Human	T	A	P	T	L	W	I	K	H	L	V	I	K	D	S	K	L	N	N	T	N	I	R	N	S	E	K	V	Y	S	C	D	Q	E	R	Q	S	A	L	E

 290 300 310 320
SMOC-1_AB	E A R Q N P R E A I	F I P D C G L Q G L	Y K P V Q C H Q S T	G Y C W C V L V D T
SMOC-1_Köln	E A R Q N P R E A I	F I P D C G L Q G L	Y K P V Q C H Q S T	G Y C W C V L V D T
SMOC-1_Maus	E A R Q N P R E G I	V I P E C A P G G L	Y K P V Q C H Q S T	G Y C W C V L V D T
SMOC-1_Human	E A Q Q N P R E G I	V I P E C A P G G L	Y K P V Q C H Q S T	G Y C W C V L V D T
 330 340 350 360
SMOC-1_AB	G R P I P G T S A R	Y K K P E C D S A A	R S R D T E M E D P	F R D R D L T G C P
SMOC-1_Köln	G R P I P G T S A R	Y K K P E C D S A A	R S R D T E M E D P	F R D R D L T G C P
SMOC-1_Maus	G R P L P G T S T R	Y V M P S C E S D A	R A K S V E A D D P	F K D R E L E G C P
SMOC-1_Human	G R P L P G T S T R	Y V M P S C E S D A	R A K T T E A D D P	F K D R E L E G C P
 370 380 390 400
SMOC-1_AB	E G K K V E F I T S	L L D A L T T D M V	Q A I N S P T P S G	G G R F V E P D P S
SMOC-1_Köln	E G K K V E F I T S	L L D A L T T D M V	Q A I N S P T P S G	G G R F V E P D P S
SMOC-1_Maus	E G K K M E F I T S	L L D A L T T D M V	Q A I N S A A P T G	G G R F S E P D P S
SMOC-1_Human	E G K K M E F I T S	L L D A L T T D M V	Q A I N S A A P T G	G G R F S E P D P S
 410 420 430 440
SMOC-1_AB	H T L E E R V V H W	Y F A Q L D N N G S	H D I N K K E M K P	F K R Y V K K K A K
SMOC-1_Köln	H T L E E R V V H W	Y F A Q L D N N G S	H D I N K K E M K P	F K R Y V K K K A K
SMOC-1_Maus	H T L E E R V A H W	Y F S Q L D S N S S	D D I N K R E M K P	F K R Y V K K K A K
SMOC-1_Human	H T L E E R V V H W	Y F S Q L D S N S S	N D I N K R E M K P	F K R Y V K K K A K
 450 460 470 480
SMOC-1_AB	P K R C A R K F T D	Y C D L N K D K T I	S L Q E L K G C L G	V N K E G S T T S S
SMOC-1_Köln	P K R C A R K F T D	Y C D L N K D K T I	S L Q E L K G C L G	V N K E G S T T S S
SMOC-1_Maus	P K K C A R R F T D	Y C D L N K D K V I	S L P E L K G C L G	V S K E G G S L G S
SMOC-1_Human	P K K C A R R F T D	Y C D L N K D K V I	S L P E L K G C L G	V S K E G - - - -
 490 500 510 520
SMOC-1_AB	- S Q G T R S S G L	K T E S S R R		
SMOC-1_Köln	- S Q G T R Q G T N	L F S K		
SMOC-1_Maus	F P Q G K R A G T N	P F I G R L V		
SMOC-1_Human	- - - - -	- - - - - R L V		

Aminosäuresequenz-Vergleich von SMOC-2 in Zebrafisch, Maus und Mensch. Die Aminosäuresequenzen zweier Zebrafisch-Stämme (AB und Köln) werden mit den Sequenzen aus Maus und Mensch verglichen. Sind alle vier Sequenzen identisch, ist der Hintergrund blau, bei drei Sequenzen grün, gibt es paarweise Übereinstimmungen, ist der Hintergrund hellrot, fehlen diese, wird dunkelrot eingefärbt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
SMOC-2_AB	-	-	-	M	R	V	S	V	L	L	L	L	C	A	L	Y	A	G	N	-	A	H	K	L	S	A	L	T	F	L	R	V	E	Q	D	K	E	-	-	C
SMOC-2_Köln	-	-	-	M	R	V	S	V	L	L	L	L	C	A	L	Y	A	G	N	-	A	H	K	L	S	A	L	T	F	L	R	V	E	Q	D	K	E	-	-	C
SMOC-2_Maus	M	L	P	P	Q	L	C	W	L	P	L	L	A	A	L	L	P	P	V	P	A	Q	K	F	S	A	L	T	F	L	R	V	D	Q	D	K	D	R	D	C
SMOC-2_Human	M	L	L	P	Q	L	C	W	L	P	L	L	A	G	L	L	P	P	V	P	A	Q	K	F	S	A	L	T	F	L	R	V	D	Q	D	K	D	K	D	C
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80										
SMOC-2_AB	N	T	D	C	S	G	A	P	R	K	P	L	C	A	S	D	G	R	T	F	S	S	R	C	E	F	L	R	A	K	C	R	D	P	Q	L	A	V	S	-
SMOC-2_Köln	N	T	D	C	S	G	A	P	R	K	P	L	C	A	S	D	G	R	T	F	S	S	R	C	E	F	L	R	A	K	C	R	D	P	Q	L	A	V	S	-
SMOC-2_Maus	S	L	D	C	P	S	S	P	Q	K	P	L	C	A	S	D	G	R	T	F	L	S	R	C	E	F	Q	R	A	K	C	K	D	P	Q	L	E	I	A	H
SMOC-2_Human	S	L	D	C	A	G	S	P	Q	K	P	L	C	A	S	D	G	R	T	F	L	S	R	C	E	F	Q	R	A	K	C	K	D	P	Q	L	E	I	A	Y
	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120										
SMOC-2_AB	R	G	Q	C	K	D	T	P	K	C	V	A	E	K	K	Y	T	E	Q	Q	A	K	K	L	F	P	Q	V	F	V	P	V	C	N	P	D	G	T	Y	S
SMOC-2_Köln	R	G	Q	C	K	D	T	P	K	C	V	A	E	K	K	Y	T	E	Q	Q	A	K	K	L	F	P	Q	V	F	V	P	V	C	N	P	D	G	T	Y	S
SMOC-2_Maus	R	G	N	C	K	D	V	S	R	C	V	A	E	R	K	Y	T	Q	E	Q	A	R	K	E	F	Q	Q	V	F	I	P	E	C	N	D	D	G	T	Y	S
SMOC-2_Human	R	G	N	C	K	D	V	S	R	C	V	A	E	R	K	Y	T	Q	E	Q	A	R	K	E	F	Q	Q	V	F	I	P	E	C	N	D	D	G	T	Y	S
	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160										
SMOC-2_AB	E	V	Q	C	H	S	Y	T	G	Y	C	W	C	V	M	P	N	G	R	P	I	S	G	S	A	V	A	N	K	K	P	Q	C	Q	G	S	K	N	S	K
SMOC-2_Köln	E	V	Q	C	H	S	Y	T	G	Y	C	W	C	V	M	P	N	G	R	P	I	S	G	S	A	V	A	N	K	K	P	Q	C	Q	G	S	K	N	S	K
SMOC-2_Maus	Q	V	Q	C	H	S	Y	T	G	Y	C	W	C	V	T	P	N	G	R	P	I	S	G	T	A	V	A	H	K	T	P	R	C	P	G	S	I	N	E	K
SMOC-2_Human	Q	V	Q	C	H	S	Y	T	G	Y	C	W	C	V	T	P	N	G	R	P	I	S	G	T	A	V	A	H	K	T	P	R	C	P	G	S	V	N	E	K
	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200										
SMOC-2_AB	V	N	P	K	E	-	P	G	K	S	D	P	S	T	V	L	V	V	E	S	Q	P	S	V	D	E	E	D	I	I	S	Q	Y	P	T	L	W	S	E	Q
SMOC-2_Köln	V	N	P	K	E	-	P	G	K	S	D	P	S	T	V	L	V	V	E	S	Q	P	S	V	D	E	E	D	I	I	S	Q	Y	P	T	L	W	S	E	Q
SMOC-2_Maus	V	P	Q	R	E	G	A	G	K	A	D	D	A	A	A	P	A	L	E	T	Q	P	Q	G	D	E	E	D	I	A	S	R	Y	P	T	L	W	T	E	Q
SMOC-2_Human	L	P	Q	R	E	G	T	G	K	T	D	D	A	A	A	P	A	L	E	T	Q	P	Q	G	D	E	E	D	I	A	S	R	Y	P	T	L	W	T	E	Q
	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240										
SMOC-2_AB	V	R	S	R	Q	N	R	T	-	R	T	Q	S	T	S	C	D	Q	E	Q	L	S	A	Q	E	E	A	R	Q	H	K	N	E	A	V	F	V	P	D	C
SMOC-2_Köln	V	R	S	R	Q	N	R	T	-	R	T	S	A	T	S	C	D	Q	E	Q	L	S	A	Q	E	E	A	R	Q	H	K	N	E	A	V	F	V	P	D	C
SMOC-2_Maus	V	K	S	R	Q	N	K	T	N	K	N	S	A	S	S	C	D	Q	E	H	Q	S	A	L	E	E	A	K	Q	P	K	N	D	N	V	V	I	P	E	C
SMOC-2_Human	V	K	S	R	Q	N	K	T	N	K	N	S	V	S	S	C	D	Q	E	H	Q	S	A	L	E	E	A	K	Q	P	K	N	D	N	V	V	I	P	E	C
	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280										
SMOC-2_AB	A	S	G	G	L	Y	K	P	V	Q	C	H	P	S	T	G	Y	C	W	C	V	L	V	D	T	G	R	P	I	P	G	T	S	T	R	H	E	Q	P	K
SMOC-2_Köln	A	S	G	G	L	Y	K	P	V	Q	C	H	P	S	T	G	Y	C	W	C	V	L	V	D	T	G	R	P	I	P	G	T	S	T	R	H	E	X	T	K
SMOC-2_Maus	A	H	G	G	L	Y	K	P	V	Q	C	H	P	S	T	G	Y	C	W	C	V	L	V	D	T	G	R	P	I	P	G	T	S	T	R	Y	E	Q	P	K
SMOC-2_Human	A	H	G	G	L	Y	K	P	V	Q	C	H	P	S	T	G	Y	C	W	C	V	L	V	D	T	G	R	P	I	P	G	T	S	T	R	Y	E	Q	P	K

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Mats Paulsson danke ich ganz herzlich für die interessante Themenstellung, seine Unterstützung und die Möglichkeit zur Durchführung dieser Doktorarbeit unter sehr guten Bedingungen. Des Weiteren möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, an wissenschaftlichen Seminaren und Kongressen teilzunehmen.

Frau Dr. Ursula Hartmann danke ich für die fachliche Betreuung, freundschaftliche und engagierte Unterstützung sowie das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dohmen danke ich für die freundliche Bereitschaft das Koreferat zu übernehmen, Herrn Prof. Dr. Klein für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Herrn Dr. Eble danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit zwischen Köln und Münster und die Bereitstellung von Proteinen und Antikörpern.

Herrn Dr. Przemko Tylzanowski danke ich für die interessante und effektive Kooperation zwischen Leuven und Köln in Bezug auf Zebrafisch- und Bindungsstudien.

Frau Dr. Zigrino und Herrn Stratis danke ich für Bereitstellung der Wundheilungs- bzw. Psoriasischnitte. Frau Dr. Nischt für die fachlichen Ratschläge und die Bereitstellung von Antikörpern.

Hanni, Sani, Monika, Birgit, Christian, Barbara, Wieslaw und Gerda möchte ich danken, dass sie immer mit Rat und Tat zur Stelle waren.

Mille, Beeker und Andreas danke ich für ihre Hilfe bei Computerproblemen und Herrn Dr. Frank Zaucke für die Versorgung mit interessanten Veröffentlichungen und ein immer offenes Ohr.

Meiner Arbeitsgruppe, mit allen, die im Verlauf der letzten drei Jahre dazugehörten, und allen Mitarbeitern unseres Institutes möchte ich ganz herzlich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und ihre stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft danken. Stellvertretend seien hier genannt Christiane und meine tollen Smythies – Kerstin, Susan und Sebastian.

Allen Freunden, die nicht Kollegen sind, danke ich für ihr Interesse und den Ausgleich, den sie zum Laboralltag geschaffen haben, hier sei besonders Sandra genannt.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, Armin, Simon und besonders meinen Eltern, dass sie immer für mich da waren und mir diese Arbeit ermöglicht haben. Ohne Euch hätte ich es nicht geschafft - Danke!

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat, dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Mats Paulsson betreut worden.

Köln, 08.02.2006

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Silke Maier
Anschrift	Landgrafenstr. 2, 50931 Köln
Geburtsdatum/-ort	24.10.1976 in Dielheim
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

1983-1987	Grundschule Dielheim
1987-1996	Gymnasium Wiesloch

Hochschulbildung

WS 1996/97 – SS 2000	Studium der Biologie an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
10.07.2000-09.03.2001	Diplomarbeit am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg bei Prof. Dr. Peter H. Kramer, Thema: Regulationsmechanismen der TRAIL-induzierten Apoptose in humanen lymphoiden Tumorzelllinien
10.03.2001-30.11.2001	Wissenschaftliche Arbeit am DKFZ Heidelberg: fortführende Experimente zur Diplomarbeit
01.12.2001-31.12.2002	Wissenschaftliche Arbeit am Max-Planck-Institut, Martinsried bei Prof. Dr. Hartmut Wekerle, Thema: Gentherapie bei Multipler Sklerose

Doktorarbeit

01.01.2003-dato	Promotion an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln im Fach Physiologische Chemie am Institut für Biochemie II der Medizinischen Fakultät bei Prof. Dr. Mats Paulsson, Thema: Analyse der Expression und Funktion von SMOC-1 und SMOC-2
Köln, 08.02.2006	