

**Isolierung und Charakterisierung  
neuer extrazellulärer Calcium-bindender  
Proteine der BM-40 Familie**

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

vorgelegt von  
Christian Vannahme  
aus Opladen (Leverkusen)

LineArt, Köln

2000

Berichtersteller: Prof. Dr. M. Paulsson  
Prof. Dr. D. Schomburg

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Februar 2001

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>6</b>
<b>I Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1 Die extrazelluläre Matrix	8
1.2 Domänen in extrazellulären Proteinen	8
1.3 Die Komponenten der ECM	9
1.3.1 Kollagene	9
1.3.2 Proteoglycane	10
1.3.3 Laminin als Beispiel eines nicht-kollagenen Glycoproteins	12
1.4 Die Basalmembran	13
1.5 BM-40/SPARC/Osteonectin - Drei Namen für ein Calcium-bindendes Protein der extrazellulären Matrix	14
1.6 Die EC-Domäne im BM-40 - Einzig in extrazellulären Proteinen ?	16
1.7 Die Physiologische Rolle von Calcium	18
1.8 Aufgabenstellung	19
<b>II Ergebnisse</b>	<b>20</b>
2.1 Durchmustern der cDNA Bibliothek nach SMOC-1 und SMOC-2	20
2.2 Domänenaufbau von SMOC-1 und SMOC-2	22
2.3 Genomische Struktur von humanem SMOC-1 und SMOC-2	27
2.4 Gewebeverteilung von SMOC-1 und SMOC-2 mRNA	29
2.5 Rekombinante Expression von SMOC	32
2.5.1 Reinigung von rekombinantem SMOC-1	33
2.5.2 Produktion und Affinitätsreinigung polyklonaler Antiseren gegen SMOC-1	35
2.5.3 Analyse der N-Glycosylierung von SMOC-1	35
2.5.4 Sekundärstrukturuntersuchung an SMOC-1 mittels Circular-dichroismus Spektroskopie	36
2.5.5 Massenspektroskopie von SMOC-1	37
2.5.6 Expression von SMOC-1 in HT 1080 Zellen	37
2.5.7 Rekombinante Expression von murinem SMOC-2 in EBNA-293 Zellen	39
2.5.8 Analyse der N-Glycosylierung von SMOC-2	40
2.5.9 CD-Spektroskopie an rekombinantem SMOC-1 und SMOC-2	42

2.5.10	Produktion und Affinitätsreinigung polyklonaler Seren gegen SMOC-2	44
2.5.11	Analyse der Kreuzreaktivität von SMOC-1 und SMOC-2 Antiseren innerhalb der BM-40 Familie	44
2.6	Endogene Expression von SMOC-1 und SMOC-2 in verschiedenen Zelltypen	45
2.7	Immunhistochemische Untersuchungen mit Antiseren gegen SMOC-1 und SMOC-2	46
2.8	Inhibition des SMOC-1-Antiserum auf Gewebeschnitten	52
2.9	Analyse der SMOC-1-Expression an Maus-Oocyten	53
2.10	<b>Neue Testicanhomologe</b>	55
2.11	Durchmusterung der cDNA-Bibliothek nach Testican-2 und Testican-3	55
2.12	Domänenaufbau der Testicane	57
2.13	Gewebeverteilung der Testican mRNA	61
2.14	In situ Hybridisierung mit Testican-2	62
2.15	Rekombinante Expression von Testican-2	63
2.16	Rekombinante Expression von Testican-3	64
2.17	CD-Spektroskopie an rekombinatem Testican-2 und Testican-3	66
 <b>III Diskussion</b>		 <b>69</b>
3.1	SMOC-1, SMOC-2, Testican-2 und Testican-3 - Neue Mitglieder der BM-40 Familie	69
3.2	Follistatin- und Kazal-Domäne	72
3.3	Thyroglobulin-Domäne	72
3.4	Extrazelluläre Calcium-bindende Domäne	75
3.5	Verwandtschaft der BM-40 Familienmitglieder	76
3.6	Rekombinante Expression von SMOC-1 und SMOC-2	77
3.7	Calciumbindung der neuen Familienmitglieder	79
3.8	Lokalisation der neuen Mitglieder der BM-40 Familie in Zellen und Gewebe..	81
3.9	Calciumhomöostase und EC-Domänen	84
 <b>IV Material und Methoden</b>		 <b>85</b>
4.1	In-silico Methoden	85
4.2	Allgemeine molekularbiologische Verfahren	85
4.2.1	Agarose-Gelelektrophorese	85
4.2.2	Plasmid Präparationen	85
4.2.3	<i>E. coli</i> Bakterien	86

4.3	Isolierung neuer cDNA-Klone . . . . .	86
4.3.1	Ausplattieren der cDNA- Bibliothek . . . . .	86
4.3.2	Filterabklatsch der Phagenplaques . . . . .	86
4.3.3	Radioaktive Markierung der Sonden . . . . .	87
4.3.4	Durchmustern der CLONTECH- cDNA- Bibliothek . . . . .	87
4.3.5	Überführung der $\lambda$ -DNA in pDR2-Vektor . . . . .	87
4.3.6	Durchmustern der STRATAGENE- cDNA Bibliothek . . . . .	88
4.3.7	Sonden für Testican-2 und Testican-3 . . . . .	88
4.4	Nukleinsäuresequenzierung . . . . .	89
4.5	Northern Blotting . . . . .	89
4.6	In-situ Hybridisierung . . . . .	90
4.7	Synthese von Komplementär-DNA (cDNA) . . . . .	91
4.8	Southern Blotting . . . . .	92
4.9	Amplifizierung der Expressionskonstrukte . . . . .	92
4.10	Kultur eukaryotischer Zellen und rekombinante Expression . . . . .	93
4.10.1	Handhabung von EBNA 293-Zellen . . . . .	94
4.10.2	Inkubationsbedingungen . . . . .	94
4.10.3	Zellkulturmedium . . . . .	94
4.10.4	PBS (Phosphate buffered saline) . . . . .	95
4.10.5	Umsetzen der Zellen . . . . .	95
4.10.6	Transfektion durch Elektroporation . . . . .	95
4.10.7	Selektion transfizierter Zellen . . . . .	96
4.11	Proteinchemische Arbeiten . . . . .	96
4.11.1	Chromatographische Verfahren . . . . .	96
4.11.2	Ionenaustausch-Chromatographie . . . . .	96
4.11.3	Gelfiltration . . . . .	97
4.11.4	FPLC (Fast Performance Liquid Chromatographie) . . . . .	97
4.11.5	Affinitätsreinigung mittels Histidinmotiv . . . . .	98
4.12	Allgemeine proteinchemische Verfahren . . . . .	98
4.12.1	SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) und Proteinfärbung . . . . .	99
4.12.2	Analyse der N-Glycosylierung von Proteinen . . . . .	99
4.12.3	Immunoblotverfahren . . . . .	99
4.12.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen . . . . .	100
4.13	Affinitätsreinigung von polyklonalem Serum . . . . .	101
4.14	Paraffineinbettung von Mausgeweben . . . . .	101

4.15	Entparaffinierung und Immunfärbung von Paraffinschnitten . . . . .	102
4.16	Inhibitionsversuche auf Gewebeschnitten . . . . .	102
4.17	Immunfluoreszenzfärbung von Maus Oocyten . . . . .	103
4.18	Circular Dichroismus (CD) Spektroskopie . . . . .	103
	<b>V Literatur</b> . . . . .	<b>105</b>
	Verzeichnis der Abkürzungen . . . . .	115
	Danksagung . . . . .	116
	Erklärung . . . . .	117
	Kurzzusammenfassung . . . . .	118
	Lebenslauf . . . . .	120

## Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, neue Mitglieder einer extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteinfamilie, der BM-40 Familie, zu suchen und diese zu charakterisieren. Alle bekannten Familienmitglieder besitzen einen modularen Aufbau und enthalten eine Follistatin-ähnliche- (FS) und eine extrazelluläre Calcium-bindende-(EC) Domäne. Ausgangspunkt der Suche war eine Datenbankanalyse, wobei die Nukleinsäuresequenzen aller bekannten Proteine der BM-40 Familie zur Suche neuer, potentieller Homologe eingesetzt wurden. Diese Suche lieferte vier unabhängige EST-Klone. Teile dieser Klone wurden zur Generierung radioaktiv markierter Sonden genutzt, um cDNA-Bibliotheken nach den vollständigen Nukleinsäuresequenzen zu durchmustern. Im Rahmen dieser Arbeit gelang die Isolierung der kompletten cDNA-Sequenzen für vier bislang unbekannte Homologe. Zwei Klone stellten sich dabei als Untergruppe der BM-40 Familie heraus, die einen bisher unbekanntem Domänenaufbau zeigen, wobei die für die Familie typischen FS- und EC-Domänen vorhanden sind. Die beiden neuen Vertreter wurden als SMOC-1 und SMOC-2 bezeichnet (**s**ecreted **m**odular **c**alcium-binding protein). Northern-Blots zeigten, daß SMOC-1 und -2 Transkripte in der Maus in Gehirn, Thymus, Lunge Hoden und Eierstöcken zu finden sind, während sich Ihre Expression in den anderen Geweben unterscheidet. Die RT-PCR zeigte, in Kombination mit einem Southern-Blot, für beide SMOC-Transkripte eine breitere Gewebeverteilung an, als diese aus dem Northern-Blot zu erkennen war. Mittels PCR wurden Konstrukte amplifiziert, die den gesamten offenen Leserahmen der cDNAs enthielten. Mit diesen wurde SMOC-1 und -2 rekombinant in humanen, embryonalen Nierenzellen (EBNA-293) exprimiert und aufgereinigt. Antisera gegen die Proteine wurden in Kaninchen und Meerschweinchen produziert und diese zur Untersuchung der Gewebeverteilung der Proteine benutzt. Hierbei stellte sich heraus, daß SMOC-1 im Gewebe fast immer in der Basalmembranzzone mit Laminin kolokalisiert ist. Die einzige deutliche Abweichung von der allgemeinen Kolokalisation fand man in Eierstockgewebe. Dort findet man Laminin in der Basalmembran, welche die Follikel umgibt, während SMOC-1 in einer Zone um die Oocyten auftritt und wahrscheinlich mit der Membran der Oocyte assoziiert ist. Für SMOC-2 konnte mit den erhaltenen Antisera keine Gewebefärbung erhalten werden. Circular dichroismus (CD)-Messungen zum Nachweis der Calciumbindung wurden mit den gereinigten Proteinen durchgeführt. Auch eine vorhergesagte N-Glycosylierung konnte nachgewiesen werden.

Im einem zweiten Projekt gelang es, die vollständigen cDNA-Klone für zwei neue Testican-Homologe zu isolieren, die als Testican-2 und Testican-3 bezeichnet wurden. Beide zeigten einen zum bekannten Testican-1 identischen Domänenaufbau und unterschieden sich nur geringfügig in der Länge der Transkripte. Aufgrund der Hybridisierungsbedingungen beim Durchmustern der cDNA-Bibliothek konnte außerdem die vollständige cDNA für Testican-1 isoliert werden. Die Verteilung der mRNA wurde für alle drei Testicane auf der Ebene des Northern-Blot untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß alle Testicane im Gehirn vorkommen. Während Testican-1 und -3 in der Maus auf dieses Organ beschränkt sind, findet man für Testican-2 weitere Signale in Lunge und Hoden. Die Expression von Testican-2 wurde mittels in-situ-Hybridisierung auf murinen Gehirnschnitten untersucht und bestätigt. Für die beiden neuen Testicane wurden Konstrukte erstellt, um die Proteine voller Länge im EBNA-System rekombinant zu exprimieren. Für Testican-2 wurde ein um die N-terminale Domäne verkürztes Protein exprimiert und gereinigt, da das Konstrukt voller Länge keine Expression zeigte. Testican-3 konnte dagegen in voller Länge exprimiert und gereinigt werden. Gegen Testican-3 wurden je ein Antiserum in Kaninchen und Meerschwein produziert. CD-Messungen zur Untersuchung der Calcium-Bindung wurden mit Testican-2 aus Maus und humanem Testican-3 unternommen. Dabei zeigte nur das humane Material eine reversible, Calcium-abhängige Konformationsänderung.

# **I Einleitung**

## **1.1 Die extrazelluläre Matrix**

Unter dem Begriff extrazelluläre Matrix (ECM) faßt man alle Makromoleküle zusammen, die in Geweben den Raum zwischen den Zellen ausfüllen. Dazu gehören unterschiedliche Polysaccharide, Proteoglycane und Proteine. Sie bilden ein hochorganisiertes Netzwerk aus, welches dem entsprechenden Gewebe seine physikalischen Eigenschaften verleiht (Aumailley und Gayraud, 1998). Dabei fällt dieser Matrix mehr als nur eine Struktur- oder Barrierenfunktion zu, wie besonders in den letzten Jahren deutlich wurde. Die Proteine der extrazellulären Matrix interagieren beispielsweise direkt mit Oberflächenrezeptoren von Zellen und initiieren damit Signalkaskaden, wie z.B. bei der Bindung von Laminin an Brust-Epithel Zellen, welche die Prolactin und Insulin-Signal-Kaskade aktivieren und so eine Apoptose verhindern. Ein Kontakt der Zellen mit Kollagen I würde dagegen zur Apoptose des Epithels führen (Edwards et al., 1998, Lee et al, 1999). Weiterhin kontrolliert die ECM die Modulation vieler Wachstumsfaktoren, Differenzierungs-Faktoren, Cytokine etc. (Streuli, 1999).

Die extrazelluläre Matrix setzt sich aus einer Vielzahl an Komponenten zusammen. Dazu zählen neben den Kollagenen u.a. die Laminine, aber auch Proteoglycane (z.B. Perlecan und Aggrecan) sowie Fibrilline, Matriline, Thrombospondine und viele weitere (Aumailley und Gayraud, 1998; Deák et al., 1999). Proteine, die aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften unterschiedlichen Familien zugerechnet werden zeigen oft Sequenzhomologien innerhalb definierter Bereiche, den sogenannten Modulen oder Domänen. Ein modularer Aufbau findet sich vor allem in extrazellulären Proteinen häufig wieder. Was versteht man unter einem Modul und welche Voraussagen lassen sich für modulare Proteine aus ihrer Sequenz ableiten ?

## **1.2 Domänen in extrazellulären Proteinen**

Unter einer Domäne versteht man eine eigenständige Faltungseinheit innerhalb einer Proteinsequenz, deren Länge variiert und zwischen 50 und 300 Aminosäurereste umfassen kann. Besonders in extrazellulären Proteinen ist deren Aufbau aus verschiedenen Domänen weit verbreitet. Homologe Domänen gleichen sich nicht nur auf der Sequenzebene, sondern besitzen auch ähnliche Sekundär- und Tertiärstrukturen. Diese strukturellen Homologien

können aus der Sequenz jedoch nur vorhergesagt werden und müssen durch biophysikalische Verfahren (NMR, Röntgenstruktur Analyse) abgesichert werden. Unterstrukturen von Domänen werden als Module bezeichnet. Sie besitzen ein Aminosäuremuster, aus welchem eine Konsensus-Sequenz abgeleitet werden kann. Anhand dieser Konsensus-Sequenz kann ein Modul durch den Sequenzvergleich zweier Proteine identifiziert werden, auch wenn diese, z.B. wegen anderer Domänen in direkter Nachbarschaft, ansonsten nicht homolog sind. Die Verbreitung von Modulen in Proteinen geht wahrscheinlich auf Mechanismen wie das Exon-shuffling zurück. Dabei handelt es sich um die Insertion von Exons in die Introns existierender Gene. Für diesen Vorgang sind transponierbare Elemente verantwortlich, die über das gesamte Genom verteilt sind und bei höheren Eukaryoten bis zu 10 % des Genoms ausmachen können (Finnegan, 1989). Dies stellt einen besonders effektiven Weg der Duplikation und Durchmischung von Exons dar und so können transponierbare Elemente dazu beitragen neue Gene zu schaffen. Wichtig für den shuffling-Prozess ist dabei, daß die Phasengrenzen an den Übergängen zwischen Exon und Intron kompatibel und symmetrisch sind, da unsymmetrische Domänengrenzen einen Abbruch des Leserasters bedingen würden. Von den drei möglichen Phasengrenzen 1-1, 2-2 und 0-0 findet man an den Domänengrenzen extrazellulärer Proteine häufig die Kombination 1-1 (Patthy, 1991).

### **1.3 Die Komponenten der ECM**

Wie bereits angedeutet, besteht die ECM aus einer Vielzahl unterschiedlicher Proteine. Diese können in drei Klassen unterteilt werden: Faserproteine (z.B. Kollagen), Proteoglycane und Hyaluronsäure und nicht-kollagene Glycoproteine bzw. Adhäsions-Proteine. Da in dieser Arbeit keine erschöpfende Beschreibung aller Proteine der ECM vorgestellt werden kann, sollen exemplarisch einige wichtige Komponenten kurz beschrieben werden.

#### **1.3.1 Kollagene**

Die Familie der Kollagene stellt die Gruppe extrazellulärer Proteine mit den meisten Vertretern dar. Es handelt sich um homo- oder heterotrimere Proteine, deren jeweilige Untereinheit die  $\alpha$ -Ketten eigenständige Genprodukte sind. Bis heute sind 34 verschiedene  $\alpha$ -Ketten beschrieben, aus denen 19 unterschiedliche Kollagene aufgebaut werden. Die  $\alpha$ -Ketten besitzen eine variierende Anzahl an typischen Gly-X-Y-Wiederholungen

(mit X-Pro, Y=Hyp; Hyp=Hydroxyprolin), die für die Ausbildung der Kollagen Tripelhelix notwendig sind. Neben diesen Abschnitten findet man weitere, nicht-kollagene Domänen in den  $\alpha$ -Ketten. Je nach Zusammensetzung aus kollagenen und nicht-kollagenen Domänen unterscheidet man Fibrillen-formende und nicht Fibrillen-formende Kollagene. Zu den Fibrillen-formenden rechnet man die Kollagene des Typ I, II, III, V und XI. Diese können lange Kollagenfibrillen bilden, die sich zu Kollagenfasern von mehreren Mikrometer Durchmesser zusammenlagern. Kollagene vom Typ IX, XII, XIV, XVI und XIX werden als Fibrillen-assoziierte Kollagen bezeichnet (FACIT; Engl.: fibril-assoiated collagen with interrupted triple helix), da sie an der Oberfläche der Kollagenfasern für deren Vernetzung untereinander oder mit anderen ECM-Komponenten verantwortlich sind. Kollagen Typ-IV und VII werden als netzbildende Kollagene bezeichnet. Typ IV Kollagen ist ein Hauptbestandteil der Basalmembran und für deren netzwerkartige Struktur verantwortlich, während Kollagen Typ VII Dimere bildet, die sich zu Verankerungsfibrillen verbinden und dazu beitragen, die Basalmembran vielschichtiger Epithelien, z.B. in der Haut mit dem Bindegewebe zu verknüpfen.

### 1.3.2 Proteoglycane

Proteoglycane bestehen aus einem Proteinanteil mit kovalent gebundenen Glycosaminoglycanen (GAG). Der Zuckeranteil kann dabei, im Gegensatz zu Glycoproteinen, die zwischen 1 % und 60 % Zucker in gebundener Form enthalten, bis zu 95 % betragen. Die Zucker der Proteoglycane sind unverzweigte Polysaccharidketten aus sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten. Einer der beiden Zuckerreste ist dabei stets ein Aminozucker, entweder N-Acetylglucosamin oder N-Acetylgalactosamin. In den meisten Fällen ist der Aminozucker mit einer Sulfatgruppe verbunden. Der zweite Zucker ist meist eine Uronsäure (Glucuronsäure oder Iduronsäure). Die Polysaccharidketten werden im Golgi-Apparat über ein Trisaccharid an einen Serinrest der Kernproteins gebunden. Im Falle des Keratansulfates kann diese Kopplung alternativ über einen Threonin- oder Asparaginrest erfolgen (Fosang und Hardingham, 1996). Aufgrund der Sulfat- oder Carboxylatgruppe an den meisten Zuckerresten, tragen die Glycosaminoglycane eine starke negative Ladung. Die Glycosaminoglycane können abhängig von Zuckerresten, deren Verknüpfung, Anzahl gebundenen Sulfatgruppen und deren Position in vier Hauptgruppen unterteilt werden:

1. Hyaluronan, 2. Chondroitinsulfat und Dermatansulfat, 3. Heparansulfat und Heparin und
4. Keratansulfat.

Das Hyaluronan ist das einfachste Glycosaminoglycan. Es besteht aus bis zu 25000 sulfatfreien Disaccharideinheiten, die nicht an einen Proteinkern gebunden sind. Hyaluronan ist ein wichtiger Bestandteil der Gelenkflüssigkeit und erfüllt wichtige Aufgaben während der Embryonalentwicklung.

Im Bindegewebe machen die Proteoglycane meist weniger als 10 Gewichtsprozent der Faserproteine aus. Sie bilden schon bei geringen Konzentrationen Gele aus. Aufgrund ihres hydrophilen Charakters und ihrer negativen Ladung lagern sie Kationen und damit große Wassermengen in der Matrix ein. So entsteht ein Quelldruck (Turgor), der auftretenden Druckkräften einen Widerstand entgegensetzt und so die Matrix bei moderater Belastung vor Deformationen schützt. Wichtige Proteoglycane der extrazellulären Matrix sind z.B. Aggrecan, das wichtigste Proteoglycan des Knorpels. Perlecan ist ein Bestandteil der Basalmembran und beispielsweise im Nierenglomerulus mitverantwortlich für die Blutfiltration (Timpl, 1993).

Die Expression von Proteoglycanen ist jedoch nicht, wie lange angenommen wurde nur auf strukturelle Gewebe wie Knorpel oder Bindegewebe beschränkt. Frühe biochemische Untersuchungen zeigten, daß im Rattengehirn mindestens 25 verschiedene Proteoglycane existieren (Herndon und Lander, 1990). Mittlerweile sind viele Proteoglycane bekannt, wie z.B. Brevican, Neurocan und Testican, die ausschließlich im Nervensystem vorkommen. Ihre Funktionen sind weitgehend ungeklärt (Bandtlow und Zimmermann, 2000; Hartmann und Maurer, submitted). Einige Proteoglycane, darunter Phosphacan sind maßgeblich am Auswachsen und der Lenkung des Neuritenwachstums beteiligt. Sie können dabei in Abhängigkeit von Neuronentyp sowohl inhibitorisch als auch permissiv wirken (Garwood et al., 1999). Neuere Untersuchungen in *Drosophila* weisen darauf hin, daß manche Proteoglycane eine Rolle während der Entwicklung spielen. Bei der Untersuchung von Entwicklungsmutanten wurde festgestellt, daß die verantwortlichen Enzyme an der Biosynthese der GAG-Ketten beteiligt waren (Selleck, 2000). Dies zeigt, daß die GAG-Ketten nicht nur die Struktur eines Proteoglycans ausmachen, sondern essentiell dessen Funktion beeinflussen können.

### 1.3.3 Laminin als Beispiel eines nicht-kollagenen Glycoproteins

Laminine sind Glycoproteine, die sich durch eine heterotrimere Zusammensetzung aus je einer  $\alpha$ -, einer  $\beta$ - und einer  $\gamma$ -Kette auszeichnen. Sie stellen einen wesentlichen Bestandteil der Basalmembranen dar. Mittlerweile sind fünf  $\alpha$ -Ketten, drei  $\beta$ -Ketten und drei  $\gamma$ -Ketten beschrieben, aus denen sich insgesamt 15 verschiedene Laminine aufbauen. Durch die Verknüpfung dreier Ketten in der Zusammensetzung  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  bildet sich die charakteristische kreuzförmige Laminin-Struktur aus. Sie weist einen langen und zwei kurze Arme auf. Eine Ausnahme bildet das Laminin-5, welches aufgrund seiner Zusammensetzung aus verkürzten Ketten ( $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ ) nicht über diese Arme verfügt. Alle Laminin Ketten besitzen in der C-terminalen Region Heptad-Wiederholungen, die für die Trimerisierung über eine coiled-coil-Domäne essentiell sind. Eine zusätzliche Stabilisierung erfolgt über die Ausbildung von Disulfid-Brücken (Barlow et al., 1984; Paulsson et al., 1995). Die  $\alpha$ -Ketten besitzen zusätzlich eine C-terminale Domäne, die G-Domäne, die aus fünf globulären Bereichen besteht und eine Affinität für Heparin zeigt. Ähnliche G-Domänen sind aus Perlecan, Agrin und anderen Proteinen bekannt (Rupp et al., 1991; Kallunki und Tryggvason, 1992). Der N-terminale Teil der Laminine wird aus der Kombination zweier weiterer Domänen aufgebaut. Die LE-Domänen sind ähnlich zur EGF-Domäne, enthalten jedoch acht Cystein-Reste, während die EGF-Domäne nur sechs Cysteine enthält. Domäne VI ist eine globuläre Domäne, die spezifisch für Laminin ist und nur wenige Cysteine enthält. Über die Domäne VI sind alle Untereinheiten des Laminin an der Calcium-abhängigen Selbstaggregation zu einem Geflecht beteiligt (Yurchenko und Schittny, 1990). Eine Ausnahme bilden die Laminin-Isoformen an deren Aufbau eine  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$  oder  $\gamma_2$ -Kette beteiligt ist, da diese keine Domäne VI enthalten.

Laminin-1 ( $\alpha_1\beta_1\gamma_1$ ) war das erste Mitglied dieser Familie, welches charakterisiert wurde (Timpl et al., 1979; Engel et al., 1989). Es wird bereits in der frühen Embryogenese exprimiert und bildet die ersten Basalmembranen aus, die in dieser frühen Phase noch wenig oder gar kein Kollagen IV enthalten. Eine  $\gamma_1$ -defiziente Maus kann sich nicht über Embryonaltag 5 hinaus entwickeln, da keine Basalmembran gebildet wird (Smyth et al., 1999). Weiterhin spielen Laminine eine wichtige Rolle bei Prozessen wie der Gehirnentwicklung (Mercuri et al., 1996), der Nierenentwicklung (Ekblom et al., 1980; Ekblom, 1981) und bei biologischen Prozessen wie der Differenzierung und Organisation von Zellen.

## 1.4 Die Basalmembran

Eine der wichtigsten Strukturen innerhalb der extrazellulären Matrix ist die Basalmembran (Paulsson, 1992; Timpl, 1996;). Sie bildet eine dünne, extrem widerstandsfähige Schicht an der Grenze von epitheliale oder endotheliale Gewebe und dem benachbarten Stroma. Aber auch in anderen Geweben ist sie vorhanden, z.B. umschließt sie Muskel- und Fettzellen und ummantelt periphere Nerven (Vracko, 1974).

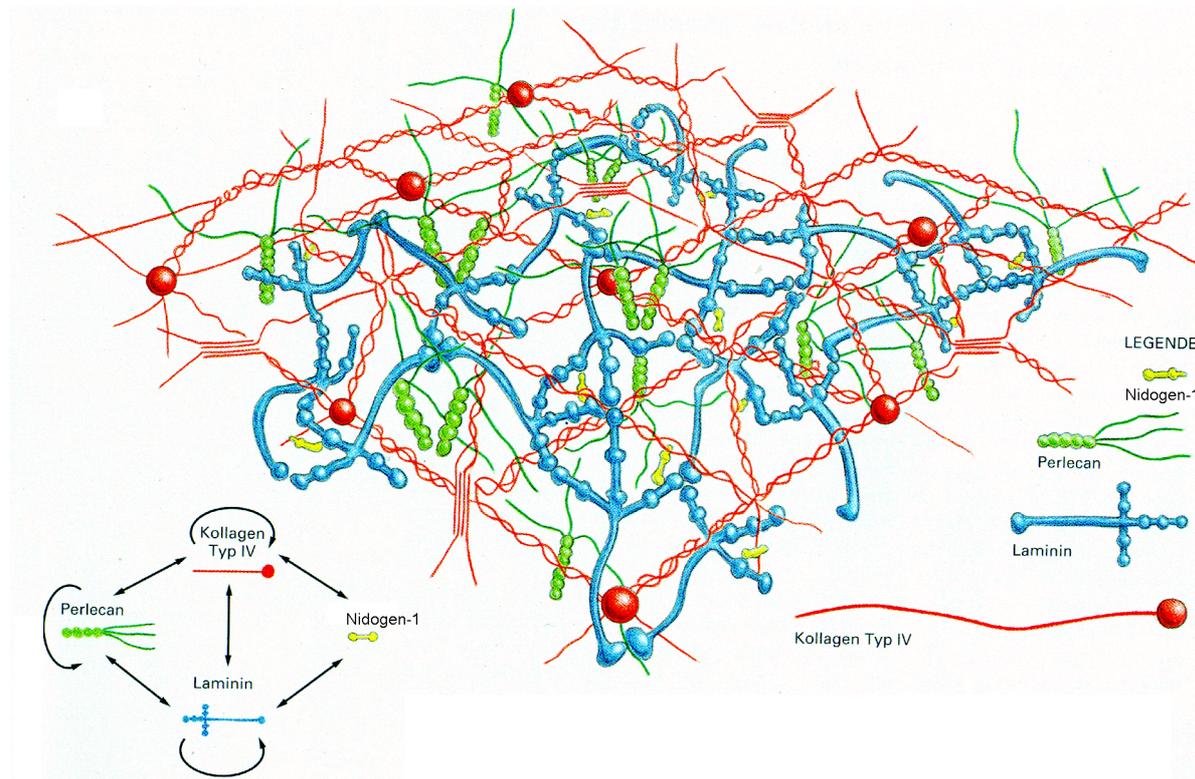


Abbildung 1.1 **Schematische Darstellung der Basalmembranorganisation.** Die Abbildung zeigt die Interaktionen der wichtigsten Basalmembranbestandteile. Man erkennt zwei unabhängige Netzwerke aus Laminin und Kollagen IV, welche über Nidogen-1 miteinander verknüpft sind. (Nach Yurchenko und Schittny, 1990).

Die Basalmembran besteht überwiegend aus verschiedenen Laminin-Formen, Kollagen Typ IV, Proteoglycanen und Nidogen/Entactin (Abbildung 1.1). Laminin und Kollagen IV bilden jeweils ein eigenes Netzwerk aus. Dabei ist zumindest die Ausbildung des Laminin-Netzwerkes essentiell mit der Anwesenheit von Calcium-Ionen verbunden. Diese beiden Netzwerke werden dann miteinander über Nidogen-1 verknüpft. Die in Abbildung 1.1 gezeigte schematische Struktur der Basalmembran basiert weitgehend auf in-vitro Experimenten. Da die physiologische Umgebung durch die Anwesenheit weiterer Proteine und Kofaktoren weitaus komplexer ist, handelt es sich hier nur um eine grobe Näherung, die durch weitere in-vivo Experimente verfeinert werden muß. So gibt es

beispielsweise weitere Proteine wie Agrin oder das BM-40/SPARC/ Osteonectin die mit der Basalmembran assoziiert sind, deren Funktion in diesem Zusammenhang jedoch nicht bekannt ist.

### **1.5 BM-40/SPARC/Osteonectin - Drei Namen für ein Calcium-bindendes Protein der extrazellulären Matrix**

BM-40 wurde fast zeitgleich von drei Arbeitgruppen entdeckt und beschrieben. Ursprünglich wurde es als nicht-kollagener Bestandteil aus der Knochenmatrix isoliert und als Osteonectin bezeichnet (Termine et al., 1981). SPARC (secreted protein that is acidic and rich in cysteines) wurde aus parietalem Endoderm der Maus isoliert (Mason et al., 1986). Weiterhin ist es eine Komponente des Engelbrecht-Holm-Swarm (EHS)-Tumors der Basalmembran und konnte aus diesem als Glycoprotein mit einem apparenten Molekulargewicht von 40 kDa (BM-40) isoliert werden (Dziadek, et al., 1986).

Resultate aus in-vitro Untersuchungen ergaben, daß BM-40 die Zell-Adhäsion zerstört (Murphy-Ullrich, 1995), das es Veränderungen in der Zellmorphologie bedingt (Sage et al, 1989; Lane und Sage, 1990), den Zell-Zyklus unterbricht (Funk und Sage, 1991, 1993), die Zelldifferenzierung reguliert (Bassuk et al., 1999), die Reaktion von Zellen auf einige Wachstumsfaktoren hemmt (Raines et al., 1992; Kupprion et al., 1998) und regulierende Wirkung auf die Produktion von Matrix-Metalloproteinasen zeigt (Hasselaar et al., 1991; Tremble et al., 1993).

In verschiedenen Untersuchungen zeigt BM-40 eine Aktivität während der Angiogenese (Sage und Vernon, 1995; Sage, 1996). Weiterhin ist BM-40 für die Invasivität von Melanomzellen mitverantwortlich (Ledda et al., 1997; Sage, 1997) und aktiviert Matrix Metalloproteinasen in Zelllinien invasiver Brust Tumore (Gilles et al., 1998). In anderen Fällen wurde eine, im Vergleich zum gesunden Gewebe geringere BM-40 Expression in Ovarialtumoren gefunden (Mok et al., 1996). Weiterhin spielt das Protein eine Rolle in der Entwicklung von Katarakten, wie aus einer BM-40 defizienten Maus bekannt ist (Gilmour et al., 1998; Norose et al, 1998; Bassuk et al., 1999) und während der Wundheilung (Reed und Sage, 1996).

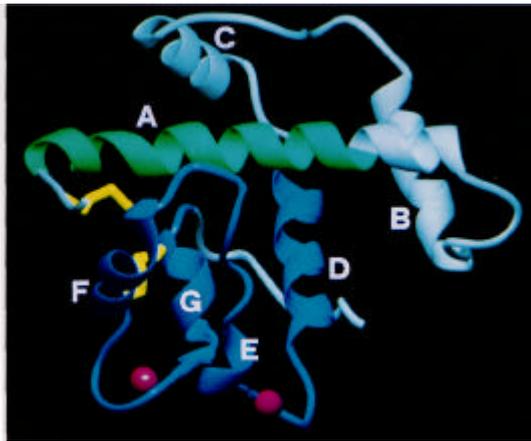


Abbildung 1.2 **Cartoon Darstellung der EC-Domäne des BM-40.** Die schematische Darstellung der EC-Domäne beruht auf den Daten der Röntgenstruktur (Hohenester et al, 1996). Die Buchstaben bezeichnen die  $\alpha$ -Helices beginnend mit dem N-terminalen Abschnitt. Die gebundenen Calcium-Ionen sind als Kugeln dargestellt.

Für das extrazelluläre BM-40/SPARC/Osteonectin wurde eine EF-Hand aus der Sequenz vorhergesagt. Studien zur Calcium-Bindung zeigten eine reversible Konformationsänderung in der CD-Spektroskopie (Maurer et al., 1992). Es gelang, die Domäne, welche die potentielle EF-Hand enthält, zu kristallisieren (Maurer, 1995). Die Röntgenstrukturanalyse lieferte dann den Beweis, daß sich in der C-terminalen Domäne des BM-40 zwei EF-Hände befinden (Abbildung 1.2; Hohenester, 1996). Die zweite EF-Hand war aus der Sequenz nicht abzuleiten, da sie vom Konsensus durch die Insertion eines Prolins abweicht. Daß trotz dieser Veränderung die Struktur der EF-Hand bewahrt wird, liegt an der Ausbildung einer ungewöhnlichen cis-Peptidbindung, wodurch die sperrige Seitenkette des Prolins so gedreht wird, daß das Sauerstoffatom der Carbonylgruppe die Koordination des Calcium übernehmen kann. BM-40 war das erste Beispiel für die Existenz von EF-Hand Motiven in extrazellulären Proteinen. Die EF-Hand besteht aus einem Helix-Schleife-Helix Motiv; innerhalb der Schleife liegen fünf hochkonservierte saure Aminosäurereste, die die Koordination des Calcium übernehmen (Kretsinger, 1979).

Neben dieser C-terminalen Domäne, die aufgrund ihrer Calcium-bindenden Eigenschaften als extrazelluläre Calcium-bindende (EC)-Domäne bezeichnet wird, unterteilt sich der N-terminale Teil des Proteins in zwei weitere Domänen. Domäne I ist spezifisch für BM-40. Es konnte gezeigt werden, daß sie aufgrund zweier Glutamatrete am Anfang ihrer Sequenz als Transglutaminasesubstrat dient (Hohenadl et al., 1995). Die mittlere Domäne im BM-40 zeigt Ähnlichkeit zu einer aus dem Follistatin bekannten und wird aufgrund dieser Analogie als Follistatin (FS)-Domäne bezeichnet. Follistatin ist ein extrazelluläres Protein, welches an Mitglieder der TGF- $\beta$ -Proteinfamilie (z.B. Activin) binden kann und deren Wirkung aufhebt (Michel et al., 1993). Dieser Domäne ließen sich bislang im BM-40 keine Funktionen zuordnen.

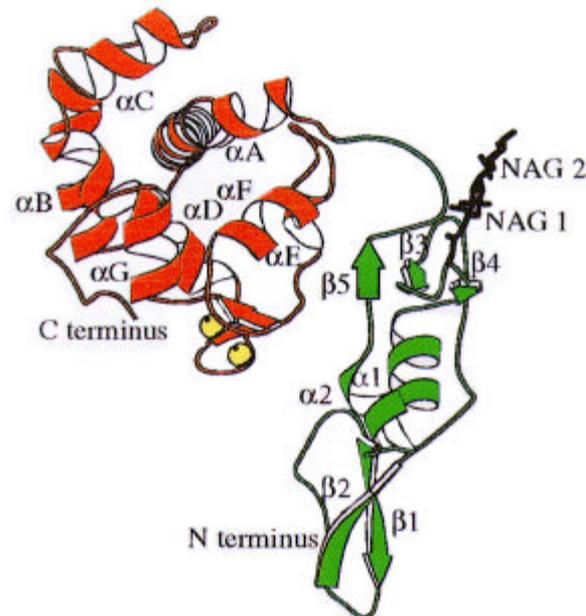


Abbildung 1.3 **FS-EC-Domäne von BM-40.** Die Abbildung zeigt eine schematische Cartoon-Darstellung der FS-EC-Domäne des BM-40 Basierend auf den Daten der Röntgenstruktur Analyse. Der rechte Teil zeigt die FS-Domäne, linke Teil stellt die EC-Domäne mit den zwei gebundenen Calcium-Ionen in Form von Kugeln dar. Weitere Erläuterungen im Text.

Anhand der Kristallstruktur des FS-EC-Teils des BM-40 (Hohenester et al., 1998) konnte man klar erkennen, daß dieses Konstrukt aus zwei unterschiedlichen Domänen aufgebaut ist. Die Interaktion zwischen beiden Domänen wird über einen Kontakt zwischen einem  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta 5$ ) der FS-Domäne und einer  $\alpha$ -Helix ( $\alpha E$ ) der EC-Domäne vermittelt. (Abbildung 1.3).

### 1.6 Die EC-Domäne im BM-40 - Einzig in extrazellulären Proteinen ?

Der Nachweis des ersten extrazellulären EF-Hand Paares im BM-40 warf die Frage auf, ob es weitere extrazelluläre Proteine gibt, die diese Domäne enthalten. Deshalb wurde eine Datenbanksuche mit der Sequenz des BM-40 begonnen. Dabei fand man die Sequenzen von vier weiteren Proteinen, die neben einer EC-Domäne eine N-terminale benachbarte FS-Domäne besitzen (Abbildung 1.4). Es handelt sich um das SC-1 aus Ratten-Hirn (Johnston et al., 1990), das QR-1 aus der Retina von Wachteln (Guermah et al., 1991), das Tumorstromungsfaktor- $\beta$ - (TGF- $\beta$ ) induzierte Protein Tsc-36 (Shibanuma et al., 1993) und das aus humaner Samenflüssigkeit isolierte Proteoglycan Testican (Alliel et al., 1993).

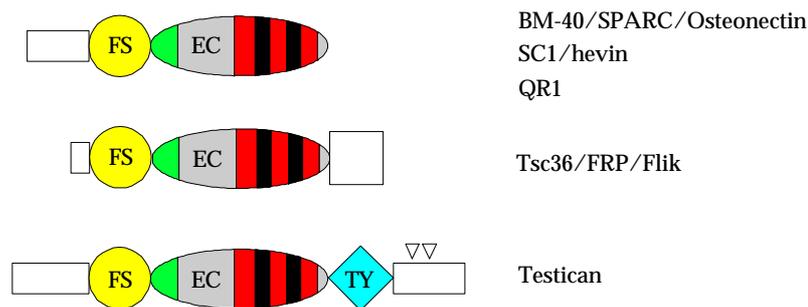


Abbildung 1.4 **Schematische Übersicht über die Mitglieder der BM-40 Familie zum Projektbeginn.** Aus der Darstellung ist der Domänenaufbau der Proteine zu entnehmen. Allen Proteinen ist eine Follistatin-ähnliche Domäne (FS) und eine extrazelluläre, calcium-bindende Domäne (EC) gemein. Testican besitzt zusätzlich eine Thyroglobulin-ähnliche Domäne (TY); die Dreiecke markieren die Anheftungspunkte für Glycosaminoglycan-Seitenketten. Offene Boxen stehen für Domänen ohne erkennbare Homologien.

Zwei der Proteine, SC-1 und QR-1, sind dem BM-40 am ähnlichsten, da sie analog nur eine weitere N-terminale Domäne enthalten, die für das jeweilige Protein spezifisch ist. Tsc-36 besitzt eine zusätzliche C-terminale Domäne, deren Sequenz jedoch keine Homologie mit anderen Proteinen in der Datenbank aufweist. Testican zeigt im Vergleich zu BM-40 zwei wesentliche Unterschiede auf. Erstens enthält es eine Thyroglobulin-(TY) Domäne, bekannt aus dem Vorläuferprotein der Schilddrüsenhormone, dem Thyroglobulin. Zweitens findet man in der C-terminalen, Testican-spezifischen Domäne die Konsensus-Sequenz für zwei Glycosaminoglycan-Anheftungsstellen. Die Literaturdaten beschreiben das aus Gewebeflüssigkeit extrahierte Testican als Proteoglycan mit einer Chondroitinsulfat- und einer Heparansulfat-Kette (Alliel et al., 1993; Bonnet et al., 1992). Elektronenmikroskopische Untersuchungen weisen für Testican aus Maus auf eine Lokalisation an der postsynaptischen Membran der Pyramidalzellen des Hippocampus hin (Bonnet et al., 1996). Mittels differentieller Genexpression wurde eine erhöhte Maß an Testican in humanen Myoblasten und in embryonalem Rhabdomyosarcom gefunden (Genini et al., 1996). Untersuchungen an primären Fibroblasten humaner Vorhaut zeigten eine Testosteron-abhängige Testican Expression (Nitsche et al., 1996). Eine weitere Gruppe konnte zeigen, daß Testican von humanen Endothelzellen exprimiert wird und möglicherweise eine Funktion im Gefäßsystem oder während der Angiogenese besitzt (Marr et al., 1997).

## 1.7 Die Physiologische Rolle von Calcium

Calcium ist das am häufigsten vertretene Kation im Organismus. Sein Anteil am Gesamtgewicht des Menschen beträgt etwa 1 %. Vom vorhandenen Calcium sind 99 % zusammen mit 85 % des Phosphates als kristallines Material (Hydroxyapatit) in Knochen und Zähnen eingebaut. In dieser Form besitzt es starken Anteil an der Strukturbildung und Formgebung des Körpers. Die Hauptmenge an extrazellulärem Calcium ist im Serum an Proteine (Albumin, Globuline) gebunden, so daß die Konzentration an freiem Calcium 1,2 mM beträgt. Sie unterliegt einer strengen Regulationskontrolle, die keine größere Abweichung als 1 % von Sollwert zuläßt (Krück, 1994).

In der Zelle ist die Konzentration an freiem Calcium mit 0,1  $\mu\text{M}$  im Ruhezustand bis zu 10  $\mu\text{M}$  unter Aktionsbedingungen wesentlich niedriger (Evenäs et al., 1998). Calcium-Ionen spielen hier eine herausragende Rolle innerhalb intrazellulärer 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 auch die intrazelluläre Calcium-Konzentration einer genauen Kontrolle unterliegen (Berridge, 1997). Von besonderer Bedeutung als Interaktionspartner für die Calcium-Ionen ist das Protein Calmodulin, welches Calcium-abhängig an mehr als 100 verschiedene Zielproteine binden kann (Celio et al., 1997). Im Calmodulin gibt es zwei EF-Hand Paare, die über die Bindung von insgesamt vier Calcium-Ionen ihre Konformation verändern, so das Calmodulin an das jeweilige Zielprotein binden kann (Cazin, 1995).

Auch außerhalb der Zelle übernimmt Calcium zahlreiche Funktionen, die z.B. die Stabilisierung von Proteinstrukturen, die Bildung aktiver Zentren in Enzymen und die Formung supramolekularer Strukturen umfassen (McPhalen et al., 1991). Cadherine sind beispielsweise eine Gruppe von Zelladhäsionsproteinen, die durch eine transmembrane Domäne mit der Zelle verankert sind. Ihr extrazellulärer Teil interagiert mit Cadherinen der benachbarten Zellen. Für diese Interaktion sind Calcium-Ionen essentiell erforderlich (Takeichi, 1995). Matrix Metalloproteinasen sind extrazelluläre, Zink-abhängige Proteasen, die am Abbau und an der Umorganisation von extrazellulärer Matrix (siehe unten) während der Morphogenese und der Wundheilung maßgeblich beteiligt sind (Woessner, 1991; Blundell, 1994). Die Bindungsstelle für Calcium-Ionen befindet sich nicht im katalytischen Zentrum, so daß sie möglicherweise auch in diesem Protein einzig eine Struktur-

stabilisierende Funktion haben (Dhanaraj et al., 1996). Auch in der Aktivierung der Blutgerinnungskaskade nach Verletzungen spielen Calcium-Ionen in Verbindung mit  $\gamma$ -Carboxyglutamat-Resten eine wichtige Rolle (Davie, et al., 1991).

In der großen Anzahl an verschiedenen extrazellulären Kompartimenten gibt es jedoch einige, die offensichtlich Calcium-Konzentrationen aufweisen, welche sich von denen des Serums unterscheiden. So gibt es einen Calcium-Gradienten in der Haut (Menon et al., 1985), der möglicherweise eine Signalroute für die Wanderung von Keratinocyten bildet (Hennings et al., 1980). Weitere Beispiele gibt es für die Placenta (Reitz et al, 1977), für die Lunge (Eckenhoff, 1989) und für das Gehirn (Nicholson et al., 1977). Es ist vorstellbar, daß den Calcium-Ionen hier mehr als nur eine strukturbildende Rolle zufällt, indem sie an der Modulation oder Übertragung von Signalen beteiligt sind.

## **1.8 Aufgabenstellung**

Eine Homologiesuche in der EST-Datenbank lieferte Hinweise auf bislang unbekannt potentielle Mitglieder der BM-40 Familie. Zum einen handelte es sich dabei um ein Homolog zu Testican, einem Proteoglycan welches im zentralen Nervensystem lokalisiert ist (Bonnet et al, 1993). Der andere EST-Klon zeigte Homologie zur C-terminalen EC-Domäne des BM-40. Um einen möglichst umfassenden Überblick über die Proteine der BM-40 Familie zu erhalten, sollten im Rahmen dieser Arbeit die vollständigen cDNA-Klone der unbekannt Homologe isoliert und die Gewebeverteilung deren mRNA sollte analysiert werden. Die Durchmusterung der cDNA-Bibliothek ergab im Gesamten vier neue Transkripte voller Länge, zwei homologe Testicane und zwei neue Mitglieder der Familie mit bislang unbekannter Domänenzusammensetzung. Die rekombinante Expression der entsprechenden Proteine im eukaryontischen Zellsystem war geplant. Mit einem Teil der Proteine sollten spezifische Antiseren hergestellt und die Lokalisation der neuen Proteine auf Gewebeschnitten von Mausorganen untersucht werden. Die aufgrund der EC-Domäne zu erwartende Calciumbindung sollte mit Hilfe der CD-Spektroskopie nachgewiesen werden.

## II Ergebnisse

### 2.1 Durchmustern der cDNA Bibliothek nach SMOC-1 und SMOC-2

Eine Analyse der EST-Datenbanken lieferte humane EST-Klone aus verschiedenen Geweben, die eine Sequenzähnlichkeit von 37% zu BM-40/SPARC/Osteonectin aufwiesen. Zur Untersuchung, ob es sich um ein neues Familienmitglied der BM-40 Familie handelt, wurden Sonden aus käuflichen EST-Klonen generiert und eine cDNA-Bibliothek aus humanem fötalen Gehirn durchmustert. Dabei handelte es sich um eine cDNA-Bibliothek, welche nach einem modifizierten Gubler und Hoffman-Verfahren (1983) präpariert wurde und dadurch mit einer höheren Wahrscheinlichkeit cDNA-Transkripte mit vollständiger 5'-Region enthält. Nach mehreren Schritten von Hybridisierung mit dem StyI-Fragment und Vereinzelung der Phagenklone, konnten vier unabhängige Kolonien isoliert werden. Der Aufbau der Phagen der cDNA-Bibliothek erlaubt es unter Verwendung Cre-sezierender Bakterien die in den Phagen enthaltenen cDNA-Abschnitte, zusammen mit flankierenden Abschnitten, herauszuschneiden und zu einem Plasmid (pDR2) zu verknüpfen. Die Plasmide können dann aus den Bakterien durch eine Standard Plasmid-Präparation isoliert werden. Dieses Verfahren wurde für insgesamt vier unabhängige Phagenklone angewendet und die erhaltenen Plasmide wurden untersucht. Nach Angaben des Herstellers sollte es möglich sein, die cDNA-Abschnitte mittels Restriktionsverdau mit den Enzymen BamHI und XbaI aus dem Plasmid herauszuschneiden. Damit könnte die Größe der gewonnenen cDNAs auf einem Agarosegel überprüft werden. Auch nach mehreren Versuchen gelang es nicht, die Plasmide mit den genannten Restriktionsenzymen zu schneiden. Deshalb wurde die Identität der insertierten cDNA jedes Plasmid-Klons durch Sequenzierung auf beiden Strängen mit flankierenden bzw. internen Primern überprüft. Abbildung 2.2 zeigt eine schematische Darstellung der erhaltenen Klone. Die drei cDNA-Klone A,B und C zeigten im überlappenden Bereich eine 100%ige Sequenzübereinstimmung. Aufgrund des Domänenaufbaus (siehe unten) wurde das neue Genprodukt als SMOC-1 bezeichnet, wobei die Abkürzung für sekretiertes moduläres Calcium-bindendes Protein steht. Der längste isolierte cDNA-Klon A besaß eine Länge von 3669 bp und enthielt neben dem gesamten offenen Leseraster von 1302 bp noch zusätzlich 254 bp 5'-nichttranslatierte Region und 2113 bp 3'-nichttranslatierte Region. Klon B war 1143 bp lang und bestand aus den Nukleotiden 780-1922 des offenen Leserasters. Der dritte Klon C zeigte Identität der Basen 918-1112 mit dem offenen Leseraster, war jedoch darüber hinaus nicht homogen zusammengesetzt.

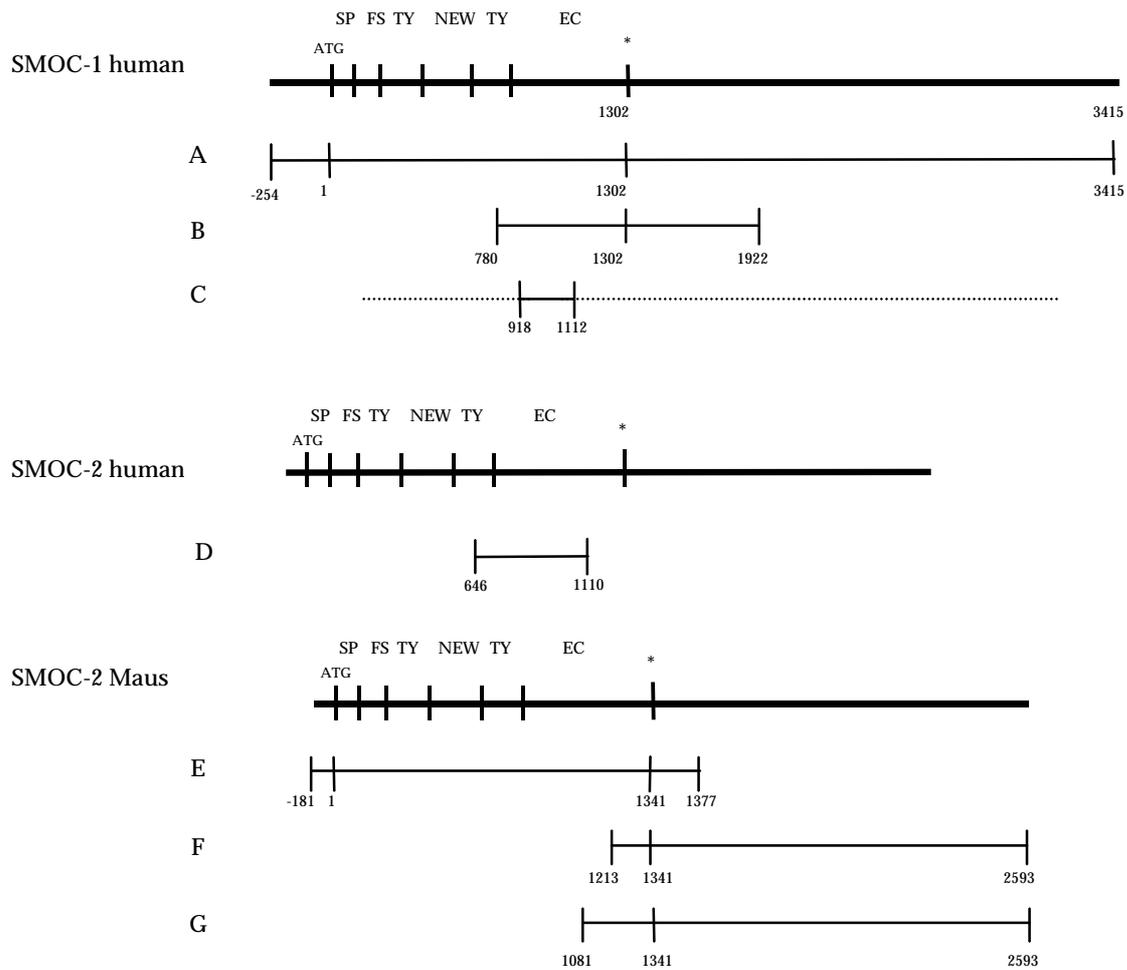


Abbildung 2.1 **Schematische Darstellung der cDNA Klone von humanem SMOC-1 und murinem SMOC-2.** Die Länge der Klone wie auch die Positionen im offenen Leserahmen sind durch Zahlen markiert. SP: Signalpeptid, FS: Follistatin-ähnliche Domäne, NEW: Domäne ohne erkennbare Homologie, TY: Thyroglobulin-ähnliche Domäne, EC: extrazelluläre Calcium-bindende Domäne, \*: Stop Kodon.

Der vierte cDNA-Klon D war im überlappenden Bereich nur zu 75 % homolog zu SMOC-1. Diesem zweiten SMOC-Transkript aus humanem Gewebe wurde der Name SMOC-2 gegeben. Trotz intensiver Versuche war es nicht möglich, weitere homologe Klone aus der humanen cDNA-Bibliothek zu isolieren. Deshalb wurde eine cDNA-Bibliothek mit Fragmenten aus einem murinen EST-Klon, der 98 % Homologie zu dem humanen SMOC-2 Fragment zeigte, durchmustert, die aus Gewebe neugeborener Mäuse stammte (Stratagene). Die drei verwendeten Sonden wurden aus dem Maus EST-Klon durch Restriktionsverdau erhalten. Nach zweimaligem Hybridisieren und Vereinzeln der erhaltenen Phagenkolonien, konnte nur ein Klon (E) isoliert werden. Die Sequenzierung dieses Plasmids mit flankierenden und internen Primern ergab eine Gesamtlänge von 1558 bp mit einem offenen

Leseraster von 1341 bp, einer 5'-nichttranslatierten Region von 181 bp und einer 3'-nichttranslatierten Region von 36 bp (Abbildung 2.1). Ein Vergleich der Sequenzen des isolierten SMOC-1 mit dem neuen Maus-Klon bestätigte, daß es sich um zwei unterschiedliche Transkripte handelte. Abbildung 2.1 enthält zwei weitere murine SMOC-2-Klone (F und G). Es handelt sich um EST-Klone, die von ATCC bezogen und sequenziert wurden. Beide Klone umfassen neben einem überlappenden Teil zu unserem isolierten Klon hauptsächlich 3'-nichttranslatierte Sequenz. Klon F (MM117770) umfaßt die Basen 1213 bis 1341 des offenen Leserasters von SMOC-2 und zusätzlich 1252 bp an 3'-nichttranslatierter Region. Klon G (MM059909) umfaßt die Basen 1081 bis 1341 des offenen Leserasters und ebenfalls 1252 bp an 3'-nichttranslatierter Region.

## **2.2 Domänenaufbau von SMOC-1 und SMOC-2**

Die cDNA für humanes SMOC-1 (Abbildung 2.2), murines und humanes SMOC-2 (Abbildung 2.3 und 2.4) wurden in Aminosäuresequenzen übersetzt. Sekretiertes SMOC-1 besteht aus 408 Aminosäuren. Reifes SMOC-2 ist mit 425 Aminosäuren geringfügig länger. Sequenzvergleiche zeigten, daß beide Proteine einen modulären Aufbau besitzen. Der N-Terminus von SMOC-1 umfaßt zusätzliche 26 Aminosäuren und paßt gut zur Konsensussequenz eines Signalpeptides (Nielsen et al., 1997). Das gleiche gilt für das 21 Aminosäuren umfassende Signalpeptid von SMOC-2. Die Abwesenheit einer hydrophoben transmembranen Region läßt darauf schließen, daß beide Proteine sekretiert werden. Prozessiertes SMOC-1 weist eine Länge von 408 AS auf. Durch weitere Sequenzvergleiche lassen sich fünf Domänen voneinander unterscheiden, die in beiden Proteinen in der gleichen Abfolge auftauchen (Abbildung 2.5). Dem Signalpeptid folgt eine Follistatin- (FS) oder Kazal-ähnliche Domäne. Die Struktur der FS-Domäne besteht aus zwei Teilen; der zweite Teil ist einer Kazal-Domäne ähnlich (Hohenester et al., 1997). Die ersten sechs Cystein-Reste in der Sequenz von SMOC lassen sich sowohl mit der gesamten Kazal-Domäne als auch mit den Cystein-Resten 5 bis 10; also dem zweiten Teil der FS-ähnlichen Domäne im BM-40 vergleichen.





### SP- und Domäne I

↓

SMOC-1 H	1	MLPARCARLLTPHLL...LVLVQLSPARG	HRTTGPRFL..ISDRDP
SMOC-1 M	1	MLPAR.VRLLTPHLL...LVLVQLSPAGG	HRTTGPRFL..ISDRDP
SMOC-2 H	1	MLLPQLCWLPLLAGLLPPVPA	QKFSALTFLRVDQDKDK
SMOC-2 M	1	MLPPQLCWLPLLAALLPPVPA	QKFSALTFLRVDQDKDR

↑

### FS Domänen

		1	2	1	2	3	4	5	4	3	5
SMOC-1 H	42-	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
SMOC-1 M	41-	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
SMOC-2 H	39-	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
SMOC-2 M	39-	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
KAZAL											
BM-40											

β1      β2      β3      β4      α1      α2      β5

### TY1 Domänen

		1	1	2	2	3	3
SMOC-1 H TY1	94-	..K	..C	..R	..L	..E	..R
SMOC-1 M TY1	93-	..K	..C	..R	..L	..E	..R
SMOC-2 H TY1	89-	..R	..C	..V	..A	..E	..R
SMOC-2 M TY1	89-	..R	..C	..V	..A	..E	..R
p41-TY		L	T	K	C	Q	E

α1      β1      β2      β3

### NEW Domänen

SMOC-1 H	160-	..GSVTDKPLSQGNSGRKDDGSKPTPTMETQPVFDGDEITA..PTLWIKHLVIKDSKLNNTNIRNSEKVV
SMOC-1 M	159-	..GPVTDKPLSQGNSGRKDDGSKPTPTMETQPVFDGDEITA..PTLWIKHLVIKDSKLNNTNVRNSEKVV
SMOC-2 H	155-	..GSVNEKLPQREGTGKTDAA..APALETPQGDDEEDIASRYPTLWTEQV...KSRQNKTN.KNS..VS
SMOC-2 M	155-	..GSINEKVPQREGAGKADDA..APALETPQGDDEEDIASRYPTLWTEQV...KSRQNKTN.KNS..AS

### TY2 Domänen

SMOC-1 H TY2	226-	..S	..C	..D	..Q	..E	..R	..Q	..S	..A	..L	..E	..E	..A	..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	..G	..R	..P	..L	..P	..G	..T	..S	..T	..R	..Y	..V	..M	..P	..S	..C	..E
SMOC-1 M TY1	225-	..S	..C	..D	..Q	..E	..R	..Q	..S	..A	..L	..E	..E	..A	..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	..G	..R	..P	..L	..P	..G	..T	..S	..T	..R	..Y	..V	..M	..P	..S	..C	..E
SMOC-2 H TY1	215-	..S	..C	..D	..Q	..E	..H	..Q	..S	..A	..L	..E	..E	..A	..K	..Q	..P	..K	..N	..D	..N	..V	..I	..P	..E	..C	..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	..L	..P	..G	..T	..S	..T	..R	..Y	..E	..Q	..P	..K	..C	..D
SMOC-2 M TY2	215-	..S	..C	..D	..Q	..E	..H	..Q	..S	..A	..L	..E	..E	..A	..K	..Q	..P	..K	..N	..D	..N	..V	..I	..P	..E	..C	..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	..L	..P	..G	..T	..S	..T	..R	..Y	..E	..Q	..P	..K	..C	..D
p41-TY		L	T	K	C	Q	E	E	V	S	.....	H	I	P	A	V	H	P	G	S	F	R	P	K	C	D	E	N	G	N	L	P	L	Q	C	Y	G	S	I	G	Y	C	W	C	V	F	P	N	G	T	E	V	P	N	T	R	S	R	G	H	H	N	C	S				

α1      β1      β2      β3

### EC Domänen

		1
SMOC-1 H	294-	SDARAKTTEADDPFKDRELPG
SMOC-1 M	293-	SDARAKSVEADDPFKDRELPG
SMOC-2 H	285-	NTARAHPAKARDLYKGRQLQG
SMOC-2 M	283-	NTARAHPAKARDLYKNRPLQG
BM-40		.....PPCLDSELTEFPLMRD

αA      αB

		↓	↓	↓	↓	1	2	↓	↓	↓	2	
SMOC-1 H	.....	ERVVHWYFSQLDS	..NS	S	N	D	I	N	K	R	E	M
SMOC-1 M	.....	ERVVHWYFSQLDS	..NS	S	D	D	I	N	K	R	E	M
SMOC-2 H	.....	RVVHWYFKLIDK	..NS	S	G	D	I	G	K	E	I	K
SMOC-2 M	.....	RVVHWYFKLLDK	..NS	S	G	D	I	G	K	E	I	K
BM-40	ELLARDFEKNYNMYIFV	VHWFQGLDQHPID	GYLSHTE	LAPLR	...APLI	P	M	E	H	C	T	R

αC      αD      EF-1      αE      αF      EF2      αG

SMOC-1 H	GVSKE.....GRLV*
SMOC-1 M	GVSKEGGLSFPQKGRAGTNPFIGRLV*
SMOC-2-H	GVAKEDGKADTKRHTPRGHAESTSNRQPRKQG

Abbildung 2.6 **Sequenzvergleich einzelner Domänen von SMOC-1 und SMOC-2 mit repräsentativen Konsensus-Sequenzen.** Signalpeptid und Domäne I wurden untereinander verglichen. Der Pfeil deutet auf die Spaltstelle des Signalpeptids. Die Sequenzen von SMOC-1 und SMOC-2 wurden abgestimmt mit der Sequenz der FS- und der EC-Domäne von BM-40, der Kazal-Domäne des Elastase-Inhibitors (Tschesche et al., 1987) und der Thyroglobulin-Domäne von p41. Die angegebenen Sekundärstrukturelemente wurden den Kristallstrukturen von BM-40 (Hohenester et al., 1997) und p41 (Guncar et al., 1999) entnommen und als  $\alpha$ -helicale Strukturen oder  $\beta$ -Faltblätter markiert. Die Zahlen oberhalb der Cystein-Reste beziehen sich auf die Bildung der Disulfidbrücken. Calcium-koordinierende Aminosäuren des BM-40 wurden durch einen Pfeil markiert.

Obwohl die Follistatin-ähnliche Domäne eine N-terminale Region besitzt, die weder in den SMOC-Sequenzen noch in Kazal-Domänen vorhanden ist, kann anhand der Sequenz keine Zuordnung vorgenommen werden, welchem Domäentyp die Follistatin-Domäne in SMOC-1 bzw. -2 am ähnlichsten ist. Im folgenden wird die entsprechende Domäne in SMOC-1 und SMOC-2 als Follistatin-ähnliche Domäne bezeichnet. An die FS-Domäne schließen sich zwei Thyroglobulin-ähnliche Domänen an, die durch eine Domäne getrennt werden, welche keine Homologie zu bekannten Proteinen besitzt und damit SMOC-spezifisch ist (Abbildung 2.6). Diese Domäne enthält einen hohen Anteil an aromatischen Aminosäuren. Dies läßt die Vermutung zu, daß diese Region eine Faltung mit einem hydrophoben Kern einnehmen wird. Eine potentielle N-Glycosylierungsstelle ist in beiden SMOC-Transkripten konserviert (SMOC-1: N 214; SMOC-2: N 206). Die Thyroglobulin-Domänen enthalten jeweils sechs Cystein-Reste, sowie das charakteristische CWCV-Tetrapeptid (Molina et al., 1996). Die Kristallstruktur der TY-Domäne von p41, der variablen Region des MHCII-Komplexes, wurde kürzlich gelöst (Guncar et al, 1999). In der Struktur der TY-Domäne lassen sich zwei Faltungsuntereinheiten unterscheiden. Die erste besteht aus einer kurzen  $\alpha$ -Helix- $\beta$ -Strang Anordnung, die zweite besteht aus drei Strängen, die ein kurzes, antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt formen. Beide Untereinheiten werden durch interne Disulfidbrücken stabilisiert. Ein Sequenzvergleich zeigt, daß die Position aller sechs Cystein-Reste der TY-Domänen von SMOC-1 und SMOC-2 sowie die Sekundärstruktur-Elemente konserviert sind (Abbildung 2.6). Die C-terminale Domäne beider SMOC-Transkripte ist homolog zur extrazellulären Calcium-bindenden Domäne des BM-40. Die Charakteristika der EC-Domäne, die amphipathische  $\alpha$ -Helix und die beiden Helix-Schleife-Helix-Motive der zwei EF-Hände sind konserviert. Sequenzvergleiche mit der kanonischen Konsensussequenz einer EF-Hand zeigen, daß beide Motive in SMOC-1 und SMOC-2 konserviert sind, während im BM-40 eine veränderte EF-Hand auftritt. Die Organisation der Domänen in SMOC-1 und SMOC-2 ist neu und einzigartig innerhalb der BM-40-Familie (Abbildung 3.1).

## 2.3 Genomische Struktur von humanem SMOC-1 und SMOC-2

Durch das schnelle Fortschreiten des humanen Genomprojektes gibt es eine große Anzahl veröffentlichter Gensequenzen, die oftmals ganze Gene umspannen. Eine Datenbanksuche mit den SMOC cDNA-Sequenzen lieferte eine Reihe von genomischen Klonen, deren Analyse die Exonstruktur für SMOC-1 (Abbildung 2.7) und SMOC-2 (Abbildung 2.8) lieferte.

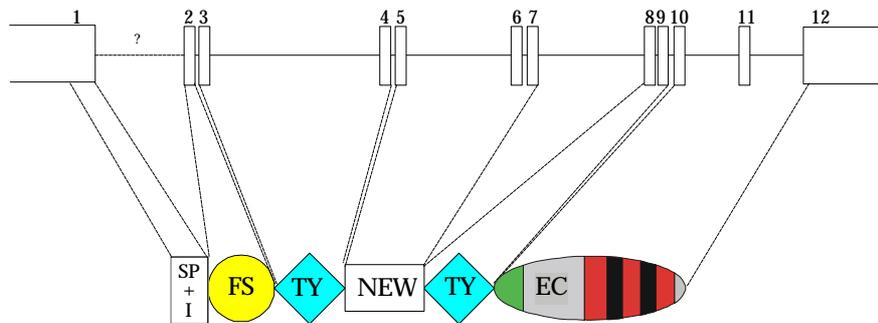


Abbildung 2.7 **Exon-Intron-Struktur von humanem SMOC-1**. Alle Exons sind durchnummeriert und umfassen den gesamten kodierenden Bereich von SMOC-1. Offene Boxen für Exon 1 und 12 sollen verdeutlichen, daß die genauen Grenzen des Gen nicht bestimmt werden konnten. Das Fragezeichen über der gestrichelten Linie deutet an, daß die Größe dieses Introns nicht bestimmt werden konnte.

Die Struktur des humanen SMOC-1 Gen konnte durch die Auswertung zweier HTGS-Klone (AL157789 und AL135747) ermittelt werden. Beide stammen aus der Sequenzierung von Chromosom 14. Die Gesamtlänge des SMOC-1 Gens überspannt einen Sequenzbereich von mehr als 80 kbp beginnend mit dem Translationsstart bis zum Ende der bekannten cDNA-Sequenz. Über die Länge des kodierenden Bereiches besteht das Gen für SMOC-1 aus 12 Exons. Die genaue Länge der Exons 1 und 12 konnte nicht festgestellt werden.

Exon Nummer	Domäne	Exon Größe [bp]	Splice Donor	Intron Größe [bp]	Splice Acceptor	Codon Phase
1	I	99	CCCAGG <b>g</b> taagt	nicht bekannt	acct <b>ag</b> TTTCTA	0
2	FS	166	GCAAAG <b>g</b> tgagt	1116	tttc <b>ag</b> ATGCTG	1
3	TY <sub>1</sub>	113	ACCCAG <b>g</b> tgagg	22215	gaac <b>ag</b> GTGCAG	0
4	TY <sub>1</sub>	100	G TTCAG <b>g</b> taccg	2103	ccca <b>ag</b> GTTCAG	1
5	NEW	48	GGAAAG <b>g</b> tgagt	14451	attc <b>ag</b> ATGACG	1
6	NEW	57	GAGATG <b>g</b> taaga	1926	ccct <b>ag</b> AAATCA	1
7	NEW	81	ATTCAG <b>g</b> taaat	16273	ttgc <b>ag</b> AGAAAG	1
8	TY <sub>2</sub>	193	CACACG <b>g</b> taagc	539	tccc <b>ag</b> CTACGT	2
9	TY <sub>2</sub>	83	TACCAG <b>g</b> tggga	1818	tttt <b>ag</b> GCTGTC	1
10	EC	106	TGGGAG <b>g</b> tgaga	9712	gccc <b>ag</b> GTTCTC	2
11	EC	245	AAGAAG <b>g</b> tgagt	6797	cagt <b>ag</b> GACGCC	1
12	EC	2122				

Tabelle 2.1 **Exon-Intron Grenzen des humanen SMOC-1 Gen.**

Ebenso konnte die Länge des ersten Introns nicht bestimmt werden, da dies auf einem nicht überlappenden Teil der beiden Klone lag. Die jeweiligen Größen der Exons und Introns sowie deren Übergänge wurden bestimmt (Tabelle 2.2). Auch die Genstruktur von humanem SMOC-2 konnte anhand der Sequenzanalyse eines HTGS-Klons (AL442124) aufgeklärt werden. Dieser Klon entstammt der Sequenzierung von Chromosom 6. Seine Gesamtlänge beginnend mit dem Translationsstart bis zum Ende der bekannten cDNA-Sequenz liegt bei >141 kbp. Das Gen besteht aus 13 Exons (Abbildung 2.8) und besitzt damit ein Exon mehr als das Gen für SMOC-1.

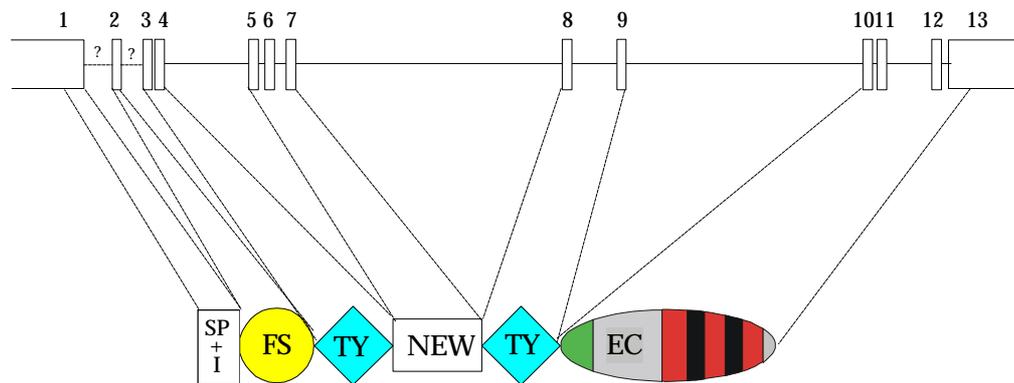


Abbildung 2.8 **Exon-Intron-Struktur von humanem SMOC-2**. Alle Exons sind durchnummeriert und umfassen den gesamten kodierenden Bereich von SMOC-1. Offene Boxen für Exon 1 und 13 sollen verdeutlichen, daß die genauen Grenzen des Gen nicht bestimmt werden konnten. Das Fragezeichen über der gestrichelten Linie deutet an, daß die Größe dieses Introns nicht bestimmt werden konnte.

Die Größe der ersten beiden Introns konnte nicht bestimmt werden, da sie auf einem ungeordneten Teil des Klons lagen. Die Übergänge und Größen der weiteren Exons und Introns wurden bestimmt (Tabelle 2.3).

Exon Nummer	Domäne	Exon Größe [bp]	Splice Donor	Intron Größe [bp]	Splice Acceptor	Codon Phase
1	I	84	CTC ACG <b>gtaagc</b>	nicht bekannt	<b>tttaag</b> TTT TTG	0
2	FS	172	GCA AAG <b>gtaagc</b>	nicht bekannt	<b>ctacag</b> ACG TGT	1
3	TY <sub>1</sub>	107	CCT ACA <b>gtcagg</b>	1183	<b>tcgcag</b> GTC AGG	1
4	TY <sub>1</sub>	100	GCC CGG <b>gtaggt</b>	15898	<b>ttttag</b> GTT CCG	1
5	NEW	48	AAA CAG <b>gtaact</b>	3446	<b>attcag</b> ATG ATG	1
6	NEW	51	AAG AAG <b>gtgagc</b>	1960	<b>tcatag</b> ATA TTG	1
7	NEW	75	ATT CAG <b>gtaaga</b>	49733	<b>ccgcag</b> TGT CAT	1
8	TY <sub>2</sub>	187	CAC AAG <b>gtaaat</b>	9152	<b>ccatag</b> GTA CGA	2
9	TY <sub>2</sub>	83	TAC AAG <b>gtgagc</b>	42433	<b>tttcag</b> GTT GTC	1
10	EC	103	AGG CAG <b>gtacgc</b>	2171	<b>ttccag</b> GCT CTC	2
11	EC	275	GCC ACA <b>gtaaga</b>	10676	<b>tgctag</b> CCC CCA	1
12	EC	38	AGA CAG <b>gtaagt</b>	2291	<b>tttcag</b> CCA AGG	0
13	EC	1572				

Tabelle 2.2 **Exon-Intron Grenzen des humanen SMOC-2 Gen.**

Anhand der Genstruktur bestätigt sich, daß es sich bei SMOC-1 und SMOC-2 um modular aufgebaute Proteine handelt. An den Grenzen der einzelnen Domänen liegen jeweils Donor und Acceptor-Sequenzen für das Splicen. Einzelne Domänen werden jedoch oft von mehreren Exons kodiert. Dies gilt für die Thyroglobulin-ähnliche Domäne (2 Exons), die NEW-Domäne (3 Exons) und die EC-Domäne (3 bzw. 4 Exons). Nur die Domäne I und die Follistatin-ähnliche Domäne werden jeweils von einem Exon kodiert.

#### **2.4 Gewebeverteilung von SMOC-1 und SMOC-2 mRNA**

Zur Analyse der Gewebeverteilung von SMOC-1 und SMOC-2 Transkripten wurde ein Northern-Blot mit mRNA verschiedener Mausgewebe angefertigt. Abbildung 2.9 zeigt die Autoradiogramme des Northern-Blots nach Hybridisierung mit SMOC-1 und SMOC-2. Beide Transkripte zeigten eine weit verteilte Expression in verschiedenen Geweben. Ein auffällig starkes Signal für SMOC-1 und SMOC-2 wurde mit Ovarien-mRNA detektiert. Weitere Signale für SMOC-1 gaben Gehirn, Thymus, Herz, Skelettmuskel, Leber und Lunge. SMOC-2 zeigte zusätzliche Signale in Herz, Skelettmuskel und Milz. Da einige der Signale schwach ausfielen, wurde nach einer Bestätigung dieser Ergebnisse mit einer unabhängigen Methode gesucht. Mittels RT-PCR wurden spezifische Produkte für SMOC-1 (391 bp) und SMOC-2 (304 bp) amplifiziert. Diese Produkte wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die Agarosegele mit Ethidiumbromid gefärbt (Abbildung 2.10). Zu jedem Ansatz wurde eine Positiv-Kontrolle mit Tubulin-Primern durchgeführt. Alle Reaktionen wurden parallel auch ohne Zugabe reverser Transkriptase bei ansonsten gleichen Bedingungen durchgeführt, um mögliche Kontaminationen der Proben mit cDNA auszuschließen.

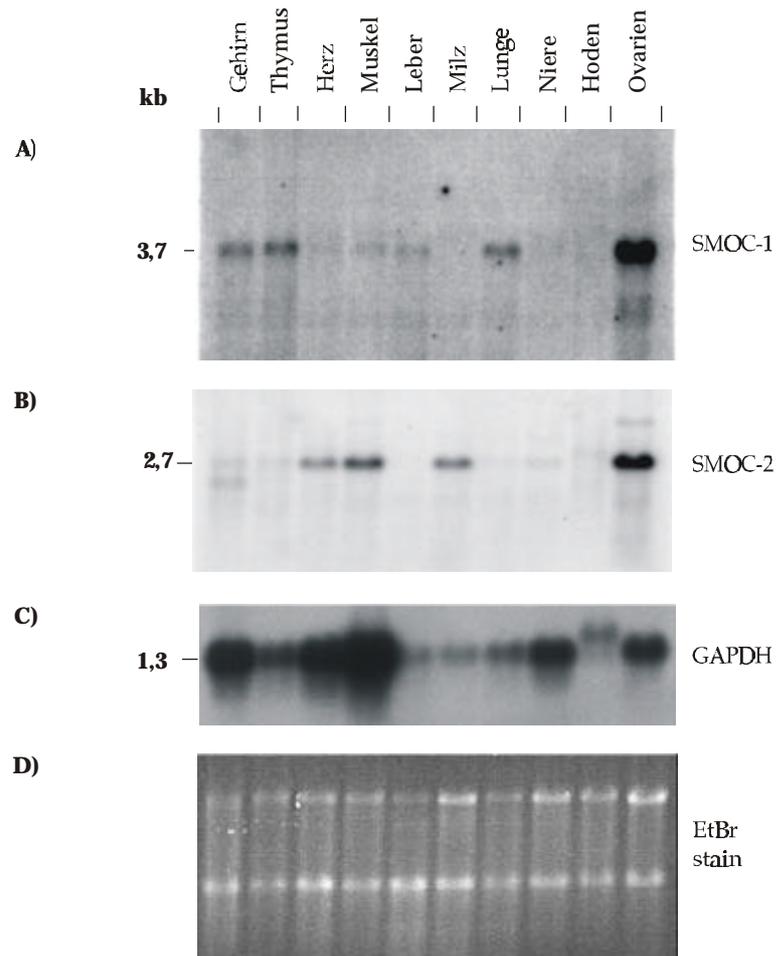


Abbildung 2.9 **Northern Blot mit SMOC-1 und SMOC-2 Sonde.** mRNA Aliquots von jeweils 5 µg wurden auf einem 1,2% Agarose Gel unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. A) Multigewebe mRNA Blot mit starken Signalen für SMOC-1 in Gehirn, Thymus, Lunge und Ovarien. B) Multigewebe mRNA Blot mit spezifischer Sonde gegen SMOC-2 hybridisiert. Man erkennt starke Signale in Herz, Muskel, Milz und Ovarien. C) Hybridisierung des gleichen Blots mit einer GAPDH Sonde zum Mengenvergleich. Die Höhe der Bande im Hodengewebe ist durch alternatives Splicen in diesem Gewebe zu erklären. D) Färbung des Agarose Gel mit Ethidiumbromid vor dem Blotten. Als Sonde diente für SMOC-1 ein 546 bp NheI/DraIII-Fragment und für SMOC-2 ein 421 bp XmnI-Fragment.

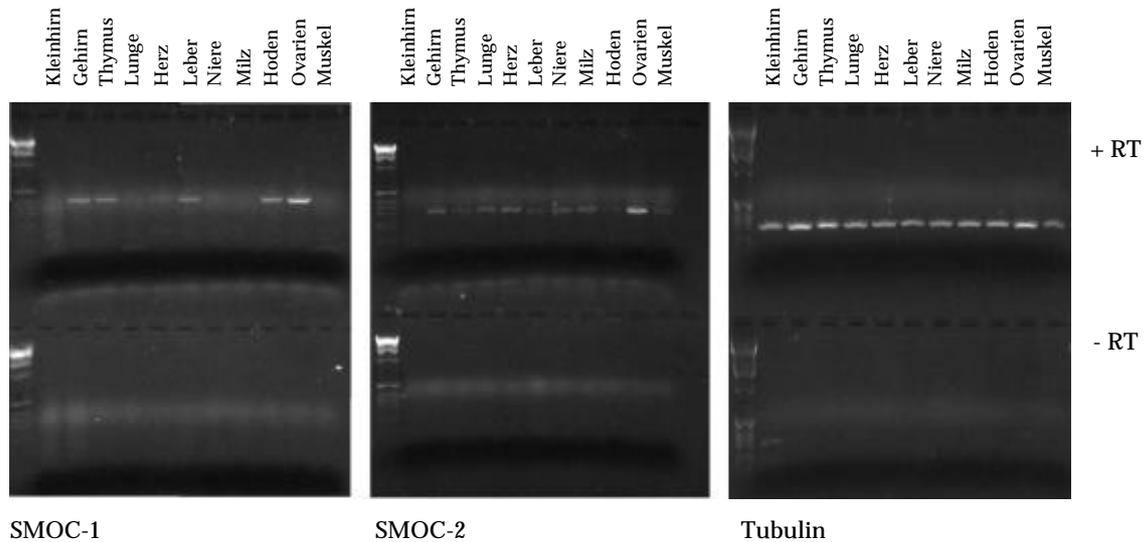


Abbildung 2.10 **RT-PCR mit spezifischen Primern für SMOC-1, SMOC-2 und Tubulin**. Gleiche Aliquots der PCR Reaktionen von SMOC-1, SMOC-2 und Tubulin jeweils mit und ohne Zugabe von Reverser Transkriptase wurden auf einem 2%-Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Tubulinkontrolle soll die gleiche Beladung der Gele zeigen. Die jeweils linken Spuren enthalten die Marker-DNA.

Auch hier fand man die jeweils stärksten Signale für SMOC-1 und SMOC-2 in Ovarien. Im Vergleich mit den Daten des Northern-Blot zeigten beide Transkripte jedoch eine etwas breitere Verteilung. Besonders SMOC-2 präsentierte sich in weiteren Geweben wie Gehirn, Thymus, Lunge, Leber, Niere und Hoden. Für SMOC-1 stimmten die Ergebnisse zwischen RT-PCR und Northern-Blot überein, lediglich die Signalintensitäten zwischen Lunge und Leber waren unterschiedlich. Zur Überprüfung der Signale, unabhängig von der erwarteten Größe auf dem Agarose-Gel, wurden Banden von SMOC-1 und SMOC-2 aus dem Gel isoliert und sequenziert. Damit konnte ihre Authentizität bestätigt werden.

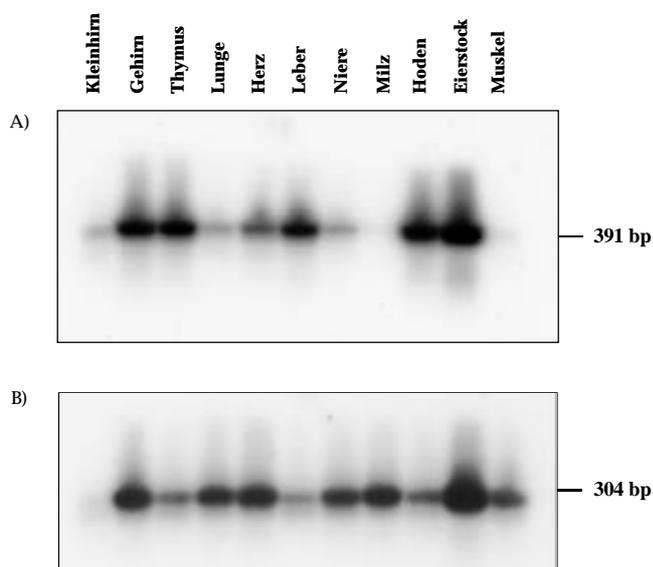


Abbildung 2.11 **RT-PCR und Southern-Blot mit Sonden gegen SMOC-1 und -2**. Einer Reaktion mit Reverser Transkriptase auf Gesamt-RNA verschiedener Gewebe folgte eine Amplifikation mittels PCR mit spezifischen Primern für SMOC-1 bzw. SMOC-2. Aliquots jeder Reaktion wurden auf einem 2%-Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend durch Kapillarblotting auf eine Nylonmembran übertragen und mit spezifischen Proben gegen SMOC-1 und -2 hybridisiert. A) Hybridisierung mit einer spezifischen SMOC-1 Sonde lieferte ein starkes Signal von 391 bp Größe in Gehirn, Thymus, Herz, Leber, Hoden und Eierstock. Schwächere Signale erkannte man in Kleinhirn, Lunge und Niere. B) Die Sonde gegen SMOC-2 zeigte ein Signal der erwarteten Größe von 304 bp in allen untersuchten Geweben.

Die Gele wurden auf Nylonmembran geblottet und mit einer  $^{32}$ Phosphat-dCTP-markierten Sonden hybridisiert (Abbildung 2.11). Als Sonden dienten hier die eluierten und sequenzierten Banden aus der RT-PCR für SMOC-1 und SMOC-2. Die Autoradiographien bestätigten die Ergebnisse der Agarose-Gele; auch schwache Signale wie für SMOC-1 in Lunge und Niere, zeigten sich eindeutig positiv auf dem Southern-Blot. Das sehr schwache Signal in Muskelgewebe steht jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen des Northern-Blots. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß beide Transkripte in allen untersuchten Geweben vorkommen, außer SMOC-1, welches offensichtlich nicht in der Milz vorkommt. Damit handelt es sich bei SMOC-1 und SMOC-2 um zwei Transkripte, die eine breite Gewebeverteilung aufweisen und somit nicht organspezifisch exprimiert werden.

## **2.5 Rekombinante Expression von SMOC**

Zur weiteren biochemischen Charakterisierung von SMOC-1 und SMOC-2 sollte dieses rekombinant exprimiert werden. Hierzu wurde ein eukaryontisches System verwendet, um möglichst authentische Proteine in Bezug auf Faltung und posttranslationale Modifikationen zu erhalten. Als Expressionsvektor diente hierzu das modifizierte Plasmid pCEP-Pu welches auf dem kommerziell erhältlichen pCEP-4 basiert. Die Signalpeptidsequenz des BM-40 wurde so in den Vektor integriert, daß es möglich war, Konstrukte gerichtet über eine NheI-Schnittstelle in diesen einzuklonieren. Damit sind transfizierte Zellen in der Lage, das gewünschte Genprodukt effizient zu produzieren und ins Zellkulturmedium zu sekretieren. Mit Hilfe der PCR wurde ein SMOC-1 Konstrukt in vollständiger Länge amplifiziert und in den pCRII-Vektor inkloniert. Um die korrekte Amplifikation zu überprüfen, wurde das gesamte Konstrukt sequenziert. Im nächsten Schritt wurde das Konstrukt über eigens eingeführte Restriktionsschnittstellen (NheI und XhoI) in den Expressionsvektor pCEP-Pu umkloniert und die Übergangsstellen erneut sequenziert. Der so angefertigte Expressionsvektor pCEP-Pu-SMOC-1 wurde dann in EBNA-293 Zellen transfiziert und diese einer Selektion mit Puromycin unterworfen. Nach deren Abschluß wurden die Zellen mit serumfreiem Medium versorgt und die Überstände in regelmäßigen Abständen geerntet, um das rekombinante Protein aus diesen zu reinigen.

### 2.5.1 Reinigung von rekombinantem SMOC-1

Nach verschiedenen Vorversuchen stellte sich folgendes Reinigungsprotokoll als erfolgreich heraus:

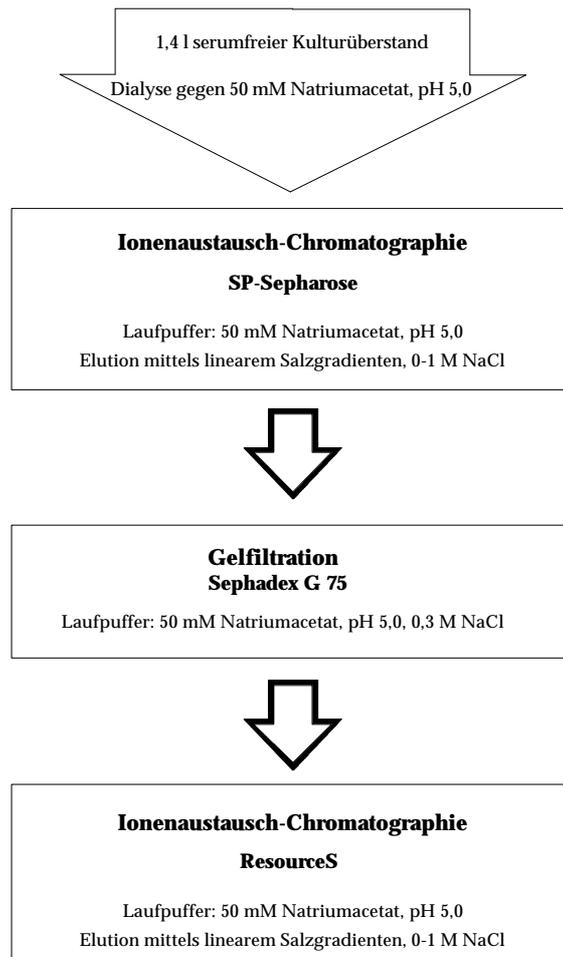


Abbildung 2.12 **Reinigungsschema für die Reinigung von SMOC-1 aus serumfreiem Kulturüberstand.** Weitere Erläuterungen im Text.

Zur Reinigung wurden 1,4 l SMOC-1 Kulturüberstand gegen 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,0) dialysiert, zur Entfernung von Zellresten für 20 min bei 10.000 Upm und 4° C zentrifugiert und auf eine Sepharose SP-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Salz-Gradienten im Konzentrationsbereich von 0-1 M NaCl. Fraktionen, welche bei 400 mM NaCl eluierten, wurden vereinigt, gegen Acetatpuffer dialysiert und über eine HiTrap-SP-Säule konzentriert. Es folgte eine Gelfiltration auf einer Sephadex G 75 Säule in Acetatpuffer unter Zugabe von 0,3 M NaCl, um unspezifische Interaktionen auszuschließen. Die Proteine des Eluats wurden über eine HiTrap SP-Säule konzentriert und zur Endreinigung mittels FPLC auf eine ResourceS-Säule aufgetragen und mit einem linearen Salzgradienten von 0-1 M NaCl eluiert. Nach erneuter Konzentrierung (Hi-Trap SP) wurde das gereinigte SMOC-1 in 5 mM Tris-HCl, pH 7,4 über eine PD-10 Entsalzungssäule umgepuffert. Die Ausbeute an rekombinantem SMOC-1 lag in der Größenordnung von 500 µg Protein pro Liter Kulturüberstand. Der Reinheitszustand des Proteins wurde durch SDS-PAGE untersucht (Abbildung 2.13). Das rekombinante Protein konnte zur Homogenität gereinigt werden und zeigt in der Coomassie-Färbung eine Bande bei 58 kDa unter reduzierenden Bedingungen im SDS-PAGE. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen erkennt man eine Bande um 55 kDa und eine bei etwa doppeltem Molekulargewicht. Die Bande bei ungefähr doppeltem Molekulargewicht deutet auf eine Bildung von Dimeren hin, welche aufgrund der geraden Anzahl an Cysteinen im Protein nicht erwartet wurde.

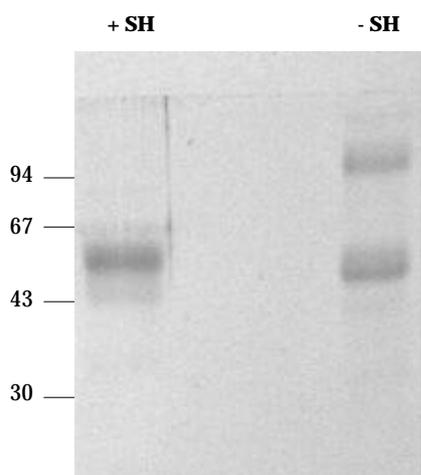


Abbildung 2.13 **Gereinigtes rekombinantes SMOC-1.** Jeweils 1 µg SMOC-1 wurde unter reduzierenden (+ SH) und nicht reduzierenden (- SH) Bedingungen auf einem 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

### 2.5.2 Produktion und Affinitätsreinigung polyklonaler Antiseren gegen SMOC-1

Das rekombinante SMOC-1 wurde für die Immunisierung von einem Kaninchen (170 µg) und einem Meerschwein (120 µg) verwendet (Firma Pineda). Die Titer gegen das Antigen wurden durch ELISA bestimmt. Das Kaninchenserum zeigte einen Titer von 1:10000 nach 65 d und das Meerschweinsersum einen Titer von 1:12000 nach der gleichen Zeit. Nach 74 Tagen wurde sowohl das Kaninchen als auch das Meerschwein ausgeblutet. Zur Entfernung möglicher Kreuzreaktivitäten wurden Aliquots des Serum über eine SMOC-1 Affinitätssäule gereinigt. Dazu wurde CNBr-Sepharose zuerst aktiviert und anschließend mit rekombinantem SMOC-1 beladen. Jeweils 5 ml Serum wurden mit der Matrix über Nacht inkubiert und die spezifischen Antikörper mit 3 M KSCN-Lösung eluiert. Da dieses chaotrope Salz die Struktur der Antikörper zerstören kann, wurden die Eluate sofort gegen TBS, pH 7,4 dialysiert. Die Funktion der Antikörper wurde mit rekombinantem SMOC-1 auf Slot-Blots überprüft.

### 2.5.3 Analyse der N-Glycosylierung von SMOC-1

Rekombinantes SMOC-1 zeigte auf dem SDS-PAGE ein apparentes Molekulargewicht von ungefähr 58 kDa im reduzierten Zustand. Das Molekulargewicht des Proteins ohne posttranslationale Modifikationen sollte rechnerisch 45694 Da betragen. Zur Analyse, ob die potentiellen N-Glycosylierungsstellen am Asn 153, Asn 214 und Asn 374 benutzt werden, wurde 1µg SMOC-1 für 2 h bei 37°C mit N-Glycosidase F behandelt und zusammen mit einer gleichbehandelten Probe ohne Enzymzugabe auf einem SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 2.14).

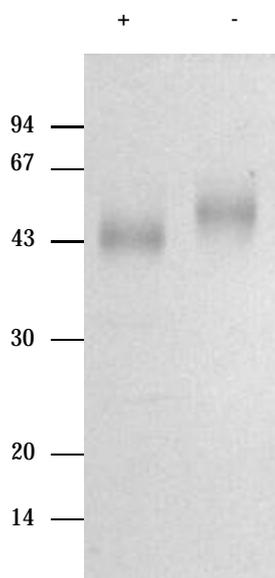


Abbildung 2.14 **N-Glycosylierung von SMOC-1.** Jeweils 1 µg SMOC-1 wurden mit Zugabe (+) bzw. ohne Zugabe von N-Glycosidase F (Roche) in 50 mM Tris, pH 7,4 für 2 h bei 37°C inkubiert und auf einem 12 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue.

Die deutliche Verringerung des apparenten Molekulargewichtes um ungefähr 15 kDa deutet auf eine ungewöhnlich ausgedehnte N-gebundene Glycosylierung hin.

#### 2.5.4 Sekundärstrukturuntersuchung an SMOC-1 mittels Circular dichroismus-Spektroskopie

Die rekombinante Expression im eukaryotischen System liefert aufgrund der posttranslationalen Modifikationen normalerweise Proteine mit korrekter Faltung und Konformation. Mit Hilfe der Circular dichroismus-Spektroskopie kann man überprüfen, ob ein Protein in Lösung Sekundärstrukturelemente und somit Konformation aufweist. Desweiteren ist es möglich den Einfluß von Kationen auf die Konformation zu messen. So zeigen Proteine, die EF-Hände enthalten oftmals eine Calcium-abhängige Konformationsänderung. Zur Analyse, ob SMOC-1 Calcium bindet, wurden CD-Spektren des Proteins aufgenommen. Dazu wurde eine Proteinkonzentration von 150 µg/ml in 5 mM Tris-HCl, pH 7,4 eingestellt. Die Messung erfolgte über einen Wellenlängenbereich von 190-260 nm, bei 25°C in einer temperierten Quarzküvette von 1 mm Schichtdicke. Das untersuchte Material zeigte jedoch entgegen der Erwartung keine Calcium-abhängige Veränderung des  $\alpha$ -helicalen Anteils (Abbildung 2.15).

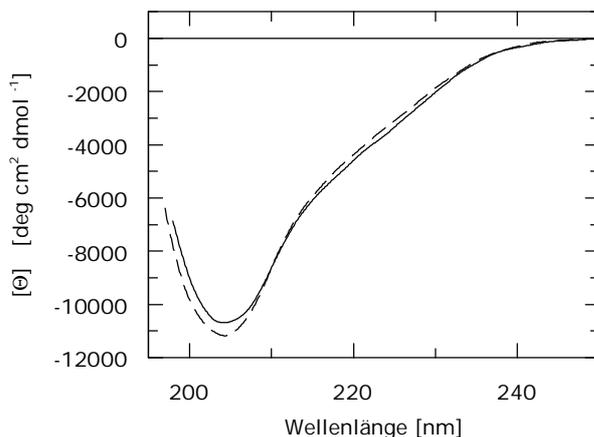


Abbildung 2.15 **CD-Spektroskopie mit SMOC-1 aus 293-EBNA-Zellen.** Rekombinantes SMOC-1 (150 µg/ml in 5 mM Tris-HCl, pH 7,4) wurde in einer Quarzküvette mit 1 mm Schichtdicke im CD-Spektrometer vermessen. Die Abbildung zeigt die Spektren nach Calcium Zugabe (2 mM) bzw nach Zugabe von EDTA (4 mM). Beide Spektren zeigten einen identischen Verlauf.

Western-Blot Analysen zeigten, daß im Kulturüberstand während der Expression in gewissem Grade Abbauprodukte auftraten. Zur weiteren Untersuchung wurde nun die wirkliche Masse des Protein durch MALDI-TOF Massenspektroskopie ermittelt.

### 2.5.5 Massenspektroskopie von SMOC-1

Die massenspektroskopische Untersuchung von SMOC-1 erfolgte auf einem Bruker Reflex III TOF-Massenspektrometer. Dazu wurde das N-Glycosidase F behandelte Protein in wäßriger Trifluoressigsäure (0,1%) gelöst, mit frischer Sinapinsäure-Lösung versetzt und durch Zugabe eines Acetonitril/Wasser-Gemisches (2:1) umkristallisiert. Die Masse des deglycosylierten Protein wurde auf 42423 Da bestimmt. Diese unterschritt die erwartete Masse von 45693 Da um 3270 Da. Ein weiteres Signal konnte bei 83449 Da detektiert werden. Unter der Annahme, daß es sich hierbei um ein Dimer handelte, berechnete sich das Molekulargewicht des Monomer auf 41724 Da.

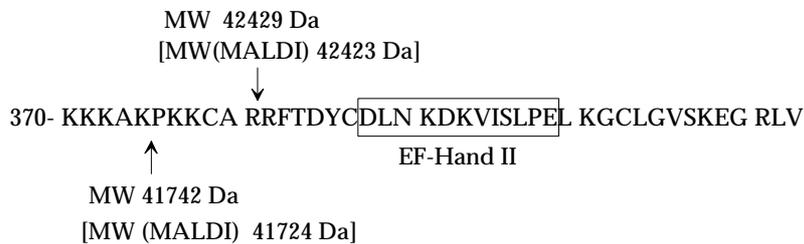


Abbildung 2.16 **Potentielle Spaltstellen in SMOC-1**. Pfeile deuten auf potentielle Schnittstellen. Die Zahlen zeigen das rechnerische Molekulargewicht eines C-terminal verkürzten Degradationsproduktes an. Angaben in eckigen Klammern zeigen die mittels MALDI bestimmten Molekulargewichte.

Eine genauere Analyse zeigte die Möglichkeit auf, daß der Massenschwund die EC-Domäne betraf, in dem die zweite EF-Hand des Proteins durch Proteolyse entfernt worden war, wenn man eine C-terminalen Degradation zugrunde legt. Eine Schnittstelle in Bereich des K 374 würde zum Verlust dreier Cystein-Reste und damit zu einer ungeraden Anzahl an Cysteinen führte. Dadurch war die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen zwei Degradationsprodukten möglich. Abbildung 2.16 zeigt zwei potentielle Spaltstellen in der Sequenz. Ob dies der Realität entspricht oder eine Abweichung in der Massenbestimmung liegt, konnte nicht entschieden werden.

### 2.5.6 Expression von SMOC-1 in HT 1080 Zellen

Da das Standard-Expressionsprotokoll mit EBNA-293 Zellen im Falle von SMOC-1 zu einem proteolytisch degradierten Protein führte, wurde ein modifizierter Expressionsvektor und eine andere Zelllinie verwendet. Das SMOC-1-Konstrukt voller Länge wurde in den Expressionsvektor pCEP-Pu-His-Myc-FX umkloniert. Dieser Vektor wurde von Frau Wuttke in unserem Labor dahingehend modifiziert, daß ein exprimiertes Protein eine N-terminale

Modifikation trägt. Es handelt sich dabei um ein His-Hexapeptid, gefolgt von einer Myc-Antikörperbindungsstelle und einer Schnittstelle für die Protease Faktor X. Das His-Hexapeptid ermöglicht die Reinigung des Protein unabhängig von seinen spezifischen Eigenschaften über eine Affinitätsmatrix, welche mit Nickel- oder Cobalt-Ionen beladen ist. Humane Fibrosarcomzellen (HT 1080) wurden bereits erfolgreich als Alternative zu EBNA-293 Zellen in unserem Arbeitskreis eingesetzt. Die transfizierten Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen wie die EBNA-293 Zellen kultiviert, jedoch bei 0,25 µg/ml Puromycin im Kulturmedium, selektioniert. Dies entspricht der Hälfte der bei EBNA-293 Zellen verwendeten Antibiotikakonzentration. Nach erfolgter Selektion wurden die Zellen mit serum-freiem Medium versorgt und die Überstände regelmäßig geerntet. Zur Inaktivierung möglicher Proteasen wurde dem geernteten Medium je 1 mM Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) und Benzamidin und die Überstände sofort bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Zur Reinigung wurde der Überstand nach Zentrifugation und Filtration gegen 50 mM Natriumphosphatpuffer mit 0,3 M NaCl, pH 7,4, dialysiert und anschließend mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min über die Affinitätsmatrix gepumpt. Das enthaltene Salz verhindert hierbei unspezifische Wechselwirkungen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Imidazolgradienten von 0-250 mM Imidazol im Laufpuffer. Die Eluate wurden auf einem SDS-PAGE aufgetrennt mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt und SMOC-1 enthaltende Fraktionen, die zwischen 50-100 mM Imidazol eluierten, wurden vereinigt. Auf diese Weise konnte in einer Ein-Schritt-Reinigung homogenes, rekombinantes SMOC-1 in der Größenordnung von 500 µg/l Zellkulturüberstand gewonnen werden.

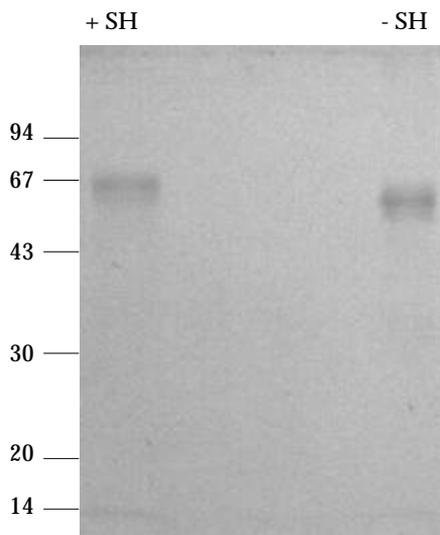


Abbildung 2.17 **Gereinigtes rekombinantes SMOC-1 aus HT 1080-Zellen.** Jeweils 1 µg SMOC-1 wurde unter reduzierenden (+SH) bzw. nicht reduzierenden (-SH) Bedingungen auf einem 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

Das Coomassie gefärbte Gel (Abbildung 2.17) zeigte unter reduzierenden Bedingungen eine Bande bei einem Molekulargewicht von etwa 67 kDa während das Protein unter nicht-reduzierenden Bedingungen eine Bande bei etwa 64 kDa zeigt. In Vergleich mit dem Material welches in EBNA-293 Zellen exprimiert wurde, erkannte man hier unter nicht-reduzierenden Bedingungen keine Bande welche auf die Bildung eines Dimer schließen ließ. Aus dieser Beobachtung konnte man darauf schließen, daß SMOC-1 aus HT 1080 Zellen nicht proteolytisch degradiert worden war, wie dies für das von EBNA-293 Zellen exprimierte Protein festgestellt wurde. Die Analyse der N-Glycosylierung ergab ein ähnliches Bild wie für das in EBNA-293 Zellen exprimierte SMOC-1 mit einer Verringerung des apparenten Molekulargewichtes nach N-Glycosidase F Behandlung um etwa 10 kDa (nicht abgebildet).

### **2.5.7 Rekombinante Expression von murinem SMOC-2 in EBNA-293 Zellen**

Das murine SMOC-2 Konstrukt wurde in den His-Hexapeptid-Expressionsvektor pCEP-Pu-His-myc-FX kloniert. Transfektion, Selektion, Kultivierung der ENBA-293-Zellen und die Reinigung des serum-freien Überstandes über die Affinitätsmatrix, erfolgten wie für SMOC-1 beschrieben. Unter diesen Bedingungen war es nicht möglich, das Protein in einem Schritt zur Homogenität zu reinigen. Dies lag unter anderem daran, daß neben der Bande zwischen 60 bis 65 kDa eine weitere Bande von 30 kDa mitgereinigt wurde. Da der anti-myc-Antikörper Immunreaktivität gegen beide Banden zeigte, konnte man davon ausgehen, daß es sich bei der 30 kDa-Bande um eine C-terminale Degradation des Gesamtprotein handelte. Als Trennsystem zur Reinigung beider Banden wurde eine ResourceS-Säule in 50 mM Tris-HCL, pH 7,4 eingesetzt. Zur Elution diente ein linearer Salzgradient von 0-1 M NaCl im gleichen Puffer. Die entsprechenden Fraktionen die das Gesamtprotein bzw. das Degradationsprodukt enthielten, wurden vereinigt und gegen 50 mM Tris-HCL, pH 7,4 dialysiert. Aliquots der vereinigten Fraktionen wurden zur Homogenitätskontrolle auf einem SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (Abbildung 2.18). Man erkennt für SMOC-2 unter reduzierenden Bedingungen eine breite Bande zwischen 60 bis 65 kDa, die im nicht-reduzierten Zustand zwischen 55 und 60 kDa läuft.

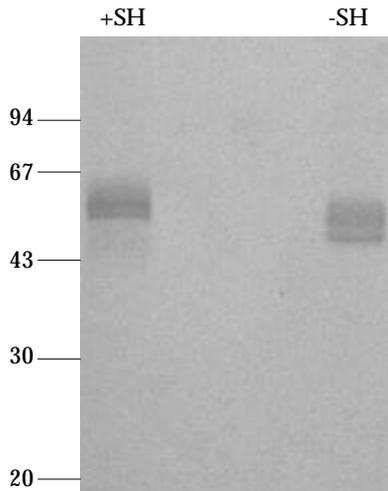


Abbildung 2.18 **Gereinigtes rekombinantes SMOC-2.** Jeweils 1 $\mu$ g SMOC-2 wurde unter reduzierenden (+SH) und nicht reduzierenden (-SH) Bedingungen auf einem 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

Das während der Reinigung abgetrennte Degradationsprodukt konnte ebenfalls zur Homogenität gereinigt werden und zeigt eine scharfe Bande bei 30 kDa (Abbildung 2.19). Sein Laufverhalten wird durch Reduktion nicht verändert.

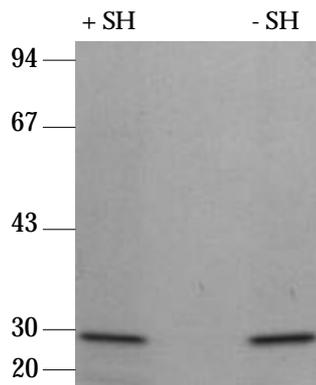


Abbildung 2.19 **Degradationsprodukt des rekombinanten SMOC-2.** Je 1  $\mu$ g der gereinigten degradierten Form des rekombinanten SMOC-2 wurde auf einem 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

### 2.5.8 Analyse der N-Glycosylierung von SMOC-2

SMOC-2 zeigt analog zu SMOC-1, eine Verringerung des apparenten Molekulargewichtes um etwa 10 kDa nach Behandlung mit N-Glycosidase-F (Abbildung 2.20). Dies zeigt, daß auch im Falle von SMOC-2 eine N-gekoppelte Glycosylierung des Proteins vorhanden ist. Entsprechende Voraussagen wurden aufgrund der Konsensussequenz für Asn 206 und Asn 362 getroffen. Die Doppelbande, die nach der N-Glycosidase-F Behandlung auftaucht deutet auf eine unvollständige Deglycosylierung durch das Enzym hin.

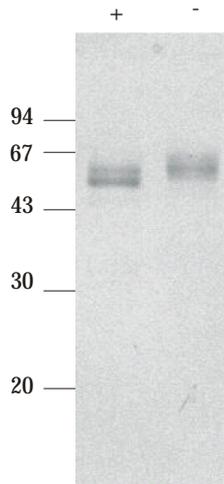


Abbildung 2.20 **Analyse der N-Glycosylierung von SMOC-2.** 1  $\mu\text{g}$  rekombinantes SMOC-2 wurde für 2 h bei 37°C mit N-Glycosidase F behandelt und anschließend auf einem 12% SDS-PAGE aufgetrennt (+). Eine parallele Kontrolle wurde, ohne Zusatz von Enzym, identisch behandelt (-). Das fertige Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

Auch das Degradationsprodukt von SMOC-2 wurde auf eine mögliche N-Glycosylierung untersucht (Abbildung 2.21). Man erkennt eine scharfe Bande bei 30 kDa, deren Laufverhalten durch die Enzymwirkung nicht verändert wurde, sowie eine Bande bei niedrigerem Molekulargewicht, die möglicherweise auf einen weiteren Abbau zurückzuführen ist. Das untersuchte Protein verändert sein Laufverhalten durch N-Glycosidase-F Behandlung nicht, was darauf hindeutet, daß die beiden N-Glycosylierungsstellen von SMOC-2 in diesem Fragment nicht mehr vorhanden ist.

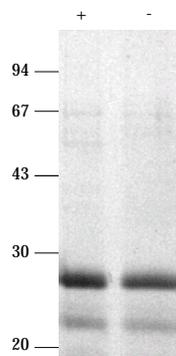


Abbildung 2.21 **Analyse der N-Glycosylierung von SMOC-2.** 2  $\mu\text{g}$  der Abbaubande von rekombinatem gereinigtem SMOC-2 wurde für 2 h bei 37°C mit N-Glycosidase F behandelt und anschließend auf einem 12 % SDS-PAGE aufgetrennt (+). Eine Kontrolle wurde parallel ohne Enzymzusatz gleich behandelt (-). Das fertige Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

Zur weiteren Untersuchung des Fragmentes wurde die wirkliche Masse des Proteins der 30 kDa Bande durch MALDI auf 22949 Da bestimmt. Eine Abstimmung mit der Proteinsequenz von SMOC-2 ergab, daß die Spaltung wahrscheinlich innerhalb der NEW-Domäne in der Nähe des T208 erfolgt war (Abbildung 2.22). Das 30 kDa-Fragment enthält somit, in Übereinstimmung mit dem Ausbleiben einer Veränderung des apparenten Molekulargewichtes nach N-Glycosidase-F Behandlung die N-Glycosylierungsstelle nicht mehr.

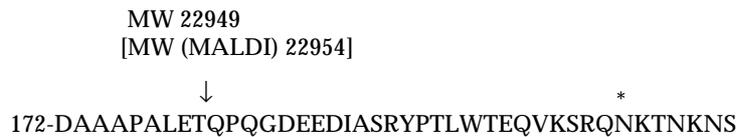


Abbildung 2.22 **Potentielle Spaltstellen in SMOC-2**. Die Zahlen zeigen das rechnerische Molekulargewicht eines C-terminal verkürzten Degradationsproduktes an. Angaben in eckigen Klammern zeigen die mittels MALDI bestimmten Molekulargewichte. Der Stern markiert die N-Glycosylierungsstelle.

### 2.5.9 CD-Spektroskopie an rekombinantem SMOC-1 und SMOC-2

Mit beiden gereinigten Proteinen wurden CD-Spektren aufgenommen. Dabei sollte untersucht werden, ob die rekombinanten Proteine in Lösung eine Faltung und damit eine Sekundärstruktur aufweisen. Desweiteren sollte eine mögliche Calcium-induzierte Änderung der Sekundärstruktur analysiert werden, die aufgrund der EF-Hände in SMOC-1 und SMOC-2 von beiden Proteinen erwartet wurde. Beide Proteine zeigten Spektren mit Minima bei 205 nm und einer Schulter bei 222 nm, welche für Proteine mit einem geringen Anteil an  $\alpha$ -Helix charakteristisch sind. Die Sekundärstruktur von SMOC-1 aus HT 1080-Zellen reagiert reversibel auf Änderungen der Calcium-Konzentration (Abbildung 2.23). Dies zeigt, daß SMOC-1 Calcium reversibel bindet. Die gleiche Abhängigkeit konnte für SMOC-2 nachgewiesen werden (Abbildung 2.23).

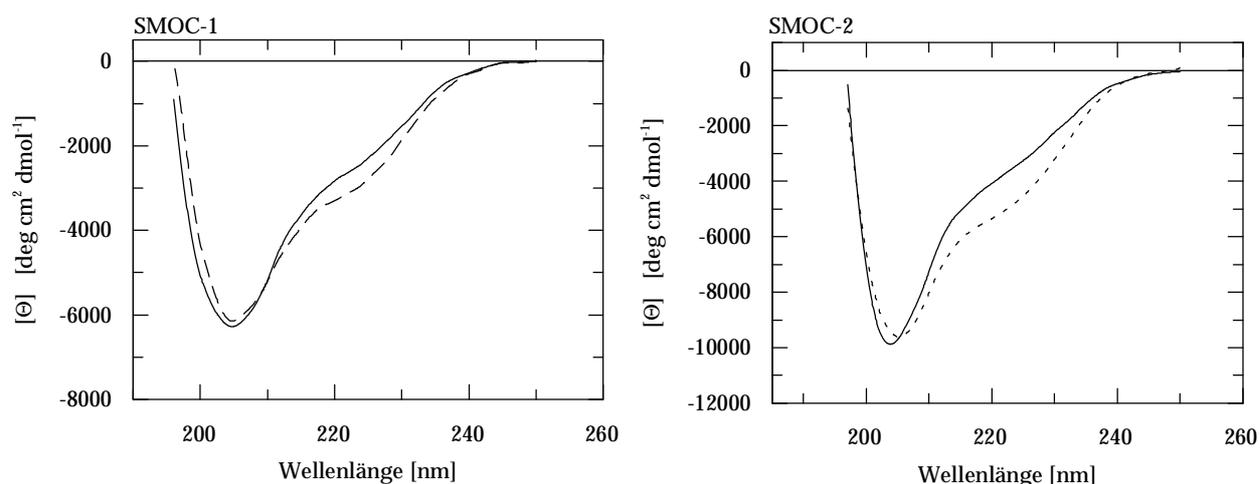


Abbildung 2.23 **CD-Spektren von SMOC-1 und SMOC-2.** Rekombinantes SMOC-1 [162  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in 5 mM Tris-HCl, pH 7,4] und SMOC-2 [123  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in 5 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,4] wurde in einer Quarzküvette mit 1 mm Schichtdicke im CD-Spektrometer vermessen. Die durchgezogenen Linien zeigen die Spektren in Abwesenheit von Calcium-Ionen, die gestrichelten Linie in Anwesenheit von 2 mM Calcium. Die unterschiedlichen Signale bei 222 nm deuten auf eine calcium-abhängige Sekundärstrukturveränderung im  $\alpha$ -helicalen Anteil der Proteine hin.

Mit dem Meßdaten der CD-Spektren wurden theoretische Berechnungen der Sekundärstrukturanteile mit den Programmen CONTIN und SELCON (Greenfield, 1996) durchgeführt (Tabelle 2.3). Für das CD-Spektrum von SMOC-1 unter Calcium-haltigen Bedingungen konnte keine Näherung mit dem Programm SELCON berechnet werden. Aus den Daten kann man eine Calcium-abhängige Änderung des  $\alpha$ -helicalen Anteil beider Proteine ersehen. SMOC-1 zeigt im CD-Spektrum insgesamt weniger Sekundärstruktur als SMOC-2, was man aus der Signalstärke der Spektren ableiten kann. Im Vergleich zu SMOC-2 fällt auch die relative Änderung des  $\alpha$ -helicalen Anteils hier geringer aus.

	SMOC-1			SMOC-2		
	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Faltblatt	Rest	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Faltblatt	Rest
CONTIN	5% (6%)	42% (42%)	53% (53%)	9% (14%)	44% (37%)	47% (48%)
SELCON	6% (k. N.)	39% (k. N.)	50% (k. N.)	10% (14%)	33% (29%)	57% (57%)

Tabelle 2.3 **Anteile einzelner Sekundärstrukturelemente an der Proteinstruktur von SMOC-1 und SMOC-2.** Die Daten wurden mit den Programmen CONTIN und SELCON aus den CD-Spektren der Proteine berechnet. Die Zahlen stehen für den Anteil des jeweiligen Sekundärstrukturelementes an der Gesamtstruktur des Proteins. Zahlen in Klammer stehen für die Sekundärstrukturanteile an der Calcium-beladenen Proteinform. Die relative Änderung des  $\alpha$ -helicalen Anteils durch die Bindung von Calcium fällt für SMOC-1 geringer aus als für SMOC-2. Mit dem Programm SELCON konnten die Spektren mit Calcium für SMOC-1 nicht berechnet werden. k.N.: keine Näherung.

### 2.5.10 Produktion und Affinitätsreinigung polyklonaler Seren gegen SMOC-2

Hierzu wurden 290 µg SMOC-2 zur Immunisierung eines Kaninchens und 980 µg SMOC-2 Degradationsprodukt zur Immunisierung eines Meerschweines an die Firma Pineda gesendet. Nach 45 Tagen verstarb aus ungeklärter Ursache das Kaninchen. Das aus dem toten Tier isolierte Serum wurde einer Protein-A-Reinigung unterzogen. Das Serum des Meerschweins wies nach 71 Tagen einen Antigen-Titer von 1:70000 auf und wurde nach 76 Tagen ausgeblutet. Beide Antiseren zeigten eine hohe Reaktivität gegen rekombinantes SMOC-2. Das Antiserum aus Kaninchen wurde, wie für SMOC-1 beschrieben, einer Affinitätsreinigung unterzogen und die Funktion der eluierten Antikörper auf Slot-Blots gegen rekombinantes SMOC-2 geprüft.

### 2.5.11 Analyse der Kreuzreaktivität von SMOC-1 und SMOC-2 Antiseren innerhalb der BM-40 Familie

Zu Beginn der Analyse der Gewebeverteilung von SMOC-1 und SMOC-2 auf der Ebene der Immunoblots wurde eine mögliche Kreuzreaktivität der Kaninchen-Antiseren gegen die Mitglieder der BM-40-Familie, die als rekombinante Proteine in unserem Arbeitskreis vorhanden waren, untersucht. Hierzu wurden gleiche Proteinmengen zum einen direkt auf Nitrocellulose aufgetragen (Abbildung 2.24), zum anderen wurden Immunoblots nach SDS-PAGE angefertigt (Abbildung 2.25). Im ersten Fall liegen die Proteine im nativen Zustand auf der Membran vor, während sie nach der SDS-PAGE durch die Detergenzbehandlung denaturiert worden sind.

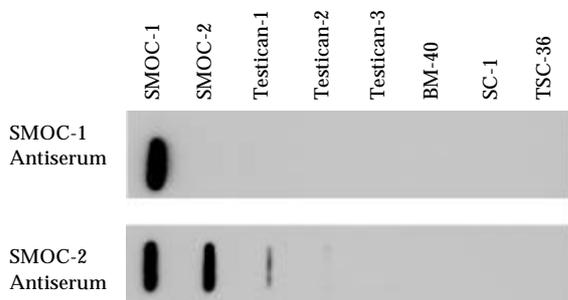


Abbildung 2.24 **Kreuzreaktivität I** Je 50 ng rekombinantes Protein der BM-40 Familienmitglieder wurde auf eine Nitrocellulosemembran aufgebracht und mit dem Antiserum gegen SMOC-1 und SMOC-2 in der Verdünnung 1:1000 inkubiert. Die Detektion der Signale erfolgte mittels ECL.

Es zeigten sich dabei deutliche Unterschiede, sowohl im Verhalten der beiden Antiseren aus Kaninchen, als auch zwischen den angewendeten Methoden. Das Antiserum gegen SMOC-1

zeigt in beiden Methoden keine Kreuzreaktivität mit den getesteten Proteinen. Das SMOC-2 Antiserum zeigt eine klare Kreuzreaktivität gegen natives SMOC-1, jedoch nicht gegen denaturiertes SMOC-1. Desweiteren zeigt das SMOC-2-Antiserum in beiden Methoden eine deutliche Reaktivität mit Testican-1 und eine schwache Reaktivität mit Testican-2.

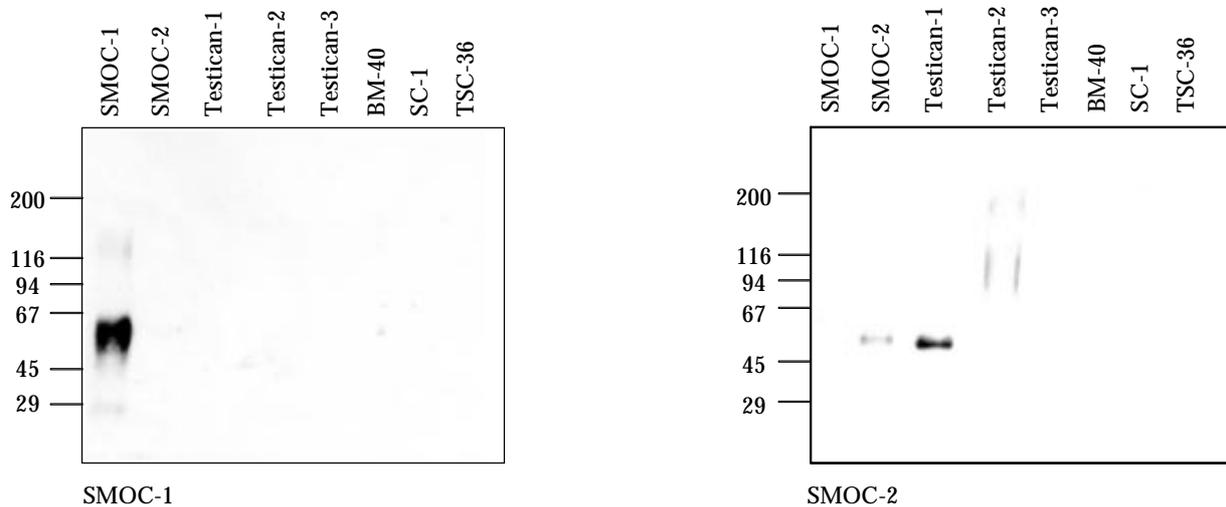


Abbildung 2.25 **Kreuzreaktivität II** Zur Überprüfung der Antisera von SMOC-1 und SMOC-2 auf Kreuzreaktivität innerhalb der BM-40-Familie wurden je 50 ng der rekombinanten Proteine auf einer 4-15% SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Anschließend wurden sie mit dem entsprechenden Kaninchen-Antiserum in der Verdünnung 1:1000 inkubiert und die Signale mittels ECL sichtbar gemacht.

## 2.6 Endogene Expression von SMOC-1 und SMOC-2 in verschiedenen Zelltypen

Die Expression von SMOC-1 und SMOC-2 in serumfreien Kulturüberständen verschiedener Zelltypen wurde unter Zellkulturbedingungen getestet. Dazu wurden gleiche Mengen an konditioniertem Medium verschiedener Zelltypen (Abbildung 2.26) auf einem Immunoblot untersucht. Soweit nicht anders erwähnt, handelte es sich um Zellen humanen Ursprungs. Für SMOC-1 erkennt man eine Hauptbande um 90 kDa. Diese tritt in allen positiv reagierenden Überständen auf. Für WI-26, HT1080, HTB-94, MG-63 und MDA-MB231 erkennt man eine weitere Bande bei etwa 75 kDa. Wi-26 Zellen zeigen darüber hinaus eine Bande um 50 kDa. Das auffälligste Bandenmuster zeigen die MCF-7 Zellen. Neben der 90 kDa Bande, die auch in anderen Zellen gefunden wird, treten zwei kleinere Banden bei etwa 30 und 40 kDa auf. Eine Bande bei höherem Molekulargewicht um 150 kDa findet man in MG-63, A 431 und A-375 Zellen. In C6, Pam212 und HEL-37 Zellen findet man keine SMOC-1 Expression. Ein anderes Bild findet man für SMOC-2. Die Hauptbande liegt hier bei einem apparenten Molekulargewicht um 50 kDa. Eine Bande um 65 kDa findet man in

HT 1080, A-431, Pam212, HEL-37 und A-375-Zellen. Hel-375 weist noch zwei weitere Banden mit Molekulargewichten um 150 kDa und 30 kDa auf. Auch im Fall von SMOC-2 zeigen MCF-7 Zellen ein auffällig anderes Bandenmuster. Man erkennt zwei Banden bei etwa 38 kDa bzw. 40 kDa. auf. Möglicherweise zeigen diese Zellen eine verstärkte proteolytische Aktivität. SMOC-2 wurde nicht von so vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert wie SMOC-1. So wurde kein SMOC-2 in den Chondrosarcom- und Osteosarcomzellen gefunden. Dies gilt ebenfalls für die C6-Glioma Zellen. Aufgrund der unterschiedlichen Bandenmuster für SMOC-1 und SMOC-2 kann man davon ausgehen, daß die Kreuzreaktivität zwischen beiden in dieser Methode zu vernachlässigen ist.

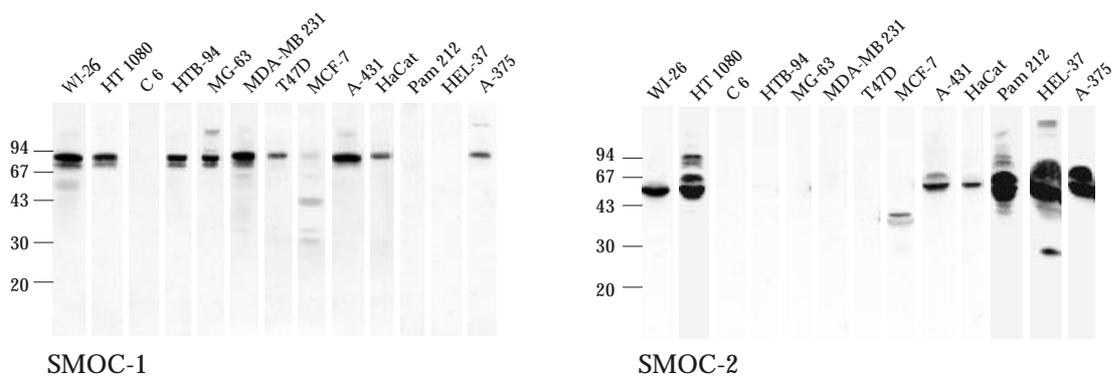


Abbildung 2.26 **Endogene Expression von SMOC-1 und -2 in verschiedenen Zelltypen.** Serumfreie Kulturüberstände wurden gesammelt, jeweils 1 ml wurde mit Trichloressigsäure präzipitiert (TCA-Fällung), auf einem 12%-SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Die Membranen wurden mit den entsprechenden Antiseren gegen SMOC-1 und SMOC-2 in der Verdünnung 1:1000 inkubiert, die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz. Folgende Zellen wurden untersucht: Fibroblasten (WI-26), Fibrosarcoma-Zellen (HT 1080), Ratten-Glioma Zellen (C6), Chondrosarcoma- und Osteosarcoma-Zellen (HTB-94; MG-63), Brustkrebs-Zellen (MDA-MB 231, T47D, MCF-7), Epidermale Carcinomzellen (A-431), Keratinocyten (HaCat, Hel-37), Maus-Keratinocyten (Pam 212) und Melanom-Zellen (A-375)

Zur Überprüfung, ob die erhaltenen Signale spezifisch für SMOC-1 waren, wurde ein Inhibitionsexperiment durchgeführt. Hierzu wurde eine SMOC-1 Antiserumverdünnung aufgeteilt und eine Hälfte mit rekombinantem SMOC-1 Protein versetzt. Spezifische Antikörper konnten so durch Bindung an das Protein aus der Serumverdünnung entfernt werden. Beide Verdünnungen wurden zur Entwicklung eines Immunoblots verwendet wobei beide Blots exakt für die gleiche Zeit auf dem Röntgenfilm exponiert wurden. (Abbildung 2.27).

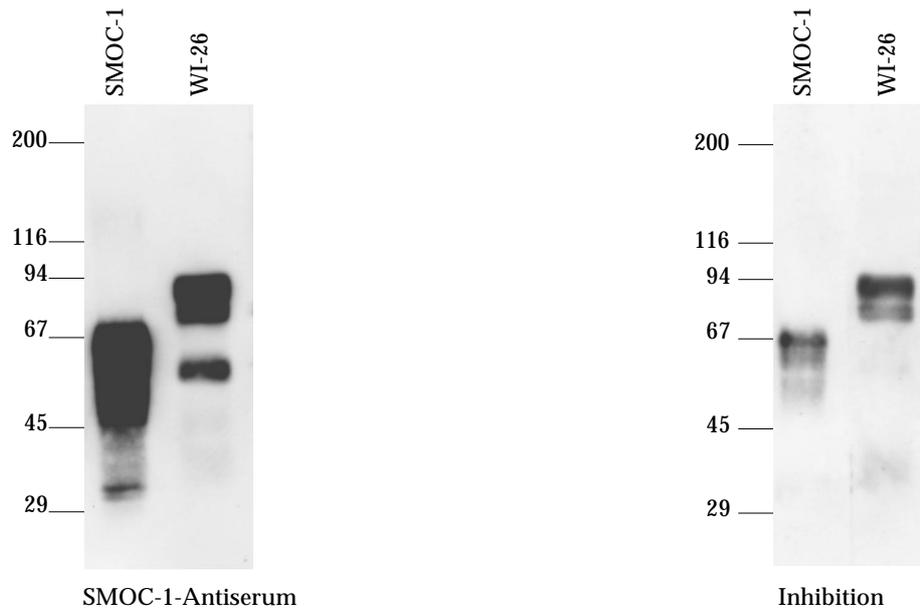


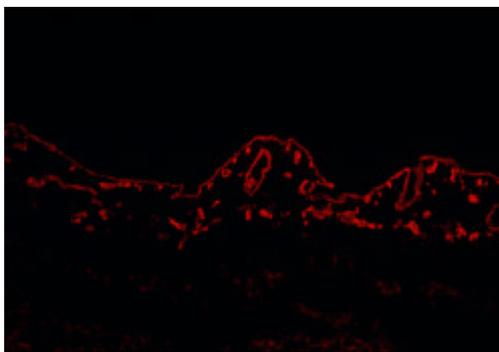
Abbildung 2.27 **Inhibition des SMOC-1-Antiserum.** 200 ng rekombinantes SMOC-1 und 1 ml TCA-präzipitierter serumfreier WI-26-Kulturüberstand wurden auf einem 4-15 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Zwei SMOC-1-Antiserumverdünnungen (1:1000) wurden angesetzt und eine davon mit 20 µg rekombinantem SMOC-1 versetzt. Nach 2 h Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Membranen mit den entsprechenden Verdünnungen inkubiert und die Signale mit ECL sichtbar gemacht.

Aus der Abbildung wird ersichtlich, daß die Signalintensität für rekombinantes Protein drastisch gesenkt werden konnte. Allerdings gelang es nicht, das Signal vollständig zu inhibieren. Das Gleiche galt für den Kulturüberstand von WI-26 Zellen. Auch hier konnte eine starke Signalreduktion beobachtet werden.

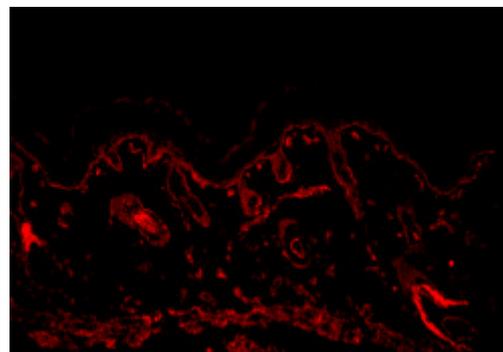
## 2.7 Immunhistochemische Untersuchungen mit Antiseren gegen SMOC-1 und SMOC-2

Für die Analyse der Expression von SMOC-1 und SMOC-2 mittels Immunfluoreszenz wurden, soweit nicht anders erwähnt, Gewebeschnitte von Paraffin-eingebetteten Mausorganen verwendet. Es zeigte sich, daß das Kaninchen-Antiserum gegen SMOC-2, auch nach Behandlung der Gewebeschnitte mit Hyaluronidase und Proteinase K zur Verbesserung der Zugänglichkeit der Epitope, keine Signale ergab. Das gleiche galt für die affinitätsgereinigten Antikörper gegen SMOC-1 und SMOC-2. Nur das polyklonale Kaninchenserum gegen SMOC-1 zeigte spezifische Signale auf Mausschnitten. Somit konnte nur die Verteilung von SMOC-1 in Mausgewebe untersucht werden. Eine Serie von Färbungen wurde auf Kopf- und Rumpfschnitten von neugeborenen Mäusen durchgeführt. Diese Färbungen zeigten eine Lokalisation von SMOC-1 im Bereich der Basalmembranzonen vieler Organe. Aus diesem Grund wurden Kontrollfärbungen mit einem EHS-Laminin

Antiserum auf seriellen Schnitten durchgeführt. EHS-Laminin enthält zum größten Teil aus Laminin-1. Dieses besteht aus den drei Lamininketten  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  und  $\gamma 1$ , welche auch einzeln vom verwendeten Antiserum erkannt werden. Aufgrund der Zusammensetzung der verschiedenen Laminine aus mindestens einer der genannten Ketten, werden bis auf Laminin-5 ( $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ ) und die neuen Laminine 13 ( $\alpha 3\beta 2\gamma 3$ ), 14 ( $\alpha 4\beta 2\gamma 3$ ) und 15 ( $\alpha 5\beta 2\gamma 3$ ) alle bekannten Laminine erkannt. In der Haut (Abbildung 2.28) trennt die Basalmembran die Epidermis von der tiefer liegenden Dermis. Wie aus Abbildung 2.28 ersichtlich, findet man sowohl für SMOC-1 als auch für Laminin Signale in der Basalmembranzzone, desweiteren um die in der Haut liegenden Haarfollikel und um Gefäße. Das SMOC-1-Serum zeigt bei der eingesetzten Verdünnung in den tieferen Hautschichten eine schwache Hintergrundfärbung.



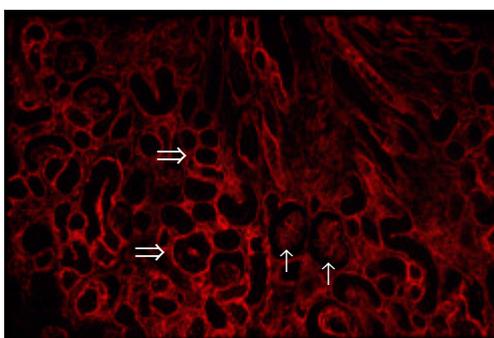
Laminin



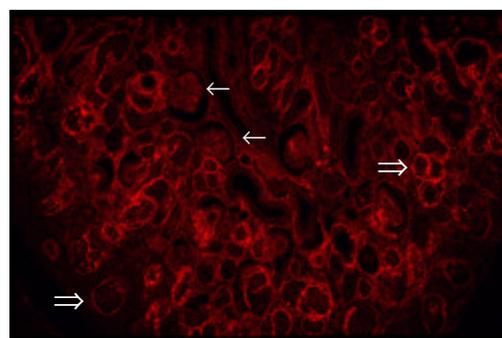
SMOC-1

Abbildung 2.28 **Gewebeverteilung in der Haut.** Die Abbildung stellt die Färbung für Laminin und SMOC-1 auf Hautschnitten neugeborener Mäuse dar. Man erkennt für beide Proteine eine Kolokalisation in der Basalmembran und um die Haarfollikel und um Gefäße herum. Bei den Signalen für SMOC-1 in den tieferen Hautregionen handelt es sich um Hintergrundfärbung. Die Aufnahmen zeigen eine 200-fache Vergrößerung.

In der Niere findet man Basalmembranen um eine Vielzahl verschiedener Strukturen herum. Sie umschließen sowohl die sogenannten Tubuli als auch die Glomeruli. Eine Einheit aus



Laminin

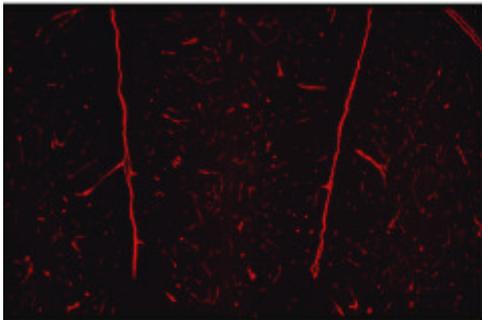


SMOC-1

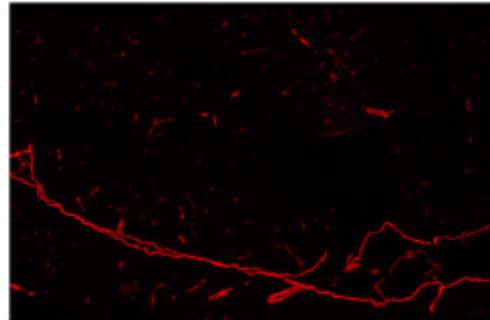
Abbildung 2.29 **Gewebeverteilung in Niere.** Die Abbildung zeigt eine Färbung für Laminin und SMOC-1 auf Nierenschnitten adulter Mäuse. Die Pfeile deuten auf ausgewählte Glomeruli (←) bzw. Tubuli (=>). Weitere Erläuterungen im Text. Die Aufnahmen zeigen eine 200-fache Vergrößerung.

Glomerulus mit zugehörigem Tubulus wird als Nephron bezeichnet. Die gezeigte Gegenüberstellung der Färbung für SMOC-1 und Laminin in der Niere, zeigen eine weitgehende Kolo-kalisation sowohl in den Glomeruli als auch in den Tubuli (Abbildung 2.29). Die Färbungen wurden auf Gewebeschnitten von Nieren adulter Mäuse durchgeführt, da die genannten Strukturen in neugeborenen Mäusen noch nicht entwickelt und daher nur schwer zu erkennen sind. Abbildung 2.30 zeigt die Lokalisation von SMOC-1 im Hippocampus und im Cerebellum. Man erkennt deutlich die positiven Signale im Bereich der inneren Hirnhäute. Diese gliedern sich in Dura mater, Arachnoidea und Pia mater. Auf der lichtmikroskopischen Ebene ist es nicht zu entscheiden, ob die Färbung einer bestimmten Schicht zugeordnet werden kann. Zusätzlich färbt Laminin angeschnittene Gefäße; diese Färbung ist mit SMOC-1 nur schwierig jedoch eindeutig zu erkennen, da das SMOC-1-Antiserum eine Hintergrundfärbung zeigt. Aus diesem Grund ist es schwierig zu entscheiden, ob eine Färbung neuronaler Zellen (nicht abgebildet) auf eine spezifische Reaktion mit SMOC-1 zurückzuführen ist oder der Hintergrundfärbung zugeschrieben werden muß.

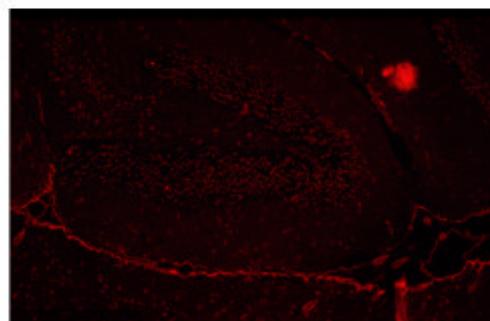
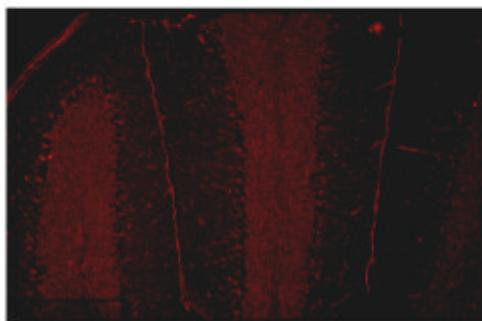
Cerebellum



Hippocampus-Region



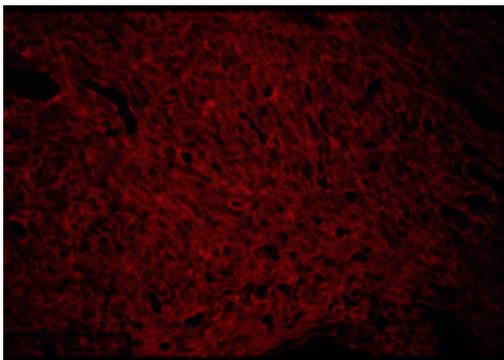
Laminin



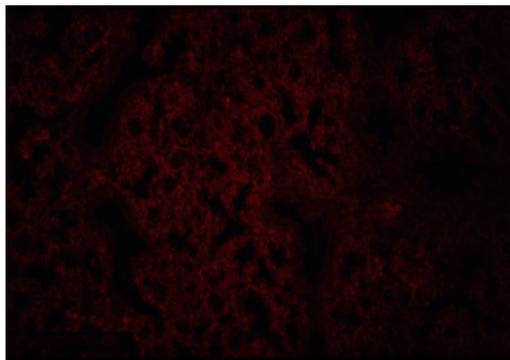
SMOC-1

Abbildung 2.30 **Gewebeverteilung im Gehirn.** Die Abbildung zeigt Färbungen für SMOC-1 und Laminin auf Hirngewebeschnitten neugeborener Mäuse. Man erkennt die übereinstimmende Färbung im Bereich der inneren Hirnhäute. Weitere Erklärungen befinden sich im Text. Die Aufnahmen zeigen eine 100-fache Vergrößerung.

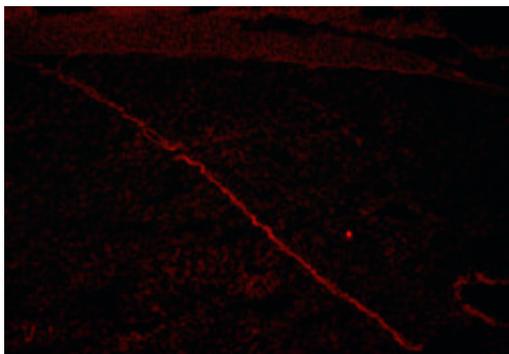
Im Weiteren wird gezeigt werden, daß die SMOC-1-spezifischen Signale, durch die Präinkubation der Antiserumverdünnung mit rekombinantem SMOC-1 inhibiert werden konnten. Abbildung 2.31 zeigt die Lokalisationen von SMOC-1 in Herz, Lunge, Leber und Muskel neugeborener Mäuse. Man erkennt im Herzen eine Färbung um die Muskelfasern. Herz bzw. Lungenschnitte zeigen eine Hintergrundfärbung, wie sie auch auf den Hirnschnitten auftritt. In der Leber findet man keine Färbung, da die Zellen der Leber (Hepatocyten, Endothelzellen und Kupffer-Zellen) keine Basalmembran besitzen. Allerdings ist die Außenseite der Leber gefärbt, die von einer Basalmembran umhüllt wird. Im Skelettmuskelgewebe findet man ebenfalls, analog zum Herzen, eine Färbung um die Muskelfasern herum; auch hier handelt es sich um eine begrenzende Basalmembran. Vergleicht man die Färbungen um die Leber und in Skelettmuskel dieser Mäuse mit den Färbungen in Herz und Lunge, so fällt auf, daß die Hintergrundfärbung deutlich niedriger ausfällt. Dies deutet darauf hin, daß es sich um einen Effekt handelt, der abhängig vom betrachteten Zelltyp auftritt.



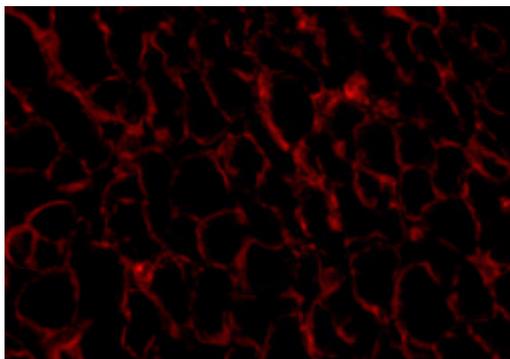
Herz



Lunge



Leber



Muskel

Abbildung 2.31 **Gewebeverteilung in Herz, Lunge, Leber und Muskel.** Die Abbildung zeigt Färbungen für SMOC-1 auf verschiedenen Gewebeschnitten von neugeborenen Mäusen. Die Aufnahmen zeigen eine 100-fache Vergrößerung für die Leber und jeweils eine 400-fache Vergrößerung für die restlichen Organe. Weitere Erklärungen im Text.

Ein Unterschied in der Lokalisation von SMOC-1 und Laminin zeigte sich bei der Untersuchung adulter Ovarienschnitte. Entgegen der sonstigen Kolo­kalisierung beider Proteine unterschied sich das Expressionsmuster hier vollkommen (Abbildung 2.32). Das Laminin-Antiserum färbt die Basalmembran, welche ein Follikel umgibt. Das SMOC-1 Antiserum zeigt keine Färbung dieser Basalmembran; jedoch wird der äußere Bereich der Oocyte gefärbt. Zeigt der obere Teil der Abbildung (A) ein reifes Follikel, so trifft diese Aussage auch auf weniger reife Vorstufe der Follikel zu (B). Oocyten werden von einer Schicht umgeben, die als Zona pellucida bezeichnet wird. Die Hauptproteine, die maßgeblich an ihrem Aufbau beteiligt sind, sind in der Literatur beschrieben (Bleil, J.D., 1980a; Bleil, J.D., 1980b; Greve, J.M., 1985). Es gibt keinerlei Sequenzhomologie eines dieser Proteine zu dem beschriebenen SMOC-1 oder SMOC-2. Aus Abbildung 2.34 erkennt man, daß SMOC-1 in diesem Bereich der Oocyte nicht vorkommt.

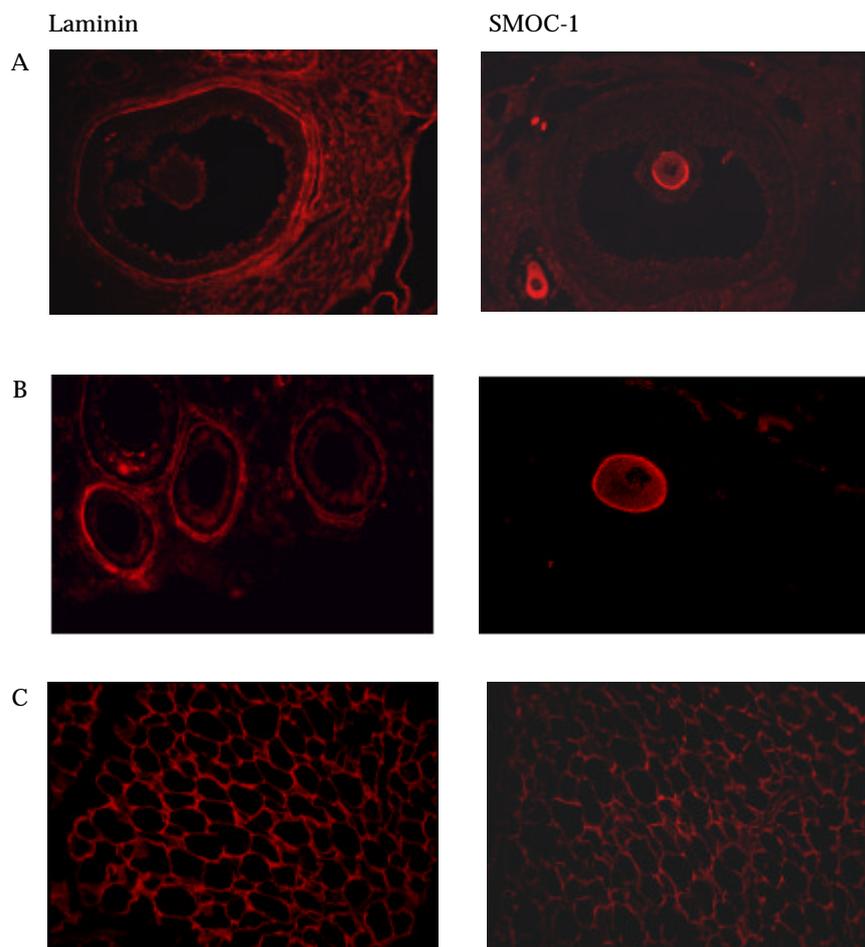


Abbildung 2.32 **Gewebeverteilung in Ovarien.** Die Abbildung zeigt Ovarien adulter Mäuse, welche auf 10  $\mu\text{m}$  Dicke geschnitten und mit spezifischen Antikörpern wie beschrieben ange­färbt wurden. Man erkennt deutlich die unterschiedliche Expression von Laminin und SMOC-1 im Bereich der Follikel (A, B). Während Laminin in der Basalmembran um das Follikel zu finden ist, färbt SMOC-1 spezifisch im Bereich um die Oocyten. Im benachbarten Fettgewebe des Ovar (C) ist die Kolo­kalisierung für beide Proteine wieder vorhanden. Die Aufnahmen zeigen 100-fache Ver­größerung für Abbildung A, 200-fache Ver­größerung für Abbildung B (links) und 400-fache Ver­größerung für die restlichen Abbildungen.

Gewissermaßen als interne Kontrolle diente das zusammen mit den Ovarien präparierte Fettgewebe. In diesem existiert eine Basalmembran, welche die Fettzellen umschließt und sowohl vom Laminin-Antiserum als auch vom SMOC-1 Antiserum gefärbt wird. Man fand hier eine eindeutige Kolokalisation der untersuchten Proteine (Abbildung 2.32, C).

## 2.8 Inhibition des SMOC-1-Antiserum auf Gewebeschnitten

Zur Kontrolle, ob es sich bei den Färbungen um SMOC-1-spezifische Signale handelt, wurden Inhibitionsexperimente auf Gewebeschnitten durchgeführt. Hierzu wurde eine SMOC-1-Antiserumverdünnung (1:1000) mit an CNBr-Sepharose gekoppeltem SMOC-1 versetzt und für 2 h inkubiert. Der Überstand wurde dann für die Färbung eines Ovarienschnittes verwendet. Während einer solchen Inkubation binden vorhandene Antikörper gegen SMOC-1 an das gekoppelte Protein und können so aus dem Serum entfernt werden. Auf einer Gewebefärbung mit diesem behandelten Antiserum sollten dann die spezifischen Signale für SMOC-1 nicht mehr sichtbar sein. Vergleicht man die Ovarienfärbung von nicht behandeltem SMOC-1-Antiserum mit der von behandeltem so erkennt man, daß das Signal um die Oocyten verschwindet (Abbildung 2.33). Diese Abbildung zeigt eine weitere Kontrolle, bei der auf dem Ovarienschnitt nur der Sekundärantikörper eingesetzt wurde, um dessen mögliche unspezifische Reaktion auszuschließen. Man erkennt aus der Abbildung 2.35, daß das spezifische Signal für SMOC-1 um die Oocyte (A) durch die Inhibition verschwindet (B). Nur die Hintergrundfärbung im inneren ist noch zu sehen. Die Färbung mit dem Zweitantikörper (C) zeigt nur unspezifische Färbung im umgebenden Gewebe jedoch nicht im Follikel.

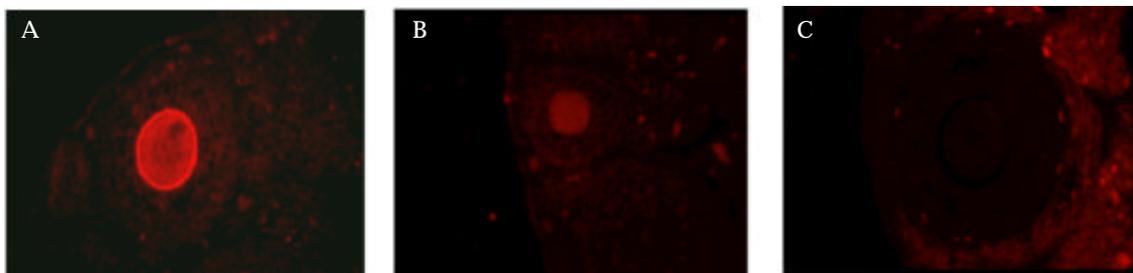
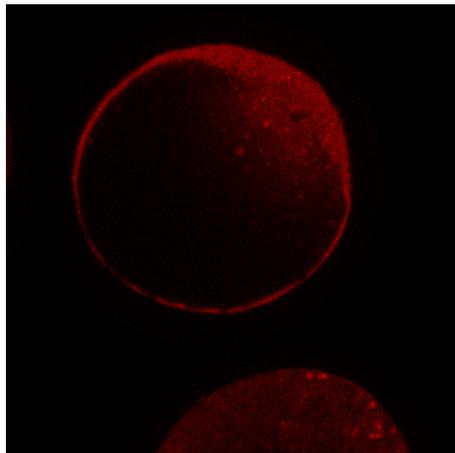


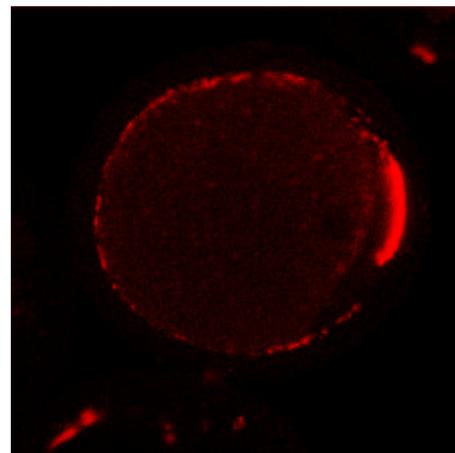
Abbildung 2.33 **Inhibition von SMOC-1 spezifischen Signalen auf Ovarienschnitten.** Die Abbildung zeigt verschiedene Färbungen auf seriellen Ovarienschnitten. A) Färbung mit SMOC-1 Antiserum (Kaninchen, 1:1000). Man erkennt ein scharfes Signal um die Oocyte. B) Inhibitionsversuch mit SMOC-1-Antiserum. Die entsprechende Verdünnung (1:1000) wurde mit an CNBr-Sepharose gekoppeltem rekombinantem SMOC-1 präinkubiert und der Überstand für die anschließende Färbung verwendet. C) Färbung auf einem Ovarienschnitt wobei nur der Sekundärantikörper verwendet wurde. Man erkennt eine leichte unspezifische Reaktion im Gewebe welches das Follikel umgibt. Alle Aufnahmen zeigen eine 400-fache Vergrößerung.

## 2.9 Analyse der SMOC-1-Expression an Maus-Oocyten

Aus superovulierten Mäusen wurden Oocyten präpariert, an denen Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt wurden. Dazu wurde ein Teil der Oocyten zur Permeabilisierung der Zellmembran mit Detergenz behandelt, während der andere Teil ohne diese Behandlung



mit Detergenzbehandlung



ohne Detergenzbehandlung

Abbildung 2.34 **Immunhistochemische Analyse von Maus-Oocyten.** Frisch entnommene Maus-Oocyten wurden wie beschrieben spezifisch für SMOC-1 gefärbt. Man erkennt eine Färbung im Außenbereich der Oocyte, unabhängig, ob diese einer Detergenzbehandlung unterzogen wurde oder nicht. Die Abbildung zeigt eine 640-fache Vergrößerung.

gefärbt wurde. Die gefärbten Oocyten wurden unter einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop betrachtet und fotografiert (Abbildung 2.34). Man erkennt eine deutliche Färbung rund um die Oocyten. Dies deutet darauf hin, daß es sich um eine Membranassoziierte Färbung handelt, wobei man aufgrund der angewandten Methode entscheiden kann, daß die Färbung an der Außenseite der Membran lokalisiert ist. Auffällig ist, daß offensichtlich in beiden Fällen das Polkörperchen stark angefärbt wird. Die Zona pelucida ist dagegen nicht gefärbt; dies ist in Abbildung 2.34 zu erkennen. Parallel wurden Oocyten im Immunoblot auf das Vorkommen von SMOC-1 getestet (Abbildung 2.35).

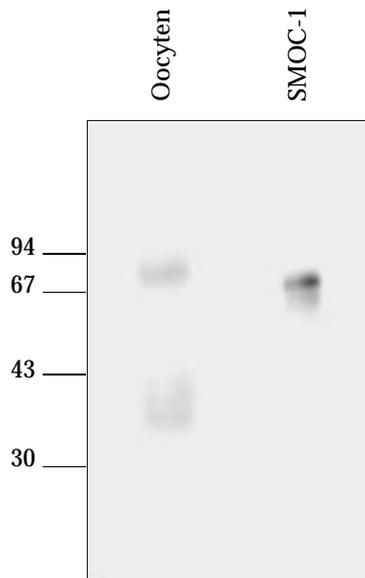


Abbildung 2.35 **Immunoblot von Maus-Oocyten-Extrakt**. Maus-Oocyten aus superovulierten Mäusen (350-400 Stück) wurden in reduzierendem Probenpuffer suspendiert und nach Inkubation bei 95°C für 10 min auf einem 12% SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Kontrolle wurde 5 ng rekombinantes SMOC-1 aufgetragen. Die Membran wurde nach dem Blotten mit anti-SMOC-1-Serum (1:1000) inkubiert.

Man detektiert mit dem Antiserum gegen SMOC-1 ein Signal bei einem Molekulargewicht von etwa 80 kDa, welches nur unwesentlich größer als das rekombinante Protein ist. Dies könnte auf abweichende posttranslationale Modifikationen im Gewebe zurückzuführen sein. Eine diffuse Bande tritt im Oocytenextrakt zwischen 35 und 40 kDa auf. Hierbei könnte es sich um einen proteolytischen Abbau des Proteins handeln. Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, daß SMOC-1 in einer Unterstruktur der Ovarien, den Oocyten, lokalisiert ist. Ein Vorkommen neben bekannten Proteinen in der Zona pellucida läßt sich hierbei ausschließen.

## 2.10 Neue Testicanhomologe

Im zweiten Projekt wurde eine EST-Datenbank gestützte Homologiesuche unternommen. Dabei wurden EST-Klone entdeckt, die eine signifikante Homologie zu einem Protein der BM-40 Familie zeigen, welches als Testican bezeichnet wird und erstmals von Alliel et al. (1993) beschrieben wurde. Es handelt sich um ein modular aufgebautes Proteoglycan und stellt damit das bislang einzige Familienmitglied innerhalb des BM-40-Verbundes dar, welches zwei Glycosaminoglycan-Seitenketten (GAG-Ketten) enthält. Anhand der Datenbankanalyse wurden drei verschiedene EST-Klone humanen Ursprungs gefunden. Zwei von ihnen waren untereinander identisch und zeigten 40 % Sequenzhomologie zum bekannten Testican. Der dritte Klon war nicht identisch mit den zwei anderen EST-Klonen und zeigte zum bekannten Testican eine Sequenzhomologie von 35 %. Dies deutete auf die Existenz zweier, bislang unbekannter Testican-Homologe hin.

## 2.11 Durchmusterung der cDNA-Bibliothek nach Testican-2 und Testican-3

Zur Durchmusterung einer cDNA-Bibliothek wurden zwei EST-Klone erworben und zur Generierung von Sonden benutzt. Wiederum wurde die cDNA-Bibliothek aus humanem fötalen Gehirn zur Durchmusterung verwendet. Da beide EST-Klone humanen Ursprungs waren, konnte man von einer perfekten Übereinstimmung zwischen Sonde und cDNA ausgehen. Als Sonden für die Hybridisierung diente für eine HindIII/ApaI-Fragment bzw. ein AccI/SacI-Fragment. Die Hybridisierung wurde für beide Sonden bei moderat stringenten Hybridisierungsbedingungen durchgeführt, um positive Signale nicht frühzeitig zu verlieren. Auch hier waren mehrere Schritte von Hybridisierung und Vereinzelung der Phagenklone notwendig. Am Ende dieser Prozedur wurden sieben unabhängige Phagenklone ausgeschnitten, zirkularisiert und zur Bestimmung ihrer Identität sequenziert. Dabei wurde festgestellt, daß neben der Isolierung zweier neuer Testican-Homologe eine cDNA voller Länge isoliert wurde, die für das bereits in der Literatur beschriebene Testican codiert. Dieser Klon wurde im Rahmen einer Zusammenarbeit an Dr. E. Kohfeldt (MPI; Martinsried) weitergegeben, der sich zu diesem Zeitpunkt mit der Charakterisierung dieses Proteins beschäftigte. Abbildung 2.36 gibt einen schematischen Überblick über die analysierten cDNA-Klone.

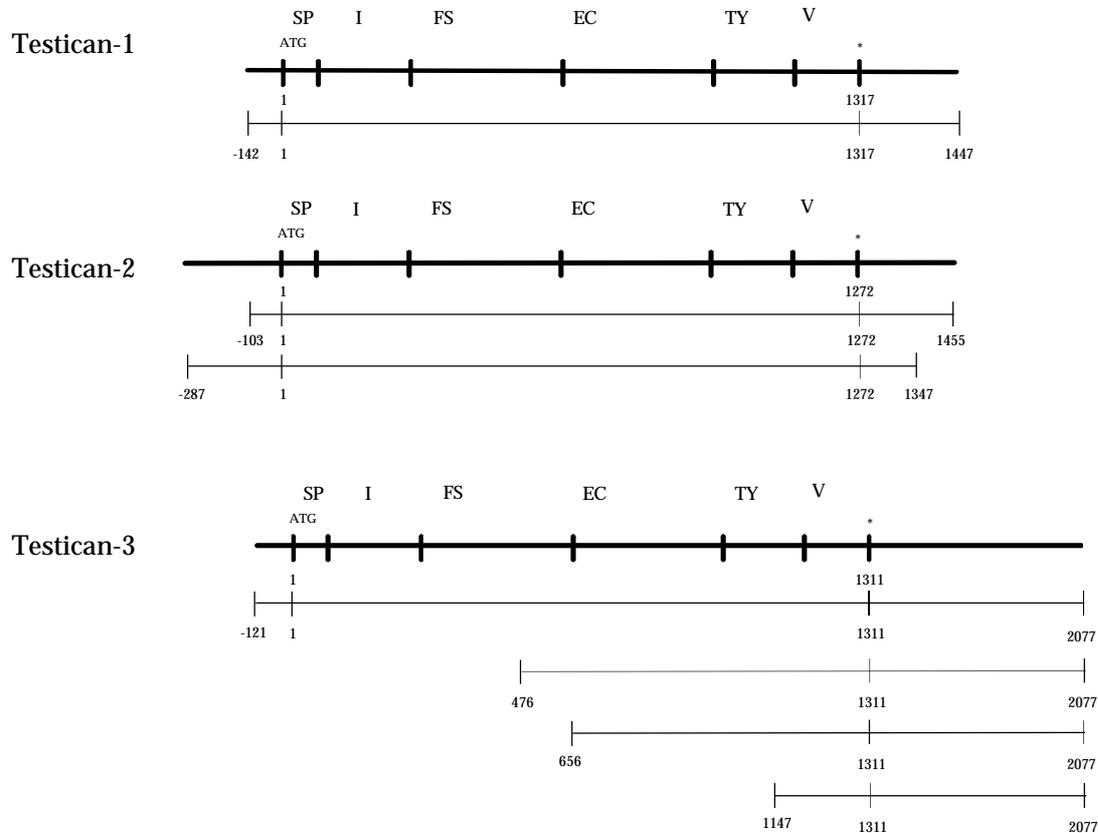


Abbildung 2.36 **Schematische Darstellung der cDNA Klone von humanem Testican-1, -2 und -3.** Die Länge der cDNA-Klone wie auch deren Position im offenen Leseraster sind durch Zahlen markiert. SP: Signalpeptid, I, V: Domänen ohne erkennbare Homologie, FS: Follistatin-ähnliche Domäne, EC: extrazelluläre calcium-bindende Domäne, TY:Thyroglobulin-ähnliche Domäne, \*: Stop-Codon.

Für das von Alliel bereits charakterisierte Testican der Name Testican-1 reserviert, während die beiden Homologe als Testican-2 und Testican-3 bezeichnet wurden. Ein Teil der folgenden Daten für Testican-2 wurde bereits publiziert (Vannahme et al., 1999). Die Analyse der Sequenzierung ergab, daß für jedes der Testicane mindestens ein cDNA-Klon isoliert werden konnte, der das vollständige offene Leseraster umspannte. Damit war für die weitere Charakterisierung der neuen Homologe die Möglichkeit gegeben, Proteine vollständiger Länge rekombinant zu exprimieren.

## 2.12 Domänenaufbau der Testicane

Aus den erhaltenen Sequenzdaten der cDNA-Klone voller Länge für Testican-2 und Testican-3 wurden die Aminosäuresequenzen übersetzt und analysiert (Abbildung 2.37 und 2.38).

```

1-GGTATGATGATGTCAAACGTGATGCTGATGCTACAGTTACAGCCCTGCTGGCGCAGCCTCTCTGATTCTCTCTCTCTCCGCGTCCAGTGTGGGCTTTTTCAGACAAGTGCATCTCC
121-TAACCAGGTCACATTTTCAGCCGCGACCCACTCTCCGCGAGTACCAGGAGCAGACCCGCGGAGGAGTGTAGGACAGCCCGTCTCCAGCAGCGGGTGGGAGGAAGGACATTA
241-AAATATGAGAAAGTCAAGACCCCCCAGGTGCAACCCAGACACAGTGCAGCCCGCGGCTGCGGGCGGCTGGTGTGCGCGTCTGCTCTCCAGCAGCGGGTGGGAGGAAGGACATTA
M R A P G C G R L V L P L L L L A A A L A E G D
361-CGCCAAGGGGCTCAAGGAGGGCGAGACCCCGGCAATTTTCATGGAGGACGAGCAATGGCTGTCTCCATCTCGCAGTACAGCGGCAAGATCAAGCACTGGAACCGCTTCCGAGACGAAGT
A K G L K E G E T P G N F M E D E Q W L S S I S Q Y S G K I K H W N R F R D E V
481-GGAGGATGACTATATCAAGAGTGGGAGGACAATCAGCAAGGAGATGAAGCCCTGGATACCAAGGACCCCTGCCAAGAGTGAAGTGCAGCGCCCAAGGTGTGCATGTCCAGGG
E D D Y I K S W E D N Q Q G D E A L D T T K D P C Q K V K C S R H K V C I A Q Q G
601-CTACCAGCGGGCCATGTGCATCGCAAGAAGTGGAGCACAGGATCAAGCAGCGACCCGTGAACTCCATGGAAACAAAGACTCCATCTGCAAGCCCTGCCACATGGCCCTGCTTGC
Y Q R A M C I S R K K L E H R I K Q P T V K L H G N K D S I C K P C H M A Q L A
721-CTCTGTCTCGGGTCCAGATGGCCACACTTACAGCTCTGTGTGAAGTGGAGCAACAGGCGTGCCTGAGCAGCAAGCAGTGGCGGTGCGATGGAGGGCCCTGCCCTGCCACCGGA
S V C G S D G H T Y S S V C K L E Q Q A C L S S K Q L A V R C E G P C P C P T E
841-GCAGGCTGCCACCTCCACCCCGATGGCAACAGAGACTTGCACCCGTCAGGACCTGGCTGGGAGATCGGCTGGGGACTGGTTCAGTCTCTCATGAGAAGTCCAAGCAGAA
Q A A T C S T A D G K P E T C T G Q D L A D L G D R L R D W F Q L H E N S K Q N
961-TGGCTCAGCCAGCTGTAGCCGCGCCAGCGGCTGGACAAGAGCTGGGCGCAGTCCATGGTGGATGTTCCAAAGTGGACACCAAGTGTGACTTCTCTCT
G S A S S V A G P A S G L D K S L G G A S C K D S I G W M F S K L D T S A D L F L
1081-GGACCAGCGGAGTGGCCGCTCAACCTGGACAAGTACGAGGTGTGCATCCGTCCTCTTCAACTCTCTGTGACACCTACAAGGATGGCCGGTCTCTACTGTGATGGTGTCTCTG
D Q T E L A A I N L D K Y E V C I R P F F N S C D T Y K D G R V S T A E W C F C
1201-CTTCTGGAGGGAAGCCCTGCTGGCAGAGCTGGAGCGCATCCAGATCCAGGAGCCGCCAAGAAGAAGCAGGATCTTCTCCGAGCTGGCAGGAGATGGCTACTACCGGAA
F W R E K P P C L A E L E R I Q I Q E A A K K K P G I F I P S C D E D G Y Y R K
1321-GATCAGTGTGACAGGACCGGTGACTGTGTGTGGACAGCTGGGCTGGAGCTGACTGACCGCCACGCATGGGAGCCCGACTGCGATGACATCTGGGCTTCTCGGGGGA
M Q C D Q C W C V D Q L G L E L T G T R T H G S P D C D D I V G F S G D
1441-CTTGAAGCGGTGTGCGCTGGGAGGATGAGGAGGAGAAGGAGACGAGGAGCAGCGGAGGAGGCCGAGGAGGAGGGCGAGGCGGAGGCTGACACGGGGCTACATCTGTA
F G S G V G W E D E E E K E T E E A G E E A E E E E G E A G E A D D G G Y I W *
1561-GACCCCTCAGGAGCGGCTCGCGGGGGACTCAACAGCAGAGCTCTGAGCAGCAGGCAACTTCAGAGAACGGATCCAGAAATGCAGTCAAGAGGACCCTGCTCCACCTGGGGGAG
1681-TGGAGTGTGATGTGCATGGCATGTGTGGCACAGATGGCTGGGAGCGGTGACAGTGTGAGTGCATGTGTGCATGCATGTGTGTGTGTGTGTGGCATCGCTGACAAATG
1801-TGTCCTTGATCCCACTGCTCTCGGAGAGTGAAGTACCCAAAGGCCCTTCGGCCCTCTGTAGCTGTTT-1871
    
```

Abbildung 2.37 **Humane cDNA und Aminosäuresequenz von Testican-2.** Das vorhergesagte Signalpeptid ist unterstrichen. Die cDNA Sequenz ist unter der Zugangsnummer AJ001453 bei EMBL/GenBank/DBJ zu erhalten.

```

1-TTTATTTTCAGGTCGCCGGCTCGAGACGGCGCGGTGCAGCAGCTCCAGAAAGCAGCGAGTTGGCAGAGCAGGGCTGCATTTCCAGCAGGAGTGCAGACAGTGTGGCTCACAAACA
121-GATGCTCAAGGTGTCAGCCGTAAGTGTGTGTGTCAGCCGCTTGGTGCAGTCACTCTTCGACAGTGGCGCGGCGGTGGCTGAGCCGCGGGTGGGAGGAGGAGGATTAATTTCTG
M L K V S A V L C V C A A A W C S Q S L A A A A A V A A A G G R S D G G N F L D
241-TGATAAACAATGGCTCACCACAATCTCTCAGTATGACAAGGAAGTCGGACAGTGGAAACAAATTCGAGACGAAGTAGAGGATGATTATTTCCGCACTTGGAGTCCAGGAAAACCCCTCGA
D K Q W L T T I S Q Y D K E V G Q W N K F R D E V E D D Y F R T W S P G K P F D
361-TCAGGCTTTAGATCCAGCTAAGGATCCATGCTTAAAGATGAAATGATGTCGCCATAAAGTATGCATTGCTCAAGATTCTCAGACTGCAGTCTGCAATAGTCAACCCGAGGCTTACACACAG
Q A L D P A K D P C L K M K C S R H K V C I A Q D S Q T A V C I S H R R L T H R
481-GATGAAAGAACAGGAGTACAGCATTAGGAGGAGTGGAGGGTCCCATATTTATCCACCTGCAAGCAGTGGCCAGTGGTCTATCCAGCCCTGTTTGGTTCAGATGGTCACTACTCTTT
M K E A G V D H R Q W R G P I L S T C K Q C P V V Y P S P V C D G H T Y S F
601-TCAGTGCAACTAGAAATATCAGGCATGTGCTTAGGAAAACAGATCTCAGTCAAATGTGAAGACATTTGCCATGTCTTCCAGTAAAGCCACAGTACAAGCAGAAATTTAAGAGAGC
Q C K L E Y Q A C V L G K Q I S V K C E G H C P C P S D K P T S T S R N V K R A
721-ATGCGAGTACCTGGAGTTCAGGGAAGTGGCAACAGATTGCGGGACTGGTTCAGGGCCCTTCAATGAAAGTGGAAAGTCAAAAACAAGAAACAAAACATTTGCTGGGCTGAGAGAAAGCAG
C S D L E F R E V A N R L R D W F K A L H E S G S Q N K K T K T L L R P E R S R
841-ATTCGATACCAGCATCTTCCCAATTTGCAAGGACTCACTTGGCTGGATGTTTAAACAGACTTGATACAAACTATGACCTGCTATTGGACCGTCAAGGATCAAGGATTAACCTTGATAA
F D T S I L P I C K D S L G W M F N R L D T N Y D L L L D Q S E L R S I Y L D K
961-GAATGAACAGTGTACCAAGCATTCTTCAATTTGTGACACATACAAGGACAGTTAATATCTAATAATGAGTGGTGTCTACTGCTTCCAGACAGCAAGACCCACTTCCAGAGCTGA
N E Q C T K A F F N S C D T Y K D S L I S N N E W C Y C F Q R Q Q D P P C Q T E
1081-GCTCAGCATATTCAGAAAGGCGGTAAGGAGTCCCTGAGCAGTATATCCCCCTGTGTGATGAAGATGTTACTACATGCCAACACAGTGTATGGCAGTGTGGCAGTGTGGCAGTGTG
L S N I Q K R Q G V K K L L G Q Y I P L C D E D G Y Y M P T Q C H G S V G Q C W
1201-GTGTGTGACAGATATGAAATGAAGTCAATGGGATCCAGAAATAATGGTGTGCGAGTGTGCTATAGATTTTGGAGATCTCCGGAGATTTTGTAGTGGCGATTTTCAATGAATGGACTGA
C V D R Y G N E V M G S R I N G V A D C A I D F E I S G D F A S G D F H E W T D
1321-TGATGAGGATGATGAAGCAGATATTAATGAATGATGAAGATGAATTAAGATGATGAAGATGAAGGGATGATGATGATGGTGGTGTGATGACCATGATGATACATTTGATTGATGAC
D E D D E D D I M N D E D E I E D D E D E G D D D D G D D H D V Y I *
1441-AGTTGAAATCAATAAATTTCTAATTTTCAAAAATGATAGCCTATTTAAAATTTATCTTCCCAATAACAAAATGATCTAAAACCTCACATATATTTGTATAATTTATTT
1561-GAAAATTTGACCTTAAAGTTATAGAATCTTATGTTTAAATAAAGATCATTTGCTTTGAGTTTTTATATTTCCCTTACACAAAAGAAAATACATATGAGTCTAGTCAAGCAAAAATGAGTT
1681-TTGAAGTGTACTATAAATTTTTCAGGAGAACAACTTTGTAATCTTCCATAAGCAAAATGACAGTGTGCTGGGATCGTACATGTTAATTTTGTGAAGATTAATTTCAAGTGA
1801-AATTTAAAATAAATAAATTTTAAATGACCTGGGCTTAAAGATTTAGGAAAATATGCATGCTTTAATTTGCATTTCCAAAGTAGCATCTTGTAGACCTAGATGAGTCAAGGATAACAGAG
1921-AGATACCACATGGCAAGAAAACAAAGTGCATTTGAGAGTCCCAATTTGTTTACATTAATAGTGGTGTTTTACCTAAGAAAATTTCTGGATCTAAYAGGACATTTTACAAAATG
2041-GCAAGTATGAAAACCATGATTTCTGAAAGTTAAAATTTAGTGTCTCCCAATGTGATTTTAAATTTGGATGGCAGTCTCAAGCAGATTTTAAAAGATTTCTTAAATACATGAT
2161-TGTTTGCC-2168
    
```

Abbildung 2.38 **Humane cDNA und Aminosäuresequenz von Testican-3.** Das vorhergesagte Signalpeptid ist unterstrichen. Der rot hervorgehobene Sequenzabschnitt stellt ein mögliches Polyadenylierungs-Signal dar. Die cDNA Sequenz ist unter der Zugangsnummer AJ001454 bei EMBL/GenBank/DBJ zu erhalten.

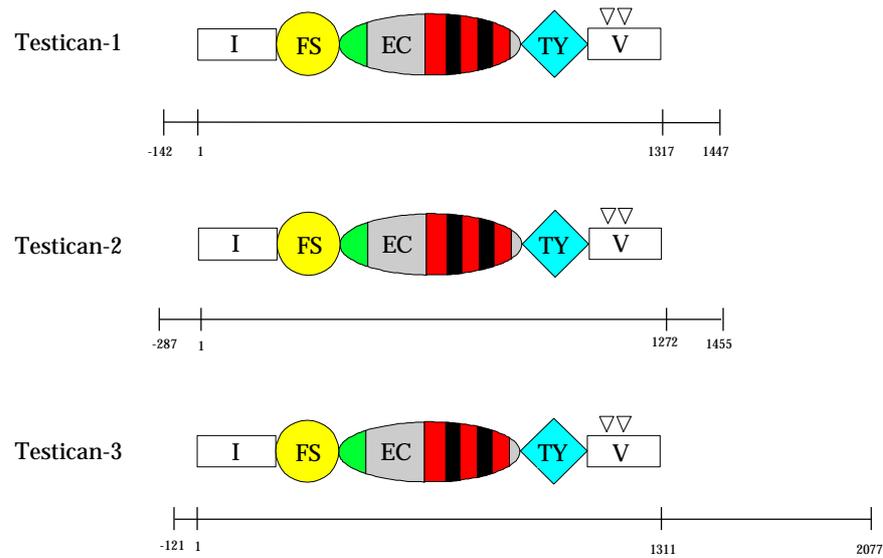


Abbildung 2.39 **Schematischer Domänenbau von humanem Testican-1, Testican-2 und Testican-3.** Zur besseren Übersicht wurden die cDNA-Klone mit abgebildet. I,V: Domänen ohne Homologie in der Datenbank, FS: Follistatin-ähnliche Domäne, EC: Extrazelluläre Calcium-bindende Domäne, TY: Thyroglobulin-Domäne. Die schwarzen Balken innerhalb der EC-Domäne bezeichnen die EF-Hände. Die Dreiecke zeigen die Glycosaminoglycan-Anheftungsstellen an.

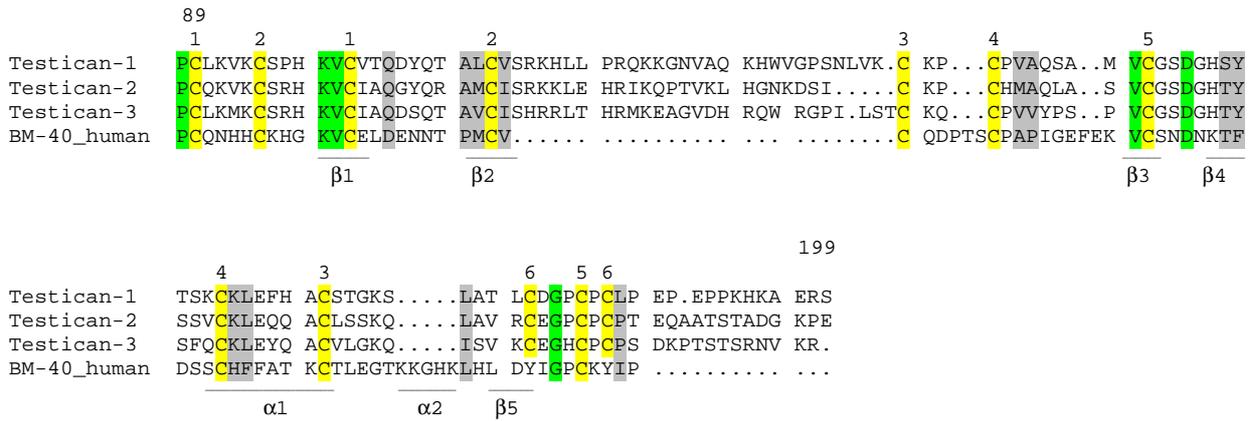
Alle drei Proteine zeigen den gleichen modulären Aufbau (Abbildung 2.39). Eine Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen aller Testicane zeigt, daß einige Abschnitte in allen drei Proteinen absolut identisch sind. Dies gilt vor allem für die Position der Cystein-Reste (Abbildung 2.40). Ein genauerer Vergleich der Aminosäuren der humanen Testicane untereinander ergibt die in Tabelle 2.4 abgebildeten Prozentzahlen. Eine N-terminale Domäne (Domäne I), die auf die Konsensussequenz eines potentiellen Signalpeptids (Nielsen et al., 1997) folgt, ist reich an sauren Aminosäuren, zeigt jedoch keine Homologie zu weiteren Proteinen in der Datenbank.

	Testican-1	Testican-2
Testican-3	52%	45%
Testican-2	43%	100%

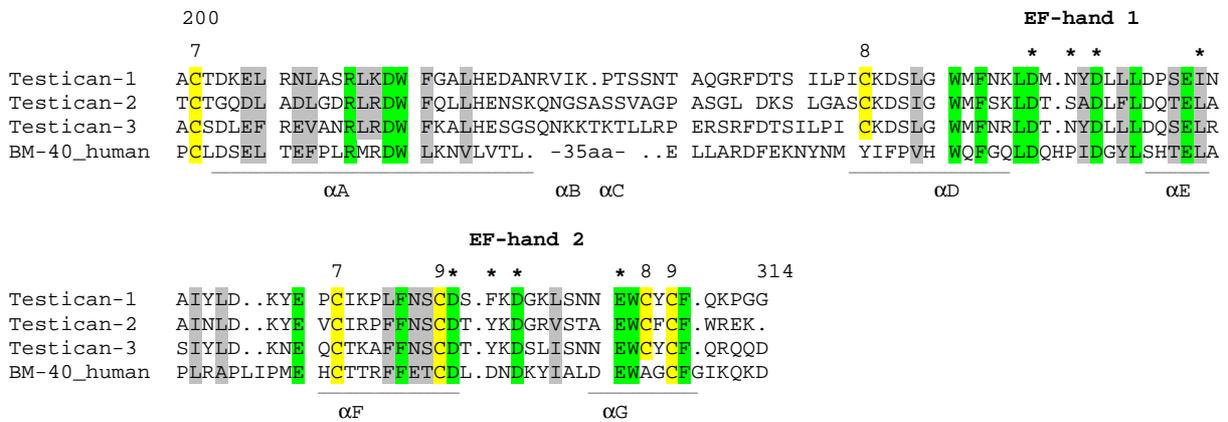
Tabelle 2.4 **Homologie der Testicane.** Die Daten zeigen die prozentuale Homologie der Testicane, errechnet über die gesamte Länge der Proteine.



FS domain



EC domain



TY domain

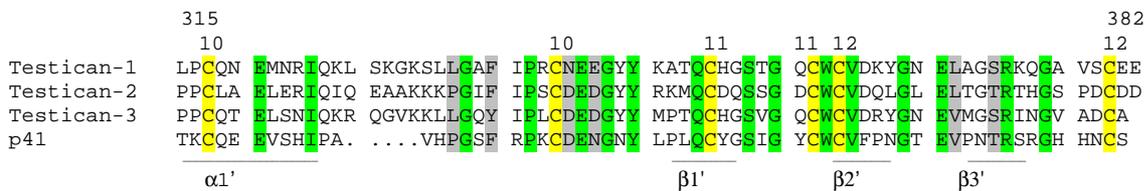


Abbildung 2.41 **Sequenzvergleich einzelner Domänen der Testicane mit repräsentativen Konsensus-Sequenzen.** Die FS- und die EC-Domäne der Testicane wurde mit den entsprechenden Domänen des BM-40 verglichen. Als Referenz für die TY-Domäne wurde die des p41-Fragmentes gewählt. Sekundärstrukturelemente wurden den Kristallstrukturen von BM-40 und p41 entnommen (Hohenester et al., 1997; Guncar et al., 1999) und als α-helicale Struktur oder β-Faltblatt markiert. Nummernpaare oberhalb der Cystein-Reste beziehen sich auf die Bildung von Disulfidbrücken. Calcium-koordinierende Aminosäuren innerhalb der EF-Hände wurden mit einem Stern markiert.

Abbildung 2.41 zeigt einen direkten Sequenzvergleich der FS- und der EC-Domänen der Testicane mit denen des BM-40. Beide Domänen weisen in den Testicanen je zwei zusätzliche Cystein-Reste auf. Die TY-Domäne enthält, dem Konsensus entsprechend, sechs Cystein-Reste an konservierten Positionen.

### 2.13 Gewebeverteilung der Testican mRNA

Zur Analyse der mRNA-Verteilung der Testicane wurden aus frisch entnommenen Mausorganen zuerst Gesamt-RNA isoliert und aus dieser mRNA angereichert. Gleiche Aliquots wurden auf einem denaturierenden Agarose-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nylon-Membran übertragen. Spezifische Sonden gegen Testican-1 bis Testican-3 wurden generiert und mit der Membran hybridisiert. Abbildung 2.42 zeigt die entsprechenden Autoradiogramme des Northern-Blot. Die Bezeichnung Gehirn steht hier für das präparierte Gesamtgehirn ohne Kleinhirn. Man erkennt deutliche Signale für Testican-2 in Kleinhirn, Gehirn, Lunge und Hoden. Für Testican-1 und Testican-3 findet man dagegen ausschließlich Signale in Hirngewebe.

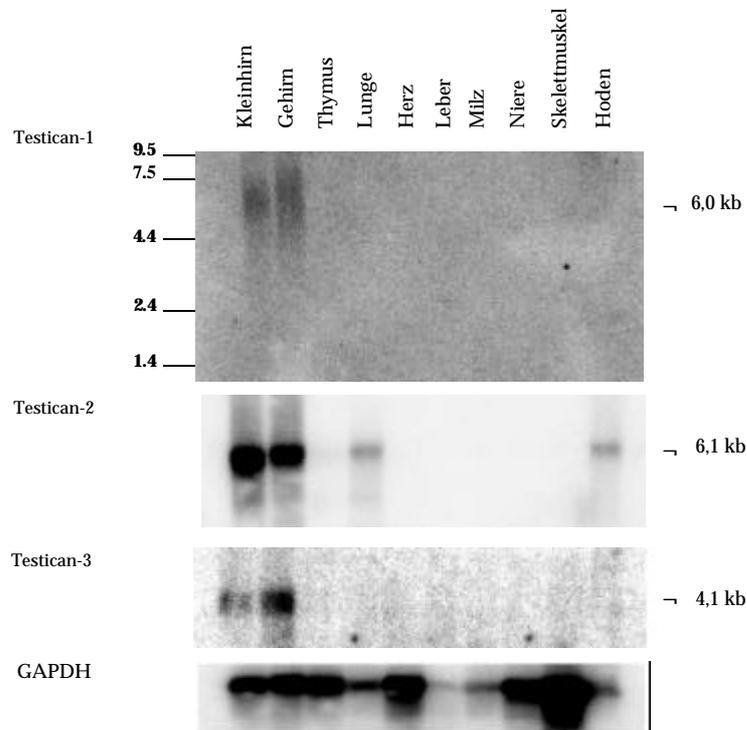


Abbildung 2.42 **Northern Blot mit Sonden gegen Testican1-3 und GAPDH.** mRNA Aliquots von jeweils 3  $\mu\text{g}$  wurden auf einem 1,2% Agarose Gel unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Hybridisierung erfolgte mit spezifischen Sonden gegen Testican-1, -2 und -3. Zwischen den einzelnen Hybridisierungen wurde der Blot von den radioaktiven Sonden befreit und überprüft. Die Hybridisierung des mRNA Blot mit spezifischen Sonden zeigt für Testican-1 Signale in Kleinhirn und Gehirn, für Testican-2 in Kleinhirn bzw. Gehirn und schwächere Signale in Lunge und Hoden und für Testican-3 Signale in Kleinhirn und Gehirn, analog zu Testican-1. Die Hybridisierung mit der GAPDH Sonde erfolgte zur Überprüfung der Beladung.

### 2.14 In situ Hybridisierung mit Testican-2

Zur Untersuchung der mRNA-Verteilung im Gehirn adulter Mäuse wurden sagittale Gewebeschnitte angefertigt, mit spezifischen, DIG-markierten RNA-Sense- und Antisense-Sonden hybridisiert und gefärbt (Abbildung 2.43). Im Bereich des Großhirns erkennt man eine deutliche Färbung im Bereich des Cortex und des Hippocampus. In beiden Fällen scheint es sich um eine neuronale Lokalisation von Testican-2 zu handeln. Im Cerebellum findet man eine starke Färbung in den Purkinje-Zellen, welche die Molekularschicht und die Körnerschicht voneinander trennen. Vereinzelt findet man eine schwächere Färbung innerhalb der Molekularschicht in Korbzellen und Sternzellen. Die Hybridisierung mit den Sense-Sonden zeigt erwartungsgemäß keine Färbung. Somit findet sich Testican-2 verteilt über das Gehirn in vielen verschiedenen neuronalen Zellen.

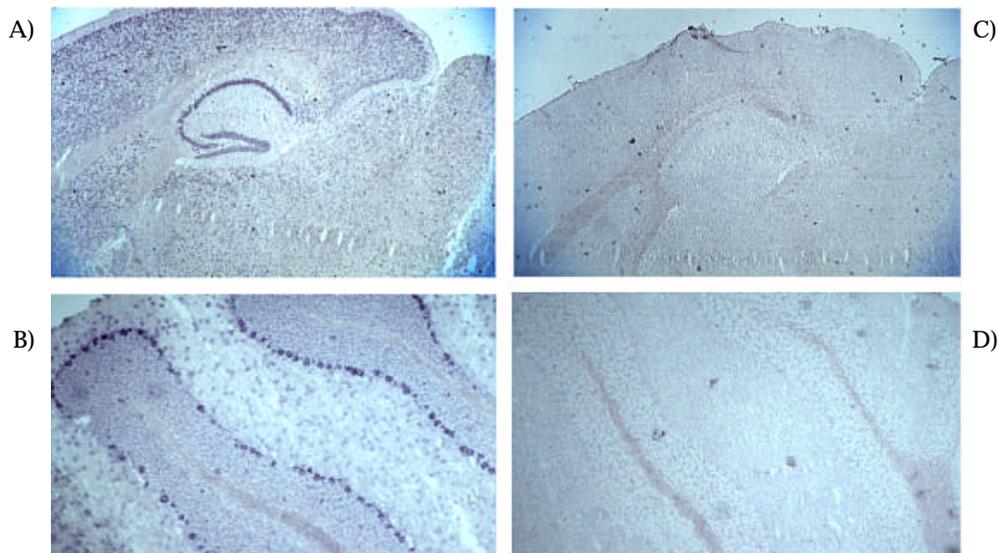


Abbildung 2.43 **Testican-2 in situ Hybridisierung.** Kryostat-Schnitte vom Gehirn adulter Mäuse wurden mit DIG-markierten Antisense- (A,B) bzw Sense-RNA-Sonden (C,D) von humanem Testican-2 hybridisiert. Man erkennt eindeutige Färbungen im Bereich des Cortex und Hippocampus (A) bzw. in den Korb-, Stern- und Purkinjezellen des Cerebellums (B). Die mit den entsprechenden Sense-Sonden hybridisierten Schnitte (C, D) zeigen erwartungsgemäß keine Färbung.

## 2.15 Rekombinante Expression von Testican-2

Um eine weitere biochemische Charakterisierung von Testican-2 durchführen zu können, wurde aus der cDNA-Sequenz ein Konstrukt amplifiziert, welches für das Protein in vollständiger Länge codierte. Mit der PCR wurden Restriktionsschnittstellen eingeführt (NheI/NotI), um das Konstrukt in den Expressionsvektor pCEP-Pu einzuklonieren. Der fertige Expressionsvektor wurde in EBNA-293 Zellen transfiziert und die Zellen wurden selektiert. Es konnte jedoch kein Protein mit dem erwarteten Molekulargewicht detektiert werden, was mit einer möglicherweise geringen Überexpression zu erklären wäre. Da die Effizienz der Expression oftmals von der Art des Konstruktes abhängt, wurde anstelle des gesamten Proteins ein um die erste Domäne verkürztes Testican-2-Konstrukt (FS-END) amplifiziert. Dieses wurde in den Expressionsvektor pCEP-Pu inkloniert. Transfektion und Selektion erfolgte wie für SMOC beschrieben. Die Reinigung des Proteins erfolgte über eine DEAE-Säule, von welcher es mit einem linearen Salzgradienten bei einer Salzkonzentration zwischen 0,35 M und 0,5 M eluiert werden konnte. Zur weiteren Reinigung folgte eine ResourceQ-Säule. Neben der Proteoglycan-Form, die im SDS-PAGE als breite Bande zwischen 80-200 kDa auftritt (Abbildung 2.44), konnte eine weitere Fraktion gereinigt werden, die eine Bande bei etwa 65 kDa liefert (nicht abgebildet). Der Effekt des Auftretens von zwei Banden wurde bereits bei der Expression von murinem Testican-2 festgestellt (Frau Dr. Hartmann, persönliche Mitteilung). In diesem Fall konnte gezeigt werden, daß die Bande bei geringerem Molekulargewicht durch Chondroitinase-ABC Behandlung der breiten Bande des Proteins erhalten werden konnte. Es handelt sich deshalb wahrscheinlich um die Form des Proteins, die keine Glycosaminoglycan-Seitenketten enthält. Die Ausbeute an Protein in der Proteoglycan-Form lag bei etwa 10 mg/l, so das insgesamt 42 mg des Proteins erhalten wurden.

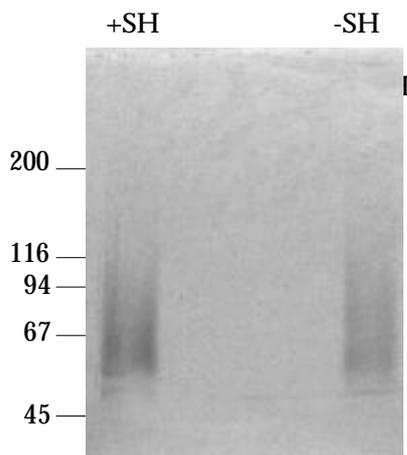


Abbildung 2.44 **Gereinigtes rekombinantes Testican 2-FSEND.** Jeweils 2  $\mu$ g Testican-2 FSEND wurde unter reduzierenden (+SH) und nicht-reduzierenden (-SH) Bedingungen auf einem 4-15 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit Silber gefärbt.

## 2.16 Rekombinante Expression von Testican-3

Auch für Testican-3 wurde ein Teil der cDNA amplifiziert, um das Protein in vollständiger Länge zu exprimieren. Dieses Konstrukt wurde direkt in den Expressionsvektor His-Myc-FaktorX-pCEP-Pu inkloniert. Transfektion, Selektion und die Reinigung über eine Ni-Säule erfolgten wie bei SMOC beschrieben. Die Fraktionen welche um 60 mM Imidazol eluieren, wurden vereinigt. Zur weiteren Reinigung wurden sie gegen 50 mM Tris-HCl, pH 8,6 dialysiert und auf eine DEAE-Matrix geladen. Die Elution erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0-1 M NaCl. Der letzte Reinigungsschritt erfolgte nach Dialyse gegen 50 mM Tris-HCl, pH 8,6 auf einer FPLC-Säule (ResourceQ). Auch hier erfolgte die Elution durch einen linearen Salzgradienten (0-1 M NaCl). Die Reinigung lieferte zwei unterschiedliche Formen von Testican-3. Bei der einen handelt es sich wahrscheinlich um die Proteoglycan-Form von Testican-3. Die Silberfärbung des SDS-PAGE zeigt eine breite Bande zwischen etwa 100 kDa bis 200 kDa. Bei der Bande um 67 kDa in der reduzierenden Spur handelt es sich wahrscheinlich um eine Keratin-Kontamination. Parallel wurde ein Immunoblot angefertigt (Abbildung 2.45).

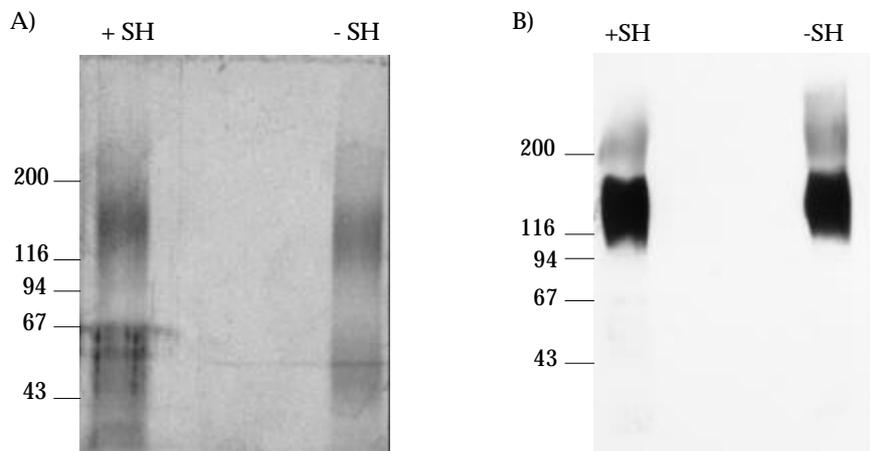


Abbildung 2.45 **Gereinigtes rekombinantes Testican 3** A) Jeweils 1 µg Testican 3 wurde unter reduzierenden (+SH) und nicht-reduzierenden (-SH) Bedingungen auf einem 4-15 % SDS-PAGE aufgetrennt und einer Silberfärbung unterzogen. B) Je 500 ng rekombinantes Testican-3 wurden unter reduzierenden (+SH) und nicht reduzierenden (-SH) Bedingungen auf einem 4-15 % SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Die Entwicklung des Immunoblots erfolgte mit einem anti-myc-Antikörper aus Kaninchen als Erstantikörper (1:3000) und einer anschließenden Inkubation mit einem anti-Kaninchen-HRP gekoppeltem Zweitantikörper (DAKO, 1:2000). Die Signale wurden mit ECL sichtbar gemacht.

Auf einem Immunoblot zeigt diese Form von Testican-3 eine typische breite Bande zwischen 100 kDa bis über 200 kDa, wie es von vielen Proteoglycanen bekannt ist (Abbildung 2.45). Desweiteren wurde ein MALDI-TOF-Massenspektrum von der Proteoglycan-Form von

Testican-3 aufgenommen (Abbildung 2.46). Man erkennt ein breites Signal um 76 kDa. Die große Halbwertsbreite spricht für eine Heterogenität, die wahrscheinlich auf die Glycosaminoglycan-Seitenketten zurückzuführen sind.

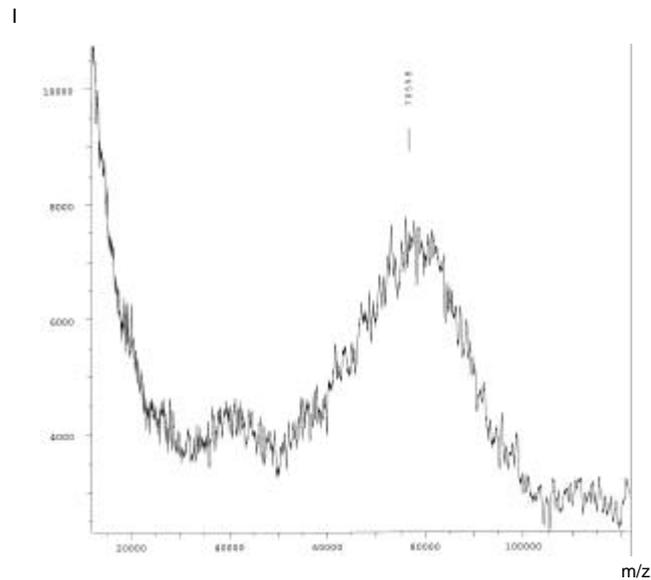


Abbildung 2.46 **MALDI-MS mit Testican-3**. Die Abbildung zeigt ein MALDI-Massenspektrogramm aufgenommen mit der Proteoglycan-Form von Testican-3. Man erkennt ein breites Signal zwischen 60 kDa und 100 kDa.

Das aus der SDS-PAGE bestimmte, apparente Molekulargewicht ist im Vergleich zu dem massenspektroskopisch bestimmten Molekulargewicht größer. Daraus läßt sich schließen, daß Testican-3 ein ungewöhnliches Laufverhalten zeigt, was seinen Proteoglycancharakter unterstreicht. Die andere Form des Proteins liefert eine Bande bei etwa 65 kDa und stellt wahrscheinlich die Glycosaminoglycan-freie Form von Testican-3 dar (Abbildung 2.47).

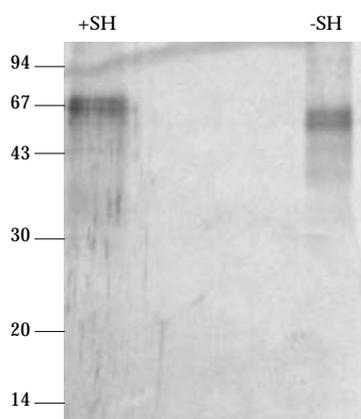


Abbildung 2.47 **Rekombinantes Testican-3 ohne GAG-Seitenketten**. Jeweils 2 µg Testican-3 aus dem Pool ohne GAG-Seitenketten wurde unter reduzierenden (+SH) und nicht-reduzierenden (-SH) Bedingungen auf einem 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit Silber gefärbt.

## 2.18 CD-Spektroskopie an rekombinantem Testican-2 und Testican-3

Wie alle Mitglieder der BM-40 Familie besitzen auch die Testicane eine extrazelluläre calciumbindende (EC) Domäne. Zur Überprüfung ihrer Faltung und einer möglichen Calcium-Bindung wurden CD-Spektren in Anwesenheit und Abwesenheit von Calcium-Ionen aufgezeichnet. Für die Messungen wurde rekombinantes murines Testican-2 voller Länge und humanes Testican-3 voller Länge verwendet. Das murine Testican-2 wurde von Frau Dr. Hartmann freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Abbildung 2.48 zeigt die Spektren für Testican-2.

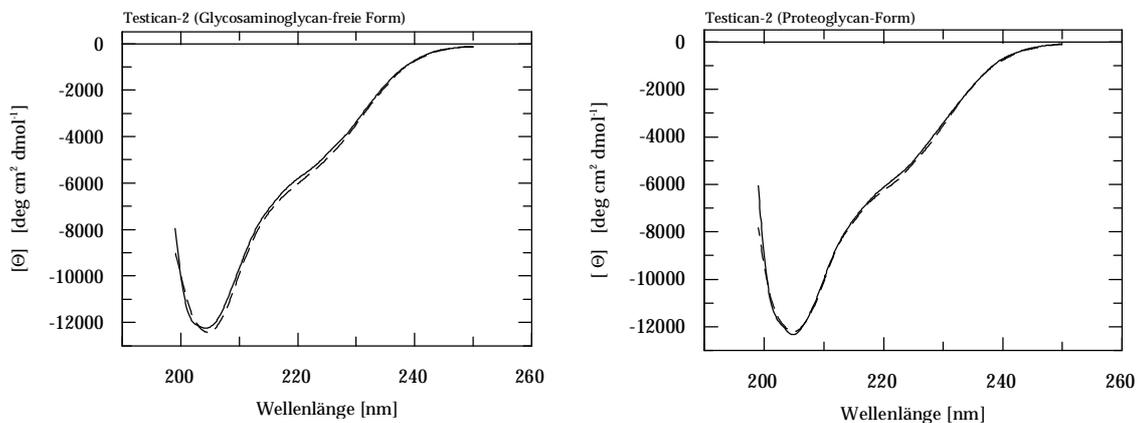


Abbildung 2.48 **CD-Spektren von Testican-2.** Die Proteoglycan Form von Testican-2 (147 µg/ml in TBS) und die Glycosaminoglycan-freie Form von Testican-2 (187 µg/ml in TBS) wurden in einer Quarzküvette mit der Schichtdicke von 1 mm über den angegebenen Wellenlängenbereich vermessen. Die durchgezogenen Linien zeigen die jeweiligen Spektren in Abwesenheit von Calcium, die gestrichelten Linien in Anwesenheit von 2 mM Calcium. Keine der untersuchten Formen von Testican-2 zeigt eine eindeutige calciumabhängige Konformationsänderung.

Beide Formen des Proteins zeigen typische Spektren für Proteine, die sekundäre Strukturelemente besitzen und somit in Lösung gefaltet vorliegen. Eine Calcium-abhängige Konformationsänderung konnte entgegen der Erwartung nicht beobachtet werden. Die Berechnung der Sekundärstrukturanteile mit den Programmen CONTIN und SELCON können der Tabelle 2.5 entnommen werden. Man erkennt, daß die Berechnung für die Glycosaminoglycan-freie Form von Testican-2 eine Änderung im  $\alpha$ -helikalen Anteil zeigt, die aus dem CD-Spektrum so nicht zu ersehen ist.

	Testican-2 (Glycosaminoglycan-freie Form)			Testican-2 (Proteoglycan Form)		
	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Faltblatt	Rest	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Faltblatt	Rest
CONTIN	18% (21%)	35% (19%)	48% (60%)	20% (21%)	32% (23%)	48% (56%)
SELCON	20% (22%)	18% (17%)	62% (63%)	22% (22%)	18% (16%)	61% (63%)

Tabelle 2.5 **Anteile einzelner Sekundärstrukturelemente an der Proteinstruktur von Testican-2 (Glycosaminoglycan-freie Form) und Testican-2 (Proteoglycan-Form)**. Die Daten wurden mit den Programmen CONTIN und SELCON aus den CD-Spektren der Proteine berechnet. Die Zahlen stehen für den Anteil des jeweiligen Sekundärstrukturelementes an der Gesamtstruktur des Proteins. Zahlen in Klammer stehen für die Sekundärstrukturanteile an der Calcium-beladenen Proteinform. Eine relative Änderung des  $\alpha$ -helicalen Anteils durch die Bindung von Calcium, die durch die Berechnungen für die Glycosaminoglycan-freie Form zu erwarten ist, kann aus den Spektren nicht ersehen werden.

Die CD-Spektren von Testican-3 zeigten jedoch ein anderes Bild (Abbildung 2.49). Beide CD-Spektren zeigen einen Verlauf, der auf intakte Sekundärstruktur in Lösung schließen läßt. Eine calciumabhängige Konformationsänderung konnte bei der Glycosaminoglycan-freien Form von Testican-3 beobachtet werden, wie an der Signaländerung bei 222 nm zu erkennen ist. Dies spricht für eine Calcium-induzierte Änderung des  $\alpha$ -Helix Anteils dieses Proteins in Lösung und deutet somit auf eine reversible Bindung von Calcium hin.

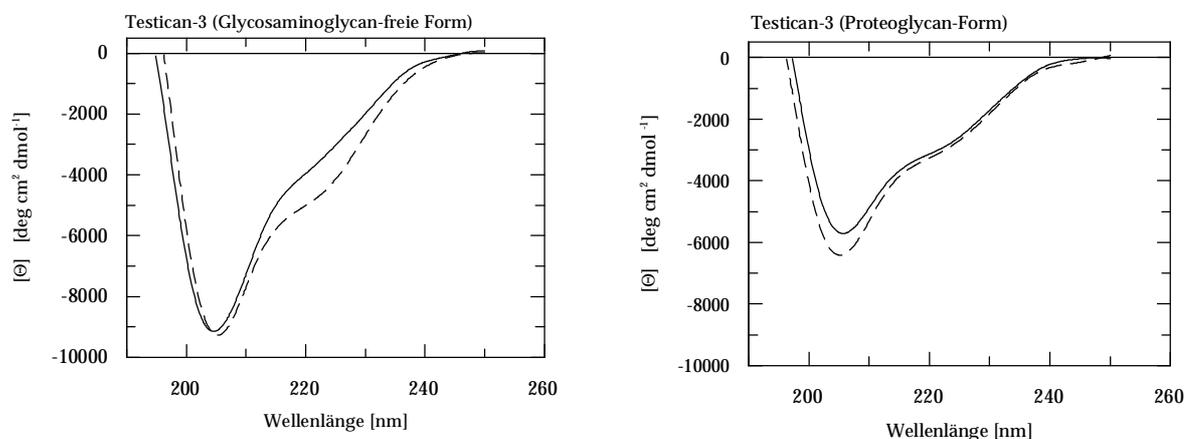


Abbildung 2.49 **CD-Spektrum von Testican-3**. Rekombinantes humanes Testican-3 (Proteoglycan-Form, 72  $\mu\text{g/ml}$  in 5 mM Tris-HCL, pH 7,4 und Glycosaminoglycan-freie Form, 69  $\mu\text{g/ml}$  in 5 mM Tris-HCL, pH 7,4) wurden in einer Quarzküvette mit 1 mm Schichtdicke im CD-Spektrometer vermessen. Die durchgezogene Linie zeigt das Spektrum in Abwesenheit von Calcium-Ionen, die gestrichelte Linie in Anwesenheit von 2 mM Calcium. Die Änderung der Signalintensität bei 222 nm deuten auf eine Calcium-abhängige Sekundärstrukturveränderung im  $\alpha$ -helicalen Bereich des Proteins hin.

	Testican-3 (Glycosaminoglycan-freie Form)			Testican-3 (Proteoglycan Form)		
	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Faltblatt	Rest	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Faltblatt	Rest
CONTIN	18% (20%)	42% (41%)	41% (38%)	6% (7%)	52% (49%)	43% (44%)
SELCON	12% (13%)	30% (30%)	55% (56%)	k.N. (8%)	k.N. (40%)	k.N. (56%)

Tabelle 2.6 **Anteile einzelner Sekundärstrukturelemente an der Proteinstruktur von Testican-3 (Glycosaminoglycan-freie Form) und Testican-3 (Proteoglycan-Form)**. Die Daten wurden mit den Programmen CONTIN und SELCON aus den CD-Spektren der Proteine berechnet. Die Zahlen stehen für den Anteil des jeweiligen Sekundärstrukturelementes an der Gesamtstruktur des Proteins. Zahlen in Klammer stehen für die Sekundärstrukturanteile an der Calcium-beladenen Proteinform. Für Testican-3 (Proteoglycan Form) konnte das Programm SELCON keine Näherung unter Calcium-haltigen Bedingungen errechnen. k.N.: keine Näherung.

Zur Untersuchung der Calcium-bindenden Eigenschaften von Testican-1 wurde die rekombinant exprimierte EC-Domäne von humanem Testican-1 verwendet, die freundlicherweise von Herrn Dr. Kohfeldt (MPI-Martinsried) zur Verfügung gestellt wurde. Diese Domäne zeigt ein Spektrum mit einem Minimum bei 207 nm, welches eine ausgeprägte Random-coil Struktur anzeigt. Eine Schulter bei 222 nm im Calcium-freien Zustand verändert sich zu einem charakteristischen Minimum nach Zugabe von 2 mM Calcium. Dies zeigt eine starke Veränderung im  $\alpha$ -helicalen Bereich des Proteins an (Abbildung 2.50).

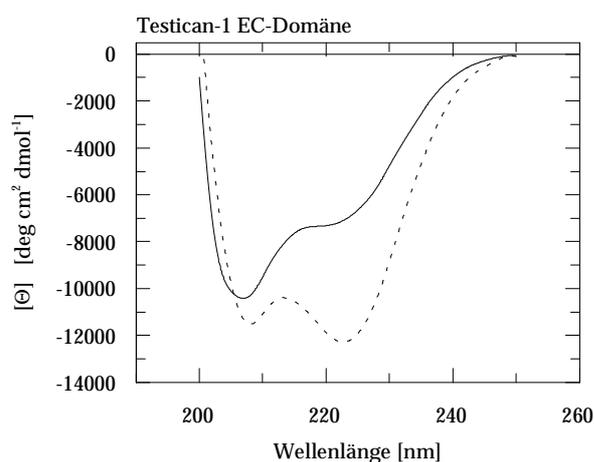


Abbildung 2.50 **CD-Spektrum von Testican-1 EC-Domäne**. Rekombinantes humanes Testican-1 (EC-Domäne, 180  $\mu$ g/ml in 5 mM Tris-HCL, pH 7,4) wurde in einer Quarzküvette mit 1 mm Schichtdicke im CD-Spektrometer vermessen. Die durchgezogene Linie zeigt das Spektrum in Abwesenheit von Calcium-Ionen, die gestrichelte Linie in Anwesenheit von 2 mM Calcium. Die Änderung der Signalintensität bei 222 nm deuten auf eine calcium-abhängige Sekundärstrukturveränderung im  $\alpha$ -helicalen Bereich des Proteins hin, der unter Calcium-haltigen Bedingungen 32% der Sekundärstruktur ausmacht.

Die CD-Messung für Testican-2 und Testican-3 wurde jeweils mit dem Protein vollständiger Länge durchgeführt, während für Testican-1 nur die EC-Domäne vermessen wurde. Aus diesem Grund wird eine ausführliche Berechnung aller Sekundärstrukturelemente hier nicht gezeigt, da die Werte mit den anderen Proteinen nicht zu vergleichen wären.

### III Diskussion

#### 3.1 SMOC-1, SMOC-2, Testican-2 und Testican-3 - Neue Mitglieder der BM-40 Familie

Eine Homologiesuche mit der Sequenz von BM-40/SPARC/Osteonectin in EST-Datenbanken lieferte eine Reihe von EST-Klonen als Grundlage für dieses Projekt. Nach dem Durchmustern von cDNA-Bibliotheken konnten mit SMOC-1, SMOC-2, Testican-2 und Testican-3 vier neue Mitglieder der BM-40 Familie isoliert werden. Zu dieser Familie zählten bislang die fünf Proteine BM-40, SC1, QR1, Tsc36 und Testican-1 (Abbildung 3.1, oberer Teil).

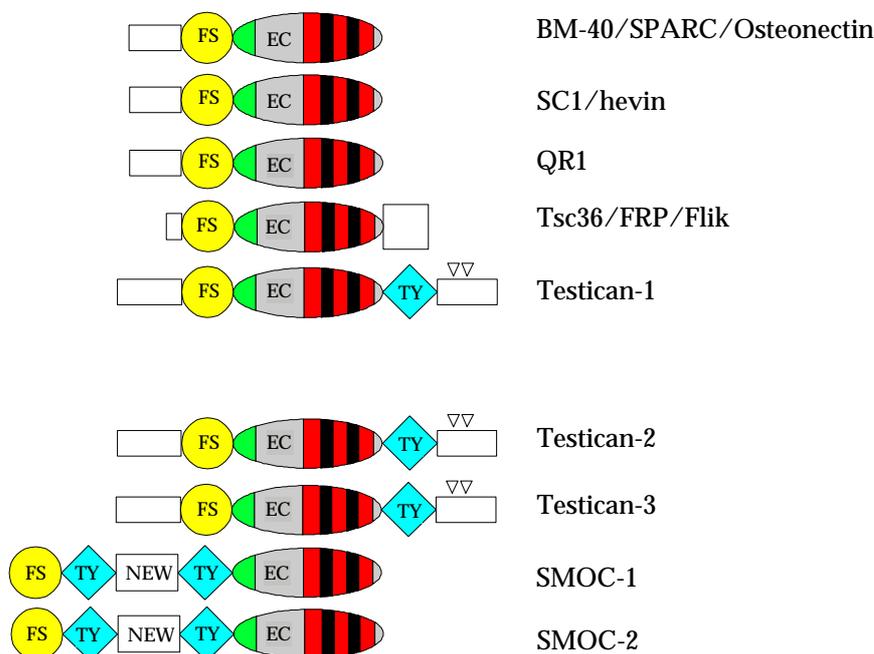


Abbildung 3.1 **Aktueller Überblick über die Mitglieder der BM-40 Familie.** Zu den bekannten fünf Mitgliedern sind weitere vier hinzugekommen. Testican-2 und Testican-3 sind Homologe zu einem schon bekannten Familienmitglied, während es sich bei SMOC-1 und SMOC-2 um zwei neue Mitglieder mit bislang unbekannter Domänenorganisation handelt. FS: Follistatin-ähnliche Domäne, EC: Extrazelluläre, calcium-bindende Domäne, TY: Thyroglobulin-ähnliche Domäne, New: SMOC-spezifische Domäne, Dreiecke bezeichnen die Anheftungsstellen für Glycosaminoglycan-Seitenketten.

Alle Mitglieder der BM-40 Familie besitzen einen modularen Aufbau. Mit dem Begriff modularer Aufbau bezeichnet man die Zusammensetzung eines Proteins aus verschiedenen Domänen. Eine Domäne versteht man in diesem Zusammenhang als eine eigenständige Faltungseinheit des Proteins. Zwei Domänen, die FS- und die EC-Domäne, sind in allen Proteinen der Familie enthalten und folgen dort, außer bei SMOC-1 und SMOC-2, stets aufeinander. Die TY-Domäne war innerhalb der Familie bislang nur aus Testican bekannt. Desweiteren findet man Domänen, die für einzelne Familienmitglieder spezifisch sind und keine Homologie zu Proteinen in der Datenbank zeigen.

Alle vier neuen Proteine besitzen, wie alle anderen Mitglieder der BM-40 Familie auch, einen N-terminalen Teil, für dessen Aminosäuren die Kriterien eines Signalpeptids zutreffen und der mit der Erkennungssequenz für eine Signalpeptidase endet (Nielsen et al., 1997). Dies deutet darauf hin, daß auch Testican-2, Testican-3, SMOC-1 und -2 sekretiert werden.

Sekretiertes SMOC-1 und SMOC-2 besteht aus fünf Domänen. Einer kurzen N-terminalen Region im Anschluß an das Signalpeptid folgt eine FS-Domäne und eine TY-Domäne, an die sich eine SMOC-spezifische Domäne anschließt. Eine weitere TY-Domäne bildet mit der C-terminalen EC-Domäne den Abschluß des Proteins. Damit werden beide Proteine aus Domänen aufgebaut, die bereits von den Mitgliedern der BM-40 Familie bekannt waren. Das Besondere an SMOC-1 und SMOC-2 liegt in der Abfolge dieser Domänen. Galt bislang neben dem Vorkommen einer EC-Domäne eine vorgeschaltete FS-Domäne als Kriterium für die Zugehörigkeit zur BM-40 Familie, so muß das zweite Kriterium für SMOC-1 und SMOC-2 gelockert werden. Eine endgültige Nomenklatur bzw. Einteilung wird sicherlich erst dann erfolgen, wenn z.B. im Rahmen der Analyse des humanen Genomprojektes alle möglichen EC-Domänenproteine identifiziert sind. Der modulare Aufbau von SMOC-1 und -2 bestätigt sich auch in deren genomischer Struktur, die für humanes SMOC-1 und -2 *in-silico* aufgeklärt werden konnte. Das humane SMOC-1-Gen besitzt eine Größe von mindestens 80 kbp, das SMOC-2-Gen ist mindestens 141 kbp groß. An allen Domänengrenzen befinden sich in der genomischen Sequenz Introns. Nicht alle Domänen werden von nur einem Exon codiert, so daß diese durch weitere Introns getrennt werden. Dies ist auch vom BM-40 bekannt, wo z.B. die EC-Domäne von vier Exons codiert wird (McVey et al., 1988; Villareal, X. C. et al., 1989). Zusätzlich haben alle Introns, die die Exons der Domänen flankieren, die gleiche Phase I-I. Die Übereinstimmung zwischen Exongrenzen, Domänengrenzen und kompatiblen Phasen ist eine wichtige Voraussetzung für eine mögliche Evolution der Proteine durch die Duplikation von Exons oder eine Veränderung durch Insertion bzw. Deletion von Domänen (Exon-shuffling). Beim Vergleich der genomischen Struktur von SMOC-1 und -2 stellt man fest, daß gleiche Domänen, mit Ausnahme der EC-Domäne, durch die gleiche Anzahl an Exons codiert werden (Tabelle 3.1). Auch finden sich die Introns an den gleichen Positionen. Dies deutet auf einen gemeinsamen Vorläufer von SMOC-1 und -2 hin, in dem die Intronpositionen schon an vergleichbaren Positionen vorhanden waren. Die Länge der Introns wurde wahrscheinlich erst nach der Duplikation variiert (Abbildung 2.7 und 2.8).

Domäne	Anzahl der kodierenden Exons (SMOC-1)	Anzahl der kodierenden Exons (SMOC-2)
I	1	1
FS	1	1
TY <sub>I</sub>	2	2
NEW	3	3
TY <sub>II</sub>	2	2
EC	3	4

Tabelle 3.1 **Anzahl codierender Exons.** Die Tabelle zeigt, wieviele Exons für einzelne Domänen in SMOC-1 und SMOC-2 kodieren.

Neben Testican-2 und Testican-3 konnte aufgrund der nicht-stringenten Hybridisierungsbedingungen ein cDNA-Klon voller Länge für das bereits bekannte Testican-1 (Alliel et al, 1993) isoliert werden.

Sezerniertes Testican besteht aus fünf Domänen. Domäne I ist spezifisch für Testican und zeichnet sich durch saure Aminosäurereste aus. Es folgen eine FS- und eine EC-Domäne. Im C-terminalen Bereich der Testicane findet man eine TY-Domäne und eine weitere Testican spezifische Domäne (Domäne V). In dieser Domäne sind zwei Glycosaminoglycan-Anheftungsstellen konserviert. Auch bei den Testicanen finden sich Introns der Phase I an den Domänengrenzen (S. Röhl, D. Heep ,persönliche Mitteilung). Damit sind die Testicane die einzigen Proteoglycane der BM-40 Familie und bilden insofern eine Untergruppe innerhalb der Familie.

Es stellt sich nun die Frage, ob man für einzelne Domänen bestimmte Funktionen vorhersagen kann. Hierzu kann man die Untersuchungen an Proteinen vergleichen, die die entsprechenden Domänen enthalten und so versuchen universelle Eigenschaften zuzuordnen.

### 3.2 Follistatin- und Kazal-Domäne

Die Bezeichnung FS-Domäne geht auf das gleichnamige Protein zurück, in welchem diese Domäne aufeinanderfolgend dreimal vorkommt. Jede FS-Domäne enthält insgesamt zehn Cystein-Reste, deren Anordnung ein typisches Muster erkennen lassen. Follistatin ist ein sekretiertes Protein, welches an viele Mitglieder der TGF- $\beta$ -Proteinfamilie (z.B. Activin) binden kann und so deren Wirkung aufhebt (Michel et al., 1993). Es wurde ursprünglich mit der Regulation der Sekretion von Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) in der Hirnanhangdrüse in Verbindung gebracht. Mittlerweile werden ihm vielfältige Funktionen innerhalb des reproduktiven Zyklus zugeschrieben (Patel, 1998). Überexpression in *Xenopus* induziert die neurale Entwicklung (Hemmati-Brivanlou et al., 1994) und somit besitzt Follistatin eine Schlüsselrolle in der Embryogenese. Follistatin-defiziente Mäuse sterben kurz nach der Geburt ohne zu atmen. Sie zeigen Abnormalitäten des Skeletts und besitzen eine gespannte, glatte Haut (Matzuk et al., 1995). Das Activin-bindende Epitop wurde bislang keinem Bereich im Follistatin zugeordnet. Vorläufige Daten deuten jedoch darauf hin, daß ein N-terminaler Teil, welcher selbst nicht zur Follistatin-Domäne gehört und die Aminosäuren 75-86 der ersten FS-Domäne an dieser Bindung beteiligt ist (Inouye et al., 1991; Sumitomo et al., 1995). Beide Stellen sind weder in SMOC-1 noch in SMOC-2 vorhanden. Die Beobachtung, daß sowohl BM-40 als auch Follistatin PDGF binden, führte zu der Vorhersagen, daß diese Funktion mit einer FS-Domäne verknüpft ist (Patthy und Nikolics, 1993). Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die PDGF-Bindungsstelle in der EC-Domäne des BM-40 liegt (Göhring et al., 1998).

Agrin, ein weiteres sekretiertes Protein, welches an der Bildung neuromuskulärer Endplatten beteiligt ist (Patthy und Nikolics, 1993; Kleinman und Reichardt, 1996), enthält neun FS-Domänen. Auch hier ist bislang keine Funktion des Proteins bekannt, die speziell einer FS-Domäne zuzuordnen wäre. Diese Beispiele zeigen, daß extrazellulären Domänen nicht unmittelbar bestimmte Funktion zugeordnet werden können, solange die Bindungsstellen nicht im Detail beschrieben sind und somit die Konservierung beteiligter Aminosäuren auf experimenteller Grundlage beurteilt werden kann.

Die Struktur der FS-Domäne ist an einem BM-40 Konstrukt mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt worden (Hohenester et al., 1997). Sie besteht aus zwei Teilen, die man als Subdomänen bezeichnen kann. Der erste Teil umfaßt vier Cystein-Reste und bildet eine  $\beta$ -Schleife. Diese Struktur ist ähnlich zur EGF-Domäne, die sich aus dem

epidermalen Wachstumsfaktor ableitet. Der zweite Teil der FS-Domäne enthält sechs Cystein-Reste und gleicht einer Kazal-Domäne, die aus Protease-Inhibitoren bekannt ist (Engel et al, 1987; Esch et al., 1987; Bolander et al., 1988; Bode und Huber, 1991). Die FS-Domänen in SMOC-1 und SMOC-2 stellen untypische FS-Domänen dar, weil sie jeweils sechs Cysteine enthalten (Abbildung 2.6). Damit könnte man sie ebenfalls als Kazal-Domänen bezeichnen. Abbildung 3.2 zeigt einen Vergleich der FS-Domänen von SMOC-1 und -2 und BM-40 mit Kazal-Domänen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SMOC-1 H 42-	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
SMOC-2 H 39-	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
KAZAL (nicht Klassisch)	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
KAZAL (Klassisch)	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BM-40	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

Abbildung 3.2 **Sequenzvergleich zwischen FS-Domänen aus SMOC-1, -2 und BM-40 mit einer klassischen und einer nicht-klassischen Kazal-Domäne.** Die nicht-klassische Kazal Domäne stammt aus dem *Anemonia*-Elastase Inhibitor, die klassische aus dem Ovomuroid des Silber-Fasan. Als typische FS-Domäne dient die des humanen BM-40. Die Zahlen numerieren die Cystein-Reste. Ähnliche Aminosäuren zu SMOC wurden grau hinterlegt. Weitere Erklärungen im Text.

Man unterscheidet zwischen klassischer und nicht-klassischer Kazal-Domäne (Tschesche et al., 1987). Beide weisen innerhalb des Konsensus sechs Cystein-Reste auf, unterscheiden sich jedoch in den Abständen, die zwischen bestimmten Cysteinen liegen. So beträgt der Abstand zwischen den Cysteinen fünf und sechs für den klassischen Kazal-Typ sieben Aminosäuren, während im nicht-klassischen Kazal-Typ, wie für SMOC-1 und -2 nur drei Aminosäuren vorkommen (Abbildung 3.2). Für den Abstand zwischen Cystein acht und neun sorgen im klassischen Kazal-Typ zwei Aminosäuren, während beim nicht-klassischen, in FS-Domänen und in SMOC-1 und -2 hier sechs Aminosäuren stehen. Bislang gibt es weder für Mitglieder der BM-40-Familie noch für Agrin oder Follistatin experimentelle Hinweise auf eine Protease-Inhibitor Aktivität, wie bei Vorhandensein einer Kazal-Domäne zu vermuten wäre. Dies ist möglicherweise auf eine Insertion in der inhibitorischen Schleife zwischen Cystein sechs und sieben zurückzuführen (Abbildung 3.2). Während in allen Proteinase-Inhibitoren hier ein konstanter Abstand von sieben Aminosäuren zu finden ist, beträgt er im BM-40 zehn und im Follistatin neun Aminosäuren. Für SMOC-1 und SMOC-2 findet man acht Aminosäuren zwischen diesen Cystein-Resten. Ob die Insertion eines Prolins hier möglicherweise die Funktion als Protease-Inhibitor beeinträchtigt ist fraglich. In Anlehnung an die Homologie zu BM-40 wurde diese Domäne für SMOC-1 und SMOC-2 in der Arbeit als FS-Domäne bezeichnet.

Ein Sequenzvergleich der FS-Domäne von BM-40 mit den FS-Domänen aus den Testicanen (Abbildung 2.41) läßt erkennen, daß alle drei humanen Testicane anstelle von zehn Cystein-Resten, wie in der FS-Konsensus Sequenz, zwölf, also zwei zusätzliche Cysteine besitzen. Ein Strukturvergleich mit der FS-Domäne des BM-40 zeigt, daß sich diese Cystein-Reste gegenüberstehen, so daß die Ausbildung einer zusätzlichen Disulfidbrücke wahrscheinlich ist. Ein weiterer Unterschied besteht in der Anzahl der Aminosäuren zwischen Cystein 4 und 5. Normalerweise findet man zwischen diesen eine oder zwei Aminosäuren. Bei den Testicanen variiert deren Anzahl jedoch zwischen 24 und 28. Die Anordnung der beiden Subdomänen könnte sich deshalb im Vergleich zum BM-40 unterscheiden.

### **3.3 Thyroglobulin-Domäne**

Die TY-Domäne wird über das Vorhandensein von sechs Cystein-Resten definiert. Weiterhin findet man ein konserviertes Glutamin unmittelbar vor dem dritten Cystein-Rest und ein CWCV-Tetrapeptid, welches die Cysteine drei und vier enthält. Diese Domäne ist aus unterschiedlichen Proteinen bekannt. Im Thyroglobulin, dem Vorläufer der Thyroxin-Hormone, gibt es insgesamt 11 TY-Domänen. Sie sind jedoch nicht unmittelbar an der Entstehung der Thyroxine beteiligt. Auch in Proteinen der extrazellulären Matrix findet man TY-Domänen. Nidogen-1 und -2 (Mann et al., 1989, Kohfeldt et al., 1998), welche z.B. als Bestandteil von Basalmembranen bekannt sind, besitzen eine bzw. zwei TY-Domänen. Desweiteren findet man TY-Domänen in Zell-Oberflächen-Proteinen (Epitheliales Glycoprotein, EGP) und in p41, der humanen MHC-Klasse II-assoziierten invarianten Kette, welches mit Cathepsin L einen Komplex bildet (Ogrinc et al., 1993). Die TY-Domäne des p41 wurde zur Aufklärung der Kristallstruktur verwendet (Guncar et al., 1999). P41 gehört zu einer Subgruppe von Proteinen, die eine TY-Domäne enthalten und als Protease-Inhibitor wirken. Weitere Mitglieder dieser Gruppe sind Equistatin (Lenarcic et al., 1997) und der Cystein-Protease Inhibitor aus Lachs (Yamashita und Konagaya, 1996). Die für die Bindung zwischen p41 und Cathepsin L wichtigen Aminosäuren verteilen sich über drei Regionen der Domäne, gehören nicht zur Konsensus-Sequenz der TY-Domäne und sind in SMOC-1 und -2 nicht konserviert, so das eine Funktion als Protease-Inhibitor für diese Proteine eher unwahrscheinlich erscheint. Eine Auffälligkeit in der Anordnung der beiden Thyroglobulin-Domänen von SMOC-1 und -2 liegt darin, daß sie in diesen Proteinen durch die Insertion einer SMOC-spezifischen Domäne getrennt sind. Eine solche Anordnung war bislang nicht

bekannt. Die TY-Domäne von Testican-1, -2 und -3 erfüllt alle Kriterien des TY-Konsensus. Neben den sechs Cystein-Resten sind weitere strukturell wichtige Aminosäuren konserviert (Abbildung 2.43). Bislang gibt es keine Daten, die auf eine Protease-Inhibitor Funktion der TY-Domäne der Testicane hinweisen.

### **3.4 Extrazelluläre Calcium-bindende Domäne**

Untersuchungen an BM-40 zeigten, daß dieses Protein mit hoher Affinität Calcium binden kann (Maurer et al., 1992). Die Calcium-Bindung wurde von einer starken Konformationsänderung des Proteins begleitet, die mit CD-Spektroskopie nachgewiesen wurde. Aus der Sequenz des BM-40 konnte durch Vergleich mit der Konsensus-Sequenz eine EF-Hand vorhergesagt werden. Diese hochkonservierte Struktur bildet ein Helix-Schleife-Helix Motiv, welches Calcium-Ionen in Form einer pentagonalen Bipyramide koordiniert. EF-Hände sind aus vielen cytosolischen Proteinen bekannt und über die Calcium-Bindung werden Struktur und Funktion dieser Proteine moduliert (Kawasaki et al., 1998; Kretsinger et al., 1991; Stynadka et al., 1989; McPhalen et al., 1991). Die Röntgenstrukturanalyse der EC-Domäne des BM-40 (Hohenester et al., 1996) zeigte, daß im Protein eine zweite EF-Hand vorhanden ist, die aufgrund der Insertion eines Prolins nicht aus der BM-40 Sequenz vorhergesagt werden konnte. Daß die Ausbildung einer funktionellen EF-Hand durch diese Insertion nicht beeinflusst wurde, liegt an einer cis-Peptidbindung, die dafür sorgt, daß die Carbonylgruppe der Proteinkette die Calcium-koordinierende Position einnehmen kann. Dieses Beispiel zeigt, daß Sequenzvergleiche aufgrund möglicher Variabilität innerhalb der Konsensus-Sequenzen nicht immer zu umfassenden Vorraussagen führen müssen. BM-40 stellte damit das erste extrazelluläre Protein dar, in dem EF-Hand Motive nachgewiesen wurden.

Für SMOC-1 und SMOC-2 konnten anhand der Sequenzvergleiche je zwei funktionelle EF-Hände vorausgesagt werden, da die konservierten Aminosäuren der Konsensussequenz entsprachen.

Eine für das BM-40 analysierte Kollagen-Bindungsstelle innerhalb der EC-Domäne ist für die Bindung verschiedener Kollagene an BM-40 verantwortlich. In einem Mutagenese-Ansatz wurden einzelne Aminosäuren gegen Ala ausgetauscht und so die Bindungsstelle auf molekularer Ebene identifiziert (Sasaki et al., 1998). Die Bindungsstelle ist in zwei weiteren Familienmitgliedern der BM-40 Familie, dem QR-1 und dem SC-1 konserviert. Ein Sequenzvergleich zwischen BM-40, SMOC-1 und SMOC-2 zeigte, daß die entsprechenden Aminosäuren nicht konserviert waren. Deshalb ist in SMOC-1 und -2 nicht mit einer Kollagenbindung, zumindest unter Beteiligung dieser Bindungsstelle zu rechnen.

Die EC-Domäne der Testicane weist im Vergleich mit den anderen Mitgliedern der BM-40 Familie zwei zusätzliche Cystein-Reste innerhalb der Konsensus-Sequenz auf. Ein Vergleich der Sequenz der EC-Domäne von Testican-1 mit der Kristallstruktur der EC-Domäne des BM-40 zeigte die Möglichkeit, daß diese beiden Cysteine eine zusätzliche Disulfidbrücke bilden (Kohfeldt et al., 1997). Dies würde zu einer Verknüpfung der beiden EF-Hände führen.

### **3.5 Verwandtschaft der BM-40 Familienmitglieder**

Anhand eines Kladograms soll die Verwandtschaft der Mitglieder der BM-40 Familie eingeordnet werden. Dazu wurde ein Sequenzvergleich mit den bekannten EC-Domänen nach dem Prinzip des maximalen Parsimony durchgeführt (Abbildung 3.3). Man erkennt, daß die Familie in vier Gruppe unterteilt werden kann. Obgleich in der Analyse nur die Sequenzen der EC-Domäne berücksichtigt wurden, findet man eine Übereinstimmung zwischen der Eingruppierung durch diese Methode und dem Domänenaufbau der Proteine. Die Testicane zeigen die geringste Verwandtschaft zum BM-40 auf, während humanes SMOC-1 und -2 dem BM-40 verwandtschaftlich näher steht. TSC-36 findet sich zwischen den Testicanen und SMOC-1 und -2. Es sei nochmals betont, daß diese Analyse allein auf dem Vergleich der Sequenzen der einzelnen EC-Domänen beruht. Das Vorkommen von BM-40 und Testican in Invertebraten deutet auf eine lange Entwicklungsgeschichte mit einem hohen Konservierungsgrad innerhalb der EC-Domäne hin.

tcan2 human
tcan2 mouse
tcan3 human
tcan3 mouse
tcan1 human
tcan1 mouse
tcan caeel
tcan dros
tsc36 mouse
tsc36 rat
tsc36 human
tsc36 chick
tsc36 zfish
smoc2 mouse
smoc2 human
smoc1 human
scl mouse
scl rat
scl human
qrl cotja
sprc trout
sprc zfish
sprc chick
sprc quail
sprc bovin
sprc human
sprc mouse
sprc rat
sprc oryct
sprc xenla
sprc caeel
sprc bombyx
sprc dros

Abbildung 3.3 **Verwandtschaftsbeziehungen homologer EC-Domänen.** Das Kladogramm entstand aus dem Sequenzvergleich der Sequenzen von EC-Domänen bekannter Mitgliedern der BM-40 Familie. Hierzu wurde das Verfahren des maximalen Parsimony verwendet. Man kann vier Gruppen unterscheiden (Rahmen).

### 3.6 Rekombinante Expression

Zur Charakterisierung von SMOC-1 und -2 wurden diese in einem eukaryontischen System rekombinant exprimiert, um ein hohes Maß an Authentizität der Proteine zu gewährleisten. Dies ist besonders bei der Expression extrazellulärer Proteine wichtig, da ihre Struktur und damit ihre Funktionalität von der korrekten Verknüpfung aller Disulfidbrücken abhängt. Einen zweiten wichtigen Aspekt stellen die posttranslationalen Modifikationen, wie z.B. Glycosylierungen dar. Bei einer Expression im bakteriellen System müßte man auf diese Veränderungen verzichten. Daß jedoch auch ein eukaryotisches Expressionssystem Schwierigkeiten bereiten kann, zeigt die Expression von SMOC-1 in 293-EBNA-Zellen. Dieses System wird in Verbindung mit dem Expressionsvektor pCEP-Pu

standardmäßig eingesetzt und liefert, in Abhängigkeit vom Konstrukt, meist gute Ausbeuten an gewünschtem Protein, welches aus dem gesammelten Kulturmedium gereinigt werden kann. Im Falle von SMOC-1 konnte ein Protein gereinigt werden, welches als homogene Bande um 58 kDa in der SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen zu erkennen war. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen trat jedoch eine zweite Bande auf, welche auf der Höhe eines Dimer erschien (Abbildung 2.13). Nachdem dieses Protein keine Calcium-abhängige Konformationsänderung in der CD-Spektroskopie zeigte, wurde seine Masse mittels MALDI-Massenspektroskopie ermittelt. Ein Vergleich der erhaltenen Masse mit der theoretischen Masse des Protein deutete auf eine mögliche Protease-Schnittstelle im Bereich des K374 hin. Die Vorhersage der Beteiligung einer bestimmten Protease bei einem solchen Abbau ist nur selten möglich, da nur wenige spezifische Konsensus-Sequenzen für Proteasen bekannt sind. Im Falle von SMOC-1 deutet jedoch eine Ansammlung basischer Reste in dieser Region des Proteins darauf hin, daß die gesuchte Protease zur Familie der Furine gehört (Denault und Leduc, 1996; Nakayama, 1997). Durch die proteolytische Spaltung verlor SMOC-1 möglicherweise die zweite EF-Hand innerhalb der EC-Domäne und zeigte daher keine Calcium-abhängige Konformationsänderung (siehe unten). Die Bildung eines Dimer, die in der SDS-PAGE zu erkennen war, ist möglicherweise auf die Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke zurückzuführen, da es durch den Verlust des C-terminalen Bereiches zu einer ungeraden Anzahl an Cystein-Resten im Expressionsprodukt kam.

Mit der Verwendung von HT1080-Zellen zur Expression von SMOC-1 konnte dann ein Produkt erhalten werden, welches in der CD-Spektroskopie eine reversible Calcium-Bindung zeigte. Die Expression von SMOC-2 in EBNA-293 Zellen erwies sich als erfolgreich, da die mögliche Furin-Spaltstelle um die Aminosäure 374 in SMOC-2 nicht konserviert ist. Das bei der Expression von SMOC-2 auftretende Degradationsprodukt kann nicht mit einer Furin-Spaltstelle erklärt werden. Das in EBNA-293 Zellen exprimierte SMOC-2 voller Länge zeigt in der CD-Spektroskopie eine reversible Bindung von Calcium-Ionen (siehe unten).

Aus der Sequenz beider Proteine wurden für SMOC-1 drei (Asn 153, Asn 214 und Asn 374) und für SMOC-2 zwei mögliche N-Glycosylierungsstellen (Asn 206 und Asn 362) vorhergesagt. Dabei handelt es sich um N-Glycosylierungsstellen in der NEW-Domäne (Asn 214 bzw. Asn 206) und innerhalb der ersten EF-Hand (Asn 374 bzw. Asn 362). Zur Überprüfung, ob die rekombinanten Proteine glycosyliert waren, wurden diese mit N-Glycosidase-F behandelt. Die Analyse der Proben mit SDS-PAGE zeigten für SMOC-1 eine Reduktion des apparenten Molekulargewichtes von etwa 15 kDa an, während die Änderung

für SMOC-2 etwa 10 kDa betrug (Abbildung 2.14; 2.20). Dies deutet darauf hin, daß jede N-Glycosylierungsstelle eine Kohlenhydratkette in der Größenordnung von etwa 5 kDa trägt. Eine MALDI-MS Analyse der N-Glycosidase F behandelten Proteine und der nicht behandelten Kontrollen ergaben jedoch Werte von 3,7 kDa Kohlenhydrat für SMOC-1 und 4,8 kDa Kohlenhydrat für SMOC-2. Daraus kann man schließen, daß diese Seitenketten das Laufverhalten der Proteine in der SDS-PAGE stark beeinflussen. Betrachtet man das N-terminale Degradationsprodukt von SMOC-2 nach N-Glycosidase F Behandlung, so stellt man keine Reduktion des apparenten Molekulargewichtes fest (Abbildung 2.21). Dies ist darauf zurückzuführen, daß die N-Glycosylierungsstelle, die im SMOC-1 am Ende der ersten TY-Domäne liegt (Asn 153), in SMOC-2 nicht konserviert ist.

Für humanes Testican-2 konnte nur ein um die N-terminale Domäne verkürztes Protein (FSEND) exprimiert und gereinigt werden. Es konnten zwei Fraktionen von Testican-2 FSEND unterschieden werden. Die eine Fraktion enthält das Protein in seiner Proteoglycan-Form und zeigt eine breite Bande im hohen Molekularbereich ab 70 kDa (Abbildung 2.44). Eine Fraktion, die wahrscheinlich die GAG-freie Form des Proteins darstellt konnte nicht zur Homogenität gereinigt werden. Humanes Testican-3 ergab ebenfalls diese beiden Fraktionen, die beide zur Homogenität gereinigt werden konnten (Abbildung 2.45 und 2.47). Alle Testicane zeigten nur eine schwache Anfärbung durch Coomassie Brilliant Blue, so daß sie mit Silber angefärbt wurden.

### **3.7 Calciumbindung der neuen Familienmitglieder**

Rekombinantes SMOC-1 aus EBNA-293 Zellen zeigte in der CD-Spektroskopie ein typisches Spektrum eines Proteins, mit einem geringen  $\alpha$ -Helix Gehalt. Neben einer Schulter bei 222 nm, die dem  $\alpha$ -helikalen Sekundärstrukturanteil zuzurechnen ist, findet man ein Minimum bei 204 nm, welches einen Anteil an random-coil Struktur anzeigt (Abbildung 2.15). Für SMOC-1 wurden aufgrund einer Sequenzanalyse zwei EF-Hände vorhergesagt. In Analogie zu BM-40 würde man eine Änderung des  $\alpha$ -helikalen Anteils des Proteins beim Wechsel zwischen den Bedingungen erwarten; dies konnte jedoch nicht festgestellt werden (Abbildung 2.15). Wie bereits im letzten Abschnitt ausgeführt wurde, war das Expressionsprodukt möglicherweise im Vergleich zum theoretischen Protein C-terminal verkürzt, was mit dem Verlust der zweiten EF-Hand einherging. Eine mögliche Erklärung, warum eine Calcium-abhängige Konformationsänderung ausbleibt, obwohl noch eine

intakte EF-Hand im Protein vorhanden ist, könnte in der N-Glycosylierung des Asn 374 bestehen. Diese liegt innerhalb der EF-Hand an der zweiten Calcium-koordinierenden Position. Eine Kohlenhydratkette würde die Konformation der Schleife beeinflussen und sehr wahrscheinlich die Calcium-Bindung durch die Belegung der Calcium-koordinierenden Position unmöglich machen. Eine weitere Erklärung könnte in der positiven Kooperativität der EF-Hände im BM-40 liegen (Busch et al., 2000). Durch die Deletion einer EF-Hand in SMOC-1 könnte die zweite EF-Hand ihre Funktion möglicherweise nicht mehr erfüllen. Die Expression von SMOC-1 in HT1080-Zellen lieferte ein Protein, welches Calcium-abhängig eine Änderung des  $\alpha$ -helikalen Strukturanteils zeigt (Abbildung 2.23). Damit ist zumindest indirekt der Beweis erbracht, daß die zweite EF-Hand im SMOC-1 essentiell für die reversible Bindung von Calcium-Ionen ist. Im Falle von SMOC-2 konnte bereits in den EBNA-293 Zellen ein Protein exprimiert werden, welches eine reversible Calcium-abhängige Änderung seines  $\alpha$ -helikalen Strukturanteils zeigt.

Die Calcium-Bindung von Testican wurde an humanem Testican-3 voller Länge und an murinem Testican-2 voller Länge untersucht. Von beiden Proteinen gab es je zwei Fraktionen. Die eine enthielt das Protein mit angehängten GAG-Seitenketten, die andere Fraktion entsprach dem Protein ohne Proteoglycancharakter. Alle Proben ergaben CD-Spektren, wie man sie für Proteine mit einem geringen  $\alpha$ -Helix Gehalt erwarten würde. Neben einer typischen Schulter bei 222 nm zeigten die Spektren ein Minimum um 204 nm, was einen random-coil Anteil an der Proteinstruktur anzeigt. Von den gemessenen Fraktionen zeigte nur die GAG-freie Form des humanen Testican-3, entgegen der Erwartungen eine reversible Calcium-abhängige Konformationsänderung. Daß die Proteoglycanform des Proteins keine Reaktion zeigt, hängt möglicherweise mit sterischen Problemen zusammen, die aufgrund der GAG-Seitenketten entstehen und eine Konformationsänderung behindern. Die Frage ob diese Form des Testican-3 Calcium bindet kann auf diesem Weg nicht beantwortet werden. Es erscheint aufgrund der Konservierung der EF-Hände unwahrscheinlich, daß die GAG-freie Form des murinen Testican-2 keine Calcium-abhängige Konformationsänderung zeigt. Deshalb sollte die Calcium-Bindung für Testican-2 mit einem Protein aus einer unabhängigen Expression wiederholt werden.

Die Messung der Calcium-Bindung der EC-Domäne von Testican-1 (Kohfeldt et al., 1997) zeigte, daß wahrscheinlich nur eine der beiden EF-Hände Calcium bindet. Dies ist auf eine Besonderheit in der zweiten EF-Hand von Testican-1 zurückzuführen. An der zweiten Calcium-koordinierenden Position findet sich hier Phe anstelle von Asp, wie im BM-40.

Dieses Phe kann sich nicht an der Koordination des Calcium beteiligen. Der Austausch der sauren Aminosäure gegen eine aromatische in der zweiten EF-Hand ist in allen humanen Testicanen konserviert.

### **3.8 Lokalisation der neuen Mitglieder der BM-40 Familie in Zellen und Gewebe**

Die Gewebeverteilung wurde für beide Transkripte auf mRNA adulter Mäuse untersucht. Der Northern-Blot zeigte hier auf den ersten Blick eine fast gegenläufige Verteilung der Transkripte an (Abbildung 2.9). Auffällig war jedoch ein starkes Signal sowohl für SMOC-1 als auch für SMOC-2 in Ovarien. Eine RT-PCR-Analyse mit anschließendem Southern-Blot und dessen Hybridisierung mit spezifischen Sonden (Abbildung 2.11) bestätigte das starke Signal in den Ovarien. Diese Methode zeigte jedoch eine zumindest geringe Expression für die Transkripte in allen untersuchten Geweben. Ein Vergleich der Signalintensitäten zwischen Northern- und Southern-Blot zeigt weitgehende Übereinstimmung. Abgesehen vom Vorkommen in den Ovarien wird SMOC-1 noch recht stark in Gehirn, Thymus und Lunge exprimiert, während SMOC-2 in Herz, Muskel und Milz vertreten ist.

Zur Untersuchung der Proteinexpression von SMOC-1 und -2 sollten Immunoblot-Analysen und immunhistochemische Färbungen auf Gewebeschnitten verwendet werden. Für die Analyse der endogenen Expression von SMOC-1 und -2 in verschiedenen Zelllinien war es wichtig, daß die polyklonalen Kaninchenserum vor ihrem Einsatz auf Kreuzreaktivität innerhalb der BM-40 Familie unter nativen und nicht-nativen Bedingungen getestet worden waren (Abbildung 2.24 und 2.25). Das Serum gegen SMOC-1 zeigte in beiden Methoden nur eine Reaktion mit dem Antigen und nicht mit anderen Vertretern der Familie. Das Antiserum gegen SMOC-2 reagierte unter nativen Bedingungen jedoch auch mit SMOC-1 und etwas weniger stark mit Testican-1. Unter nicht-nativen Bedingungen verlor sich die Kreuzreaktivität gegen SMOC-1. Weiterhin gab es jedoch eine Reaktion mit Testican-1 und eine schwache Reaktion mit Testican-2. Immunoblot-Untersuchungen für SMOC-1 und -2 konnten untereinander verglichen werden, da Testicane Proteoglycan-Charakter haben und deshalb als breite Bande bei hohen Molekulargewichten erscheinen. Mögliche Kreuzreaktivitäten mit SMOC-2 wären so zu identifizieren gewesen.

Die Untersuchung verschiedener Zelltypen auf die endogene Expression von SMOC-1 und SMOC-2 erfolgte auf einem Immunoblot mit konditioniertem serum-freiem Zellkultur-Medium (Abbildung 2.26). Die unterschiedlichen Bandenmuster für SMOC-1 und SMOC-2 bestätigten die Abwesenheit einer Kreuzreaktivität der Seren. SMOC-1 wird von den meisten der untersuchten Zellen endogen exprimiert. So kommt es im Unterschied zu SMOC-2 auch in Chondrosarcom- und Osteosarcom-Zellen vor. Die Expression beider Proteine in Keratinozyten weist auf eine mögliche Lokalisation in der Haut hin. Beide Proteine werden auch von Fibroblasten sezerniert. Das Bandenmuster in MCF-7-Brustkrebs-Zellen zeigt eine Anzahl an Banden mit geringem Molekulargewicht. Dies deutet auf eine erhöhte proteolytische Aktivität der Zellen gegenüber SMOC-1 und SMOC-2 hin.

Im Vergleich zum rekombinanten, in HT1080-Zellen exprimierten Protein erscheint das endogene SMOC-1 als Doppelbande. Die höhere der beiden Banden befindet sich bei etwa 90 kDa, die andere bei etwa 67 kDa. Bei diesem Molekulargewicht findet sich auch die Bande des rekombinanten Proteins (Abbildung 2.17). Einige Zelllinien, darunter HT1080-Zellen sezernieren zwei Formen von SMOC-1, die sich möglicherweise in der Art der Glycosylierung unterscheiden. Aus welchem Grund bei der rekombinanten Expression in HT1080-Zellen die Form mit dem geringeren Molekulargewicht bevorzugt sezerniert wird, ist nicht bekannt. Die Tatsache, daß SMOC-1 auch von HT1080-Zellen sezerniert wird, war für die rekombinante Expression nicht weiter relevant, da das Protein mittels Affinitätschromatographie gereinigt und somit vom endogenen Produkt abgetrennt wurde. Rekombinantes SMOC-2 (Abbildung 2.18) läuft dagegen bei einem Molekulargewicht, welches mit dem des endogenen Proteins vergleichbar ist.

Zur Lokalisation der beiden Proteine im Gewebe wurden Paraffinschnitte von neugeborenen Mäusen bzw. adulter Mausorgane angefertigt. Die Färbungen für SMOC-1 zeigten eine Lokalisation im Bereich vieler Basalmembranzonen. Zur Bestätigung der Lokalisation wurde ein Antikörper gegen EHS-Laminin verwendet, der gegen die  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  und  $\gamma 1$ -Kette von Laminin gerichtet ist. Es ist somit möglich, alle bekannten Laminine, außer Laminin 5 und den neu charakterisierten Lamininen 13-15 zu erkennen. Der Vergleich der Färbungen für SMOC-1 und EHS-Laminin zeigte weitgehende Ko-Lokalisation, z.B. im Bereich der Basalmembran in der Haut (Abbildung 2.30) und in der Niere (Abbildung 2.31). Im Gehirn stimmten die Färbungen im Bereich der Hirnhaut und um Gefäße überein. In anderen Organen, die von Basalmembranen umgeben sind, wie in Herz, Lunge und Muskel

konnte ebenfalls eine Ko-Lokalisation gezeigt werden. Aufgrund der Färbungen kann nicht entschieden werden, wo genau SMOC-1 innerhalb der Basalmembran lokalisiert ist. Neben einer Einbindung in ihre Struktur ist auch eine Assoziation von SMOC-1 an der Außenseite der Basalmembran denkbar. Dies kann nur auf elektronenmikroskopischer Ebene analysiert werden. Entsprechende Zusammenarbeiten wurden initiiert (Dr. Miosge, Göttingen).

Das Ovar stellt das einzige bislang untersuchte Gewebe dar, in dem keine Ko-Lokalisation von SMOC-1 mit Laminin gefunden wurde. Während Laminin auch hier im Bereich der Basalmembran, welche die Follikel umschließt, gefunden wurde, ist SMOC-1 ausschließlich um die Oocyten lokalisiert. Dies gilt für alle Entwicklungsstufen der Follikel, also Primär-, Sekundär und Tertiärfollikel, ebenso wie für das reife Follikel (Graaf'scher Follikel). Unklar ist jedoch, ob die Oocyten diese Färbung schon im Stadium des Primordial-Follikel, also vor der Bildung der Zona Pellucida zeigen. Als Zona Pelucida wird die Region zwischen Oocyt und Follikel genannt. Sie besteht bei Mäusen aus drei verschiedenen Proteinen ZP1-ZP3 (Bleil und Wassarman, 1980a & b; Greve und Wassarman, 1985; Dunbar et al., 1994). Dem Protein ZP3 wird eine Rolle bei der Bindung des Spermiums an die Oocyte zugeschrieben. Anhand der immunhistochemischen Untersuchungen auf den Ovarienschnitten war es nicht möglich, eine Aussage zu treffen, ob SMOC-1 innerhalb der Zona Pellucida lokalisiert ist. Weitere Untersuchungen auf isolierten Maus-Oocyten zeigten jedoch, daß dies nicht der Fall ist, sondern SMOC-1 entweder mit der cytosolischen oder der extrazellulären Seite mit der Plasmamembran der Oocyten assoziiert ist (Abbildung 2.35). Damit wäre es in der Nähe des perivitellinen Spalts, einem Zwischenraum, der die Zona Pellucida von der Plasmamembran trennt, lokalisiert und könnte hier möglicherweise Schutz- oder Signalfunktionen übernehmen.

Der Immunoblot mit isolierten Maus Oocyten zeigt zwei Banden, eine bei geringerem und eine bei ähnlichem Molekulargewicht wie rekombinantes SMOC-1. Die Bande bei geringerem Molekulargewicht könnte auf eine Degradation des Proteins hinweisen. Die Bande bei ähnlichem Molekulargewicht deutet dagegen auf eine geringfügig veränderte Modifikation des Proteins, möglicherweise durch eine andere Glycosylierung, hin.

Im Falle von SMOC-2 war es nicht möglich, Färbungen auf Gewebeschnitten zu erhalten, obwohl das Serum gegen rekombinantes SMOC-2 auf Immunoblots funktionierte.

Für Testican-1, -2 und -3 wurde ebenfalls eine Northern-Blot Analyse mit mRNA adulter Mäuse durchgeführt. Die Transkription von humanem Testican-1 und Testican-3 sind auf Gehirn beschränkt, während Testican-2 auch in der Lunge und in Hoden ein Signal zeigt. Es gibt Beispiele für viele Proteoglycane, die ausschließlich neuronal exprimiert werden. Eine in-situ Hybridisierung mit einer Testican-2-spezifischen Sonde auf Gewebe adulter Mäuse bestätigte eine weitgehend neuronale Expression. Eine inhibitorische Wirkung auf das Auswachsen von Neuriten konnte für murines Testican-2 in-vitro gezeigt werden (Dr. Hartmann, persönliche Mitteilung).

### 3.9 Calciumhomöostase und EC-Domänen

Anhand von Untersuchungen an BM-40 und Testican-1 wurden für die Calcium-Affinität der EC-Domäne  $K_D$ -Werte im nM- bis  $\mu$ M-Konzentrationsbereich bestimmt (Busch et al., 2000; Kohfeldt et al., 1997). Die Konzentration an freiem, extrazellulären Calcium beträgt 1,2 mM und unterliegt einer strengen Kontrolle. Ist unter diesen Umständen, bei denen eine permanente Absättigung der EC-Domänen mit Calcium zu erwarten wäre, für die Mitglieder der BM-40 Familie eine dynamische  $Ca^{2+}$ -abhängige Funktion denkbar? Testican-1 wurde mit elektronenmikroskopischen Methoden im Bereich der postsynaptischen Membran von Neuronen lokalisiert (Bonnet et al., 1996). Der synaptische Spalt steht nicht mit dem extrazellulären Raum im Gehirn in Verbindung (Araque, A. et al., 1999; Antanitus, 1999). Er wird allem Anschein nach von Ausläufern der Astrocyten umschlossen und bildet somit ein eigenes Kompartiment, dessen  $Ca^{2+}$ -Konzentration in Abhängigkeit der neuronalen Aktivität variieren könnte. Dies ist insofern interessant, da Calcium-Ionen eine große Rolle während der Neurotransmitter-Ausschüttung zugeschrieben wird. Ein weiteres Beispiel zeigt, daß die extrazelluläre Calcium-Konzentration während eines künstlichen Zustandes (spreading depression), der mit einem epileptischen Anfall vergleichbar ist, im Tierversuch bis in den  $\mu$ M-Konzentrationsbereich fallen kann (Heinemann et al., 1977; Nicholson, 1980). Weitere Beispiele, die ungewöhnlich niedrige extrazelluläre Calcium-Konzentrationen in Haut, Lunge und Plazenta beschreiben, sind bekannt (Brown et al., 1995). Eine  $Ca^{2+}$ -Regulation könnte somit einen gemeinsamen funktionellen Aspekt der BM-40 Familienmitglieder darstellen.

## **4. Material und Methoden**

### **4.1 In-silico Methoden**

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

### **4.2 Allgemeine molekularbiologische Verfahren**

Qualitative und quantitative Restriktionsspaltungen sowie Ligationen wurden entsprechend der Anleitung des Herstellers (New England Biolabs) bzw. nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Für die Herstellung der benötigten Lösungen wurde entionisiertes Wasser aus einer Reinstwasser Anlage (Millipore) benutzt. Die verwendeten Oligonukleotide wurden von zum größten Teil von der Firma MWG bezogen.

#### **4.2.1 Agarose-Gelelektrophorese**

Nukleinsäuren wandern im elektrischen Feld aufgrund ihres negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrats in Richtung der Anode. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit hängt, abgesehen von der Gel-Konzentration, bei linearen Nukleinsäuren nur von ihrer Länge ab. Im Falle von zirkulären Nukleinsäuren spielt auch deren Verdrillungsgrad eine Rolle. Die Färbung der aufgetrennten Fragmente erfolgt im Gel durch in die DNA-Furchen interkalierendes Ethidiumbromid. Dieser Farbstoff zeigt bei Betrachtung unter UV-Licht eine orange Fluoreszenz. Soweit nicht anders erwähnt, wurde als Laufpuffer TAE verwendet (Tris-Acetat/EDTA-Elektrophoresepuffer; 40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA).

#### **4.2.2 Plasmid Präparationen**

Die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* Bakterienkulturen erfolgte nach Birnboim (1983) oder alternativ mit Hilfe von Präparations-Kits (Macherey & Nagel) nach Angaben des Herstellers. Die Kits erlauben die Verarbeitung von bis zu 5 ml (Mini-Präparation) bzw. bis zu 100 ml Bakterienkultur (Midi-Präparation). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Extinktionsmessung bei 260 nm, wobei eine OD-Einheit 50 mg/ml dsDNA entspricht.

### **4.2.3 *E. coli* Bakterien**

Die Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien (DH5 $\alpha$ , JM 109) erfolgte nach der Methode von Hanahan (1983).

## **4.3 Isolierung neuer cDNA-Klone**

### **4.3.1 Ausplattieren der cDNA- Bibliothek**

Zur Klonierung der cDNA von SMOC-1 und SMOC-2 wurde eine embryonale cDNA- Bibliothek humanem Ursprungs der Firma CLONTECH durchmustert. Zu diesem Zweck wurden  $2,3 \times 10^6$  Plaque-formende Einheiten (PFU) nach Anleitung des Herstellers mit einer eingestellten Menge an Bakterien des Typs K802 (*E. coli*) für 20 min bei 37°C inkubiert. Auf acht quadratische LB-Agar Schalen (22 x 22 cm) wurde ein Phagenanteil in je 35 ml erwärmter LB-Soft-Top-Agarose ausgebracht. Nach Erhärten der Oberfläche wurden die Platten zur Ausbildung der lytischen Plaques über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **4.3.2 Filterabklatsch der Phagenplaques**

Quadratische Nylonfilter (20 x 20 cm) wurden zur Herstellung einer Matrize für je 30 s auf die Oberfläche einer lysierten Phagenplatte aufgelegt und ihre genaue Position durch Einstiche markiert. Anschließend wurde die Membran mit der Phagenseite nach oben nacheinander in folgende Lösungen überführt:

30 s Lysepuffer (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl)

60 s Neutralisierungslösung (0,5 M Tris-HCl, pH 8,0, 1,5 M NaCl)

180 s Waschpuffer (2 x SSC).

Zur kovalenten Verknüpfung der Phagen mit der Membranoberfläche wurde die AUTO-Funktion eines UV-Crosslinkers (STRATAGENE) benutzt.

### **4.3.3 Radioaktive Markierung der Sonden**

Die radioaktive Markierung der verwendeten Sonden erfolgte mit Hilfe des Ladderman Labeling Kit (Takara Shuzo) nach Angaben des Herstellers unter Verwendung von radioaktivem  $^{32}\text{P}$ -dCTP. Alle Sonden wurden zur Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide über Gelfiltrations Säulen (Nick-Columns, Pharmacia) gereinigt.

### **4.3.4 Durchmustern der CLONTECH- cDNA- Bibliothek**

Der EST-Klon 107131 (ATCC) wurde mit dem Restriktionsenzym StyI inkubiert und die anschließend gereinigten zwei DNA-Fragmente von 187 bp und 239 bp, wie beschrieben, mit  $^{32}\text{P}$ -dCTP radioaktiv markiert. Die so erhaltene Probe wurde in wässriger Lösung (0,5 M Natriumphosphat-Puffer, pH 7,2 , 7% SDS, 1 mM EDTA, 10% BSA und 0,2 mg/ml Lachsspermien DNA) bei 65°C über Nacht zur DNA-DNA-Hybridbildung mit den Nylonfiltern in Glasröhren unter Rotation inkubiert. Das Waschen der Filter erfolgte unter wenig stringenten Bedingungen (40 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,2 und 1% SDS) einmal bei 55°C für 15 min und zweimal bei 65°C für 15 min. Tropfnasse Filter wurden zum Antrocknen kurz auf Whatmann Zellulosepapier gelegt und anschließend in handelsübliche Frischhaltefolie eingeschlagen. Zur Visualisierung spezifischer Signale wurden die Filter über Nacht in einer Kassette auf einen Röntgenfilm gelegt und die Filme standardmäßig (Fuji-Maschine) entwickelt.

Filme mit positiven Signalen wurden mit den entsprechenden Phagenplatten paßgenau ausgerichtet und die Bereiche um die Signale aus der Phagenplatte mit Hilfe einer Pipettenspitze ausgestochen. Zur Isolierung der Phagen aus dem erhaltenen Agar-Stückchen inkubierte man dieses über Nacht bei 4 °C in 1 x  $\lambda$ -Puffer (1 M Tris-HCl, pH 7,5, 1 M NaCl, 0,1 M  $\text{MgSO}_4$ , 0,01% Gelatine). Die so erhaltenen Phagen wurden erneut in geringerer Dichte ausplattiert und wie oben beschrieben durchmustert, bis es aufgrund der Verdünnung möglich war einzelne, homogene Phagenkolonien zu extrahieren.

### **4.3.5 Überführung der $\lambda$ -DNA in pDR2-Vektor**

Diese Prozedur diente der Umwandlung der Phagen-DNA in einen Plasmid-Vektor und wurde nach Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt. Dazu wurden extrahierte Phagen aus vereinzelt Kolonien mit einem Cre-produzierenden Bakterienstamm (E. coli

AM1) inkubiert und mit 10 mM IPTG induziert. Nach weiteren Schritten zur Selektion wurden 5 ml LB-Kulturen mit Ampicillin (200 µg/ml) angelegt und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Zur Gewinnung des pDR2-Vektors wurden Plasmid Präparationen wie beschrieben durchgeführt.

#### **4.3.6 Durchmustern der STRATAGENE- cDNA Bibliothek**

Zur Auffindung der vollständigen SMOC-2 cDNA wurde eine murine cDNA-Bibliothek aus Hirngewebe neugeborener Mäuse der Firma STRATAGENE verwendet. Die Durchmusterung erfolgte nach Herstellerangaben und enthielt im wesentlichen die gleichen Schritten wie Sie schon oben beschrieben wurden.

Als Sonde wurden drei Fragmente eingesetzt, die durch EcoRI/NotI- (1,1 kb und 0,45 kb) und EcoRI/BglII- (0,48 kb) Restriktionsverdau des Maus EST-Klons MM059909 (ATCC) erhalten wurden. Die gereinigten Fragmente wurden wie beschrieben radioaktiv markiert und zur Hybridbildung mit den Nylonfiltern inkubiert. Abweichend wurde diese Inkubation bei 42°C in Formamidmix (50% Formamid, 5 x Denhards Lösung (0,1% BSA, 0,1% Ficoll 400 und 0,1% Polyvinylpyrrolidon), 5 x SSPE (750 mM NaCl, 50 mM Natriumphosphat- Puffer, pH 7,6 und 5 mM EDTA), 1,5% SDS und 0,2 mg/ml Lachsspermien-DNA) über Nacht durchgeführt. Das Waschen der Filter erfolgte für je 15 min in 0,1 x SSC (15 mM NaCl, 1,5 mM Natriumzitat, pH 7,5) und 0,1% SDS.

#### **4.3.7 Sonden für Testican-2 und Testican-3**

Die Herstellung spezifischer Sonden zur Durchmusterung der CLONTECH cDNA Bibliothek, für das Testican-Projekt, erfolgte ebenfalls durch Restriktionsverdau von EST-Klonen. Für Testican-2 wurde der humane EST-Klon H14434 (ATCC), welcher aus Hirngewebe stammte, mit den Restriktionsenzymen HindIII/ApaI inkubiert und ein 385 bp Fragment isoliert. Die Testican-3 spezifische Sonde entstammt einem Restriktionsverdau des EST-Klons ATCC 706068, der aus der humanen neuroepithelialen Zell-Linie Ntera2/RA+Mi isoliert wurde. Die verwendeten Enzyme AccI/SacI lieferten eine Sonde deren Länge 440 bp betrug.

#### 4.4 Nukleinsäuresequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Konstrukte erfolgte durch das ZMMK (Zentrum für Molekulare Medizin Köln) Service Labor unter Leitung von Herrn Dr. M. Macht mit einem ABI Prism™ 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems). Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm EditView 1.0.1 (Perkin Elmer) bzw. dem Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8.1 (Genetics Computer Group, Inc.). Die Sequenz der verwendeten Oligonukleotide kann der Tabelle 4.x entnommen werden.

M13 Universal (sense)	5´-CGACGTTGTAACGACGGCCACT-3´
M13 Reverse (antisense)	5´-CAGGAAACAGCTATGAC-3´
BM40SP (sense)	5´-GTTCCAGCACCATGAGGG-3´
Primer 4 (antisense)	5´-GATCCTTCGAGTTAGATCACAAGATCC-3´
SMOC-1 A (sense)	5´-AAGCCCTGGAGCAAGCCAAG-3´
SMOC-1 B (sense)	5´-TGCTCTCACCCTGACATGG-3´
SMOC-1 C (sense)	5´-CGAGGTAGATGCAAAGATGC-3´
SMOC-1 A rev (antisense)	5´-CCAGATTTGCAAGGGTGATC-3´
SMOC-1 B rev (antisense)	5´-CTCTGTATAACGGATGAGAG-3´
SMOC-2 A (sense)	5´-GCTCGTACCTTGTGGATGTG-3´
SMOC-2 B (sense)	5´-CCATCAGTTCCTGTACGG-3´
SMOC-2 A rev (antisense)	5´-GTATGTTCCCTGGATAAAGCAC-3´
SMOC-2 B rev (antisense)	5´-GCACCTGGGTGTCTTGTGG-3´
Testican-2 A (sense)	5´-TGGGAAGACAATCAGCAAG-3´
Testican-2 B (sense)	5´-GGTAGACGCAGTAGACTGC-3´
Testican-2 A rev (antisense)	5´-TAGCCATCTTCATCACAGCTC-3´
Testican-3 A (sense)	5´-TTCGATACCAGCATCTTGCC-3´
Testican-3 B (sense)	5´-TGAATGATGAAGATGAAATTG-3´
Testican-3 A rev (antisense)	5´-TTCATGAAAATCGCCACTAG-3´

Tabelle 4.1 Oligonukleotide zur Sequenzierung.

#### 4.5 Northern Blotting

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Maus Geweben erfolgte mit saurer Guanidin-Phenol-Chloroform Extraktion nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987). Zur Gewinnung von mRNA wurde ein Oligotex mRNA Midi-Präparations-Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet. Die so gewonnene mRNA wurde elektro-

phoretisch, auf einem 1%-igem Agarose-Gel, unter denaturierenden Bedingungen, aufgetrennt. Die aufgetrennte RNA wurde dann mittels Kapillarblot-Technik auf eine Nylonmembran (Hybond XL, Amersham) überführt und unter UV-Strahlung (UV-Cross Linker, Stratagene) kovalent mit der Membran verbunden. Um eine gleichmäßige Beladung zu demonstrieren wurde entweder das fertige Gel mit Ethidiumbromid oder alternativ die Blotmembran mit Methylenblau angefärbt. Die Membranen wurden für 2 h in Glasröhren unter Rotation im Hybridisierungssofen mit 4 x SSC (SSC; 600 mM NaCl und 60 mM Natriumcitrat, pH 7,4), 1% Milchpulver, 1% SDS, 0,3 mg/ml Lachsspermien DNA und 10% Dextransulfat bei 65°C blockiert. Als Sonde für SMOC-1 diente hier ein 546 bp Fragment, welches durch NheI/DraIII-Doppelverdau aus dem PCR-amplifizierten Voll-Länge-Expressionskonstrukt erhalten wurde. Die 412 bp große Sonde für SMOC-2 wurde durch XmnI-Verdau aus der isolierten cDNA generiert. Beide Sonden wurden über ein 1% Agarosegel gereinigt, isoliert und wie beschrieben radioaktiv markiert. Hybridisierung mit der markierten Sonde erfolgte unter den oben beschriebenen Bedingungen über Nacht in wässriger Lösung. Zur Entfernung unspezifischer Signale wurden die Membranen dreimal für jeweils 20 min in 0,5 x SSC mit 0,1% SDS bei 65°C gewaschen. Alternativ erfolgte die Blockierung und Hybridisierung bei 42°C in Formamidmix (50% Formamid, 5x Denhards Lösung (0,1% BSA, 0,1% Ficoll 400 und 0,1% Polyvinylpyrrolidon), 5x SSPE (750 mM NaCl, 50 mM Natriumphosphat- Puffer, pH 7,6 und 5 mM EDTA), 1,5% SDS und 0,2 mg/ml Lachsspermien DNA). Das Waschen der Filter erfolgte für je 15 min in 0,1 x SSC (15 mM NaCl, 1,5 mM Natriumzitat, pH 7,5) und 0,1% SDS. Die Exposition erfolgte entweder auf einer PhosphorImager Photoplatte (Molecular Dynamics) oder in einer Röntgenfilmkassette auf Super RX Röntgenfilm (Fuji).

#### **4.6 In-situ Hybridisierung**

Für die in-situ Hybridisierung wurde das System der Firma Roche für die Generierung DIG-(Digoxigenin) markierter Sonden verwendet. Es handelt sich um ein nicht-radioaktives System, bei dem die spezifische Hybridisierung über eine Farbreaktion sichtbar gemacht wird. Dazu wurde die EC-Domäne des humanen Testican-2 mittels PCR amplifiziert (Tcan2 sense: 5'-GCCCCGCTAGCCGAGACTTGCACCGGTCA-3'; Tcan2 anti-sense: 5'-CAATGACTGAGCTCCTAGGGCTTCTCCCTCCAG-3) und in den pCRII-Vektor ligiert. Zur Bestimmung der Klonierungsrichtung wurde das fertige Plasmid sequenziert. Der Vektor besitzt zwei verschiedene Polymerase Anheftungsstellen. Nach Linearisierung des Konstruktes ist es so möglich mittels in-vitro Transkription unter Zugabe DIG-

markierter Nukleotide nach Anleitung des Herstellers eine sense- bzw. eine anti-sense Sonde zu generieren. Deren Konzentration wurde durch tüpfeln einer Verdünnungsreihe auf eine Nylonmembran (Hybond N+) und anschließende Farbreaktion bestimmt.

Die Hybridisierung erfolgte auf sagitalen Kryostat-Schnitten murinen Gehirns adulter Tiere nach Anleitung des Herstellers (Roche). Bei der Farbreaktion handelt es sich um eine gekoppelte Enzymreaktion. Ein  $\alpha$ -DIG Antikörper ist kovalent mit Meeretichperoxidase verknüpft und wandelt ein chromogenes Substrat in einen unlöslichen Farbstoff um, der an Entstehungsort angereichert wird. Nach abgeschlossener Farbentwicklung im Dunkeln wurden die Präparate mit Kaiser-Gelatine und Deckglas beschichtet und die Außenränder mit handelsüblichem Nagellack versiegelt. Die Betrachtung erfolgte unter einem Mikroskop (Axiophot, Zeiss).

#### **4.7 Synthese von Komplementär-DNA (cDNA)**

Für jede Reaktion wurden im ersten Schritt 500 ng Gesamt RNA mit 13 pmol polyT-Primer in einem Gesamtvolumen von 6  $\mu$ l für 10 min auf 70°C aufgeheizt und dann auf Eis abgekühlt. In Anlehnung an das Herstellerprotokoll wurde jedem Ansatz 2  $\mu$ l Reverse Transkriptase (RT) Puffer, 1  $\mu$ l 0,1 M Dithiothreitol und 0,5  $\mu$ l 10 mM dNTP Mix zugesetzt. Dem Reaktionsansatz wurde 0,5  $\mu$ l Superscript II (Reverse Transkriptase, BRL) hinzugefügt und für 50 min bei 42°C inkubiert. Danach wurde jeder Ansatz zur Inaktivierung des Enzyms für 15 min auf 70°C aufgeheizt. Negativkontrollen für jeden Ansatz wurden entsprechend behandelt jedoch ohne den Zusatz von Reverser Transkriptase. Für eine PCR-Reaktion wurden jeweils 5  $\mu$ l Sense- und Anti-Sense-Primer (10 pmol) mit 5  $\mu$ l eines Reaktionsansatzes unter Zusatz von 2  $\mu$ l dNTP-Mix verwendet. Tabelle 4.2 zeigt die verwendeten Primer Paare. Nach Zugabe von 1 U AmpliTaq Polymerase (Perkin Elmer) wurden 35 Temperaturzyklen wie folgt gefahren:

- 93°C für 0,5 min
- 57°C für 1,0 min
- 72°C für 1,5 min.

Zur Bestätigung der Spezifität der Amplifikation wurden die gereinigten PCR-Produkte sequenziert.

SMOC-1 RT sense	5´-CGTTGGTGTGAAATCACAGC-3´
SMOC-1 RT anti-sense	5´-CATCTTCTTCCCTTCAGGAC-3´
SMOC-2 RT sense	5´-GCTCACGTTCTTGAGAGTCG-3´
SMOC-2 RT anti-sense	5´-TGTAGCTGTGACACTGGACC-3´
Tubulin RT sense	5´-TCACTGTGCCTGAACTTACC-3´
Tubulin RT anti-sense	5´-GGAACATAGCCGTAAACTGC-3´
Poly-T Primer	5´-AAGGATCCGTCGACATCGATAATACGACTCACTATAGGG- ATTTTTTTTTTTTTTTTTN-3´

Tabelle 4.2 Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide für die RT-PCR.

#### 4.8 Southern Blotting

Jeweils 20 µl jeder RT-Reaktion wurden auf einem 2% Agarose Gel in 0,5 x TBE-Puffer (45 mM Tris-Borat, pH 8,5, 1 mM EDTA) elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Anschließend wurde das Gel 30 min in Denaturierungslösung (0,5 M Natriumhydroxid), danach 7 min in Renaturierungslösung (0,5 M Tris-Borat, pH 8,5, 1,5 M NaCl) inkubiert und mittels Kapillarblot über Nacht auf eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham) überführt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 M NaCl, 1% SDS mit einer PCR generierten, spezifischen Sonde, welche wie beschrieben radioaktiv markiert wurde. Zur Entfernung unspezifischer Signale wurde die Membran zweimal für 20 min bei 65°C in 0,1 x SSC gewaschen und dann für 10-15 min auf einen Röntgenfilm exponiert.

#### 4.9 Amplifizierung der Expressionskonstrukte

Die isolierten cDNAs voller Länge wurden als Vorlage für eine Polymerase-Ketten Reaktion (PCR) zur Generierung der Expressionskonstrukte verwendet. Mit der PCR wurden in die Konstrukte zusätzliche Restriktionsschnittstellen am 5´- und am 3´-Ende des Konstruktes eingeführt. Die Reaktionsprodukte wurden über ein 1% Agarose-Gel aufgetrennt, aus diesem mittels eines Extraktions-Kit (Macherey & Nagel) isoliert und nach Anleitung des Herstellers in den Vektor pCR II ligiert. Dieser linearisierte Vektor besitzt an seinen Enden einen Nukleotidüberhang von je einem T, der mit TAQ-Polymerase amplifizierten PCR-Produkten, die einen A-Überhang haben, kompatibel ist. Aus diesem

Plasmid konnten die gewünschten Konstrukte über die eingeführten Restriktionsschnittstellen in den Expressionsvektor pCEP-Pu umkloniert werden.

Oligonucleotid	Restriktionsschnittstelle	Sequenz
SMOC-1 EX sense	Nhe I	5´-GCCCCGCTAGCCCACCGCACCACAGG-3´
SMOC-1 EX anti-sense	Xho I	5´-CAATGACTCTCGAGCTAGACGAGGCGTCCTTC-3´
SMOC-2 EX sense	Nhe I	5´-GCCCCGCTAGCCCAGAAGTTCTCAGCGCTC-3´
SMOC-2 EX anti-sense	Not I	5´-CAATGACTGCGGCCGCTCATCCTTGTTTCCTGGG-3´
Tcan2 FSEND sense	Nhe I	5´-GCCCCGCTAGCCCCCTGCCAGAAGGTGA-3´
Tcan2 FSEND anti-sense	Xho I	5´-CAATGACTGAGCTCCTACCAGATGTAGCCCC-3´
Tcan3 sense	Nhe I	5´-GATCGCTAGCGCTGCCGCGGCGG-3´
Tcan3 anti-sense	Not I	5´-CAATGACTGCGGCCGCTTAAATGTATACAT-3´

Tabelle 4.3 Sequenzen der Oligonukleotide zur Amplifizierung der Expressionskonstrukte.

pCEP-Pu ermöglicht die Proteinexpression in eukaryontischen Systemen, hier in EBNA-293 Zellen. Er wurde um die Nukleotide der Signalpeptidsequenz des BM-40 erweitert und hängt diese N-terminal an zu exprimierende Protein an (Kohfeldt et al. 1997). Während der Reifung im ER wird sie entfernt; jedoch verbleiben die zusätzlichen Aminosäuren APLA im sekretierten Protein. SMOC-1 und Tcan2 FSEND wurden mittels dieses Vektors exprimiert.

Zur leichteren Reinigung der rekombinanten Proteine wurde ein weiterer Vektor auf der Grundlage des pCEP-Pu generiert. Dieser ermöglicht die Affinitätsreinigung der sekretierten Produkte über ein (His)<sub>6</sub>-Motiv. Dieses kann über eine Faktor X-Schnittstelle entfernt werden. Zwischen diesen beiden Motiven besitzt das Expressionsprodukt ein myc Epitop, was die Erkennung durch einen  $\alpha$ -myc-Antikörper ermöglicht. In diesem modifizierten Vektor wurden SMOC-1, SMOC-2 und Testican-3 exprimiert.

#### 4.10 Kultur eukaryotischer Zellen und rekombinante Expression

Zur Expression rekombinanter Proteine wurden geeignete cDNA-Konstrukte in einen Vektor kloniert und dieser in die gewählte Zelllinie transfiziert. Der verwendete Vektor pCEP-Pu, ein für eukaryotische Expressionssysteme geeignetes Plasmid, wird im Gegensatz zu vielen anderen Expressionssystemen nicht stabil in das Genom der transfizierten

eukaryotischen Zellen integriert, sondern liegt episomal in den Zellen vor, was bedeutet, daß der Vektor bei jeder Zellteilung auf die entstehenden Zellen aufgeteilt wird. Dies wird durch das integrierte EBNA-1 Gen (Epstein-Barr nuclear antigen) gewährleistet, ein viraler Genabschnitt, der ein DNA-bindendes Protein kodiert, dessen Bindungsstelle im *oriP*-Bereich des pCEP-Pu liegt. Das EBNA-1 Gen ist sowohl in den Vektor als auch in das Genom der EBNA 293-Zellen integriert und garantiert so eine hohe Expressionsrate. Die Bindung des EBNA-1 spielt eine wichtige Rolle bei der Replikation des Vektors und ist essentiell für eine stabile Verteilung der episomalen Vektoren auf sich teilende Zellen. Darüberhinaus kann es die Transkription verstärken (Yates et al., 1985). Das Plasmid pCEP-Pu trägt Resistenzgene für Ampicillin und Puromycin. Das integrierte BM-40 Signalpeptid sorgt für eine effektive Sekretion der exprimierten Proteine.

#### **4.10.1 Handhabung von EBNA 293-Zellen**

Bei den EBNA-293 Zellen handelt es sich um eine humane embryonale Nierenzelllinie, in deren Genom das EBNA-1 Gen integriert wurde. Sie wachsen adherent und tragen eine Geneticin (G418)-Resistenz als Selektionsmarker. HT1080 Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen kultiviert, jedoch bei jeweils der Hälfte der für ENBA-293 Zellen angegebenen Antibiotika-Konzentrationen.

#### **4.10.2 Inkubationsbedingungen**

Die Zellen werden auf 10 cm Gewebekulturschalen (Falcon) bei 37°C unter wassergesättigter Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> in einem Begasungsbrutschrank kultiviert.

#### **4.10.3 Zellkulturmedium**

Zur Kultivierung der Zellen wurde DMEM F-12 Medium (Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium) mit einem 10% Zusatz von FCS (beides von Gibco, BRL) verwendet. Auf 500 ml Medium wurden folgende Substanzen zugefügt:

Glutamin (200 mM, Gibco)	5 ml
Geneticin (50 mg/ml, Gibco, BRL)	3,5 ml

Je nach Dichte der Zellen wurde das Medium alle 2-3 Tage abgesaugt und 10 ml frisches Medium zugegeben.

#### 4.10.4 PBS (Phosphate buffered saline)

PBS diene als Wasch- und Verdünnungspuffer. Es handelt sich um einen isotonischen Puffer mit physiologischem pH.

Zusammensetzung: 140 mM NaCl, 10 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4.

#### 4.10.5 Umsetzen der Zellen

EBNA-293 Zellen wachsen nur im Einzellagen adhärent. Deshalb wurden die Zellen konfluent bewachsener Kulturschalen enzymatisch abgelöst und auf mehrere frische Schalen aufgeteilt. Nach dem Absaugen des serumhaltigen Mediums wurden die Zellen mit 3 ml PBS gewaschen und dann 3 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung in PBS (10fach-Stocklösung mit 0,5 g Trypsin/0,2 g EDTA, Gibco) etwa 5 min bei 37°C inkubiert. Die Trypsinaktivität wurde dann durch Zugabe von serumhaltigem Medium gestoppt und die Zellen zu gleichen Teilen auf frische Schalen verteilt.

#### 4.10.6 Transfektion durch Elektroporation

Um eukaryotische Zellen mit einem Expressionsvektor zu transfizieren, kann man sie kurzzeitig einer elektrischen Spannung aussetzen, welche dafür sorgt, daß sich vorübergehend kleine Poren in der Zellmembran bilden, über welche die DNA in die Zelle eindringen kann. Dazu werden die Zellen einer Zellkulturschale wie beschrieben trypsinisiert, in frischem Medium resuspendiert und bei 1000 upm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in 10 ml Medium, welches 25 mM NaCl enthält, resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wird ein Aliquot in einer Neubauerkammer ausgezählt. Ein Transfektionsansatz enthält:

EBNA-293 Zellen	5 x 10 <sup>5</sup> Zellen
DMEM F-12 Medium mit 25 mM NaCl	ad 800 µl
DNA	3 µg

Das Gemisch wird luftblasenfrei in eine Elektroporationsküvette überführt. Es folgt eine Inkubation für 5 min bei RT. Die eigentliche Elektroporation erfolgte in einem Gene Pulser II (Bio-Rad, Hercules) unter folgenden Bedingungen:

Kapazität	500µF
Stromstärke	230 V/0,4 cm <sup>2</sup>

Nach weiteren 5 min bei RT werden die transfizierten Zellen erneut ausplattiert.

### **4.10.7 Selektion transfizierter Zellen**

48 h nach der Elektroporation wird die Selektion der Zellen begonnen. Dazu wird dem F-12 Medium, zusätzlich zum G-418, Puromycin (1 µg/ml) zugesetzt. Die transfizierten Zellen sollten diese Behandlung, nach Aufnahme der Puromycinresistenz über den pCEP-Pu Vektor, überleben. Anfangs muß das Medium häufig erneuert werden, da sterbende Zellen und Zelltrümmer das Wachstum der resistenten Zellen nachteilig beeinflussen. Nach 14-21 Tagen ist die Selektion abgeschlossen und die resistenten Zellen können in serumfreiem Medium kultiviert werden. Nach der Ernte wird dem Medium 1 mM PMSF als Protease-Inhibitor zugesetzt. Die Lagerung erfolgt bei -20° C.

## **4.11 Proteinchemische Arbeiten**

### **4.11.1 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 die verschiedenen Matrices und können durch eine geeignete Kombination verschiedener Methoden zur Homogenität gereinigt werden.

Vor Beginn der Reinigung wurden alle serumfreien Mediumüberstände gegen den benötigten Puffer dialysiert, abzentrifugiert (10.000 rpm, 20 min) und zusätzlich filtriert um alle eventuell vorhandenen Schwebstoffe zu entfernen. Während dieser Schritte enthielt das Medium zusätzlich 1 mM PMSF als Proteaseinhibitor.

### **4.11.2 Ionenaustausch-Chromatographie**

Abhängig von ihrer Nettoladung und dem pH-Wert können Proteine unterschiedlich stark an Ionentauscher binden. Der Vorteil einer großen Bindungskapazität auch bei kleinen Matrixmengen machen die Ionentauscher zur ersten Wahl um eine Proteinreinigung zu beginnen. Die Elution erfolgt mit einem aufsteigenden linearen Salzgradienten.

Bei der Reinigung von SMOC-1 aus EBNA-293 Zellen wurde am Anfang eine SP-Sepharose Matrix verwendet. Es handelt sich um einen Kationenaustauscher. Als Puffer diente 50 mM Natriumacetat, pH 5,0. Die Matrix befand sich in einer Säule vom Typ XK 26 (Durchmesser 2,6 cm; Länge 40 cm, Pharmacia), die nach Herstellerangaben gepackt wurde und vor Benutzung äquilibriert wurde. Anschließend wurde das serum-freie Medium auf die Säule geladen (2 ml/min), mit Puffer gewaschen und mit einem Salzgradienten (0-1 M NaCl) eluiert. Dabei wurden Aliquots von 5 ml aufgefangen. Alle Chromatographieschritte erfolgten bei 4° C.

#### **4.11.3 Gelfiltration**

Bei der Gelfiltration werden Proteine der Größe nach aufgetrennt, wobei kleine Proteine langsamer wandern, da sie in die Matrix eindringen können und somit länger auf der Säule verweilen. Die Kapazität einer Gelfiltrationssäule hängt von ihrem Durchmesser ab und ist begrenzt (Probenvolumen maximal 5 % des Säulenvolumens). Die Qualität der Trennung hängt dagegen von der Länge der Säule ab. Klassische Gelfiltrationssäulen werden mit geringen Flußraten betrieben.

Im Falle von SMOC-1 aus EBNA-293 Zellen wurde im zweiten Reinigungsschritt eine Sephadex G-75 Matrix in einer Säule vom Typ XK 16 (Durchmesser 1,6 cm; Länge 100 cm; Pharmacia) verwendet, die nach Herstellerangaben gepackt war. Als Laufpuffer diente 50 mM Natriumacetat, pH 5,0 mit 150 mM NaCl um unspezifische Wechselwirkungen zu unterdrücken. Die Flußgeschwindigkeit betrug 12 ml/min und es wurden Fraktionen zu 2 ml gesammelt.

#### **4.11.4 FPLC (Fast Performance Liquid Chromatographie)**

Bei der FPLC handelt es sich um eine Methoden, bei der sich hohe Drücke und Flußraten erzielen lassen. Es werden vorgepackte Säulen verwendet. Zum Einsatz kamen die Säulen vom Typ ResourceS (Kationentauscher) und ResourceQ (Anionentauscher) der Firma Pharmacia. Als Puffer diente 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 (ResourceQ) bzw. 50 mM Natriumacetat, pH 5,0 (ResourceS). Die Elution erfolgte mit einem linearen Salzgradienten unter Verwendung des jeweiligen Puffers. Die Fraktionsgrößen betragen je 1 ml.

#### **4.11.5 Affinitätsreinigung mittels Histidinmotiv**

Konstrukte, die in der N-terminalen Region ein His6-Motiv, ein myc-Epitop und eine Faktor X-Schnittstelle, konnten über eine Affinitätschromatographie an Ni-NTA (Qiagen) oder alternativ an Talon-Matrix (Clontech) gereinigt werden. Eine Säule wurde mit 10 ml Matrix nach Angaben des Herstellers gepackt. Für beiden Matrices gibt es unterschiedliche Regenerationsprotokolle, bei denen die Ni-NTA Matrix erneut mit Ni-Ionen beladen wird, während die Talon-Matrix bei einem pH-Wert von 2,0 gereinigt wird.

Vor der Affinitätsreinigung über die genannten Materialien müssen die serum-freien Mediumüberstände gegen 50 mM Natriumphosphat, pH7,4, 300 mM NaCl dialysiert werden. Das vorbereitete Medium wird dann mittels Peristaltikpumpe auf die Säule geladen (1 ml/min) und die Matrix mit dem Phosphatpuffer nachgewaschen. Die Elution erfolgt über einen linearen Imidazolgradienten (0-250 mM in Phosphatpuffer). Das Prinzip beruht auf der Verdrängung des Histidin-Motivs durch das Imidazol. Es wurden Fraktionen zu je 5 ml gesammelt.

#### **4.12 Allgemeine proteinchemische Verfahren**

Zur Konzentrierung von Proteinen, z.B. aus serum-freien Mediumüberständen, wurde die TCA- (**T**richlor**a**ccetat) Fällung angewendet. 1 ml der zu fällenden Probe wird mit 10 µl 10% Triton-Lösung und anschließend mit 250 µl 50% wäßriger TCA-Lösung versetzt und nach inniger Vermischung für 15 min auf Eis gelagert. Dann werden die Proteine in der Zentrifuge bei 21000 g, 4° C für 15 min pelletiert. Der Überstand wird verworfen; das Pellet mit 1 ml eiskalten Aceton gewaschen und erneut zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in reduzierendem Ladepuffer (62 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2 % SDS, 0,1 % Bromphenolblau, 10 % Glycerol, 2 % β-Mercaptoethanol) aufgenommen und 1 min bei 95° C denaturiert. Für Proben unter nicht-reduzierenden Bedingungen wurde der gleiche Ladepuffer ohne β-Mercaptoethanol verwendet.

#### **4.12.1 SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) und Proteinfärbung**

Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach der Methode von Laemmli (1970) auf Polyacrylamidgelen verschiedener Konzentrationen unter reduzierenden bzw. nicht-reduzierenden Bedingungen. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte durch Färbung mit Coomassie-Brilliant Blue oder Silbernitrat.

Für die Coomassie Färbung wurde das Gel etwa 1 h in Färbelösung (0,125 % Coomassie Brilliant Blue R250 in 50 % Methanol, 5 % Essigsäure) geschwenkt und anschließend in die Entfärbelösung (70 % Methanol, 10 % Essigsäure) überführt. Diese wurde erneuert, bis die gewünschte Intensität der Färbung erreicht war. Die Aufbewahrung der gefärbten Gele erfolgte in 7 % Essigsäure. Die Nachweisgrenze der Coomassie Färbung liegt bei 0,1 µg Protein. Die Färbung mit Silber erlaubt den Nachweis von 0,1 ng Protein. Sie beruht auf der Reduktion von Silberionen zu metallischen Silber durch schwefelhaltige und basische Aminosäurereste. Alle Silberfärbungen beinhalten eine Fixierung der Proteinbanden im Gel durch Essigsäure, gefolgt von einer Behandlung mit Glutaraldehyd und einer Silbersalzlösung. Die Entwicklung erfolgt durch Inkubation in einer Natriumcarbonatlösung (Westermeier, 1990; Dunn, 1993).

#### **4.12.2 Analyse der N-Glycosylierung von Proteinen**

Zur Entfernung der N-gebundenen Zucker wurde je 1 µg Protein mit 1 U N-Glycosidase F (Roche) in 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 für 2 h bei 37° C inkubiert. Eine Kontrolle wurde ohne Enzymzugabe gleich behandelt.

#### **4.12.3 Immunoblotverfahren**

Beim Immuno- oder Westernblot handelt es sich um eine sensitive Methode zur Detektion von Proteinen. Dazu werden die Proben entweder mechanisch aus einer Lösung (Slot-Blot) oder elektrophoretisch aus einem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran NC, Schleicher & Schüll) übertragen. Für die Slot-Blots wird eine passende NC-Membran in die Apparatur (Hoefer) eingespannt, die Proben (meist 100 ng Protein in ca. 200 µl Lösung) in die vorgesehenen Öffnungen pipetiert und für einige Minuten ein Vakuum angelegt. Die weitere Entwicklung erfolgt analog zum Immunoblot.

Für den Immunoblot wurden die Proteine elektrophoretisch (400 mA, 1 h oder 100 mM, über Nacht) in einer Blotkammer (Transphor Electrophoresis Unit, Hoefer, Pharmacia Biotech Inc.) bei 4° C auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Als Puffer dient ein Boratpuffer (50 mM, pH 8,5) der zusätzlich 10 % Methanol enthält.

Zur Kontrolle wird die Membran mit einer 10 %-igen Ponceau S Lösung gefärbt, die Markerbanden werden mit Bleistift markiert und der Farbstoff durch Inkubation in TBS, 0,01 % Tween 20 entfernt. Um unspezifische Bindung der verwendeten Antikörper in den nächsten Schritten zu vermeiden, wird die Membran durch Schwenken in TBS; 5 % Milchpulver blockiert. Anschließend wird die Membran für 1 h mit dem ersten Antikörper/Antiserum, der spezifisch das gewünschte Protein erkennt, meist in Verdünnungen zwischen 1:100 bis 1:2000 inkubiert. Es folgen mehrere Waschsritten mit TBS/0,01 % Tween 20 um überschüssiges, nicht-spezifisch gebundenes Antiserum zu entfernen. Im letzten Schritt folgt die Inkubation für 1 h in 5 % Milchpulver/TBS mit einem enzymgekoppelten Zweitantikörper, der den Fc-Teil des ersten Antikörpers erkennt. Nach erneutem gründlichen Waschen mit TBS/ 0,01 % Tween 20 werden die Proteinbanden mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Hierzu diente das ECL- (enhanced chemoluminescence) Kit nach Anleitung des Herstellers (Amersham). Die ausgesendeten Lichtsignale wurden auf einem Röntgenfilm exponiert und dieser entwickelt.

#### 4.12.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung gereinigter Proteine erfolgte auf photometrischem Weg durch Messung der UV-Spektren über einen Wellenlängenbereich von 240-350 nm. Die Berechnung erfolgte unter Benutzung des Extinktionswertes bei 280 nm korrigiert um den Wert bei 320 nm um eventuell vorhandene Trübungen zu erfassen. Die verwendeten theoretischen Extinktionskoeffizienten der Proteine sind in Tabelle 4.x zusammengefaßt.

Protein	Extinktionskoeffizient [l/mol x cm]
SMOC-1	36840
SMOC-2	10810
SMOC-2 (degradiert)	36840
Testican-2 FSEND	48790
Testican-3	69130

Tabelle 4.4 **Theoretische Extinktionskoeffizienten der rekombinant exprimierten Proteine.**

### **4.13 Affinitätsreinigung von polyklonalem Serum**

Zur Reinigung spezifischer Antikörper aus polyklonalen Seren wurde eine CNBr-Sephrose Matrix (Amersham) verwendet. 150 mg des Materials wurden zur Aktivierung in 500 µl 1 mM HCl für einige Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Material für 1 min bei 1000 upm in der Zentrifuge sedimentiert. Dieser Schritt wurde fünfmal wiederholt. 500 µg des gereinigten und gegen den Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl) dialysierten Proteins wurde dann in einem Gesamtvolumen von 2,5 ml mit der aktivierten Matrix über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurde die vom Überstand befreite Matrix dann für 4 h bei Raumtemperatur mit 1 M Tris, pH 8,0 behandelt. Anschließend wäscht man die Matrix jeweils dreimal mit 0,1 M Natriumacetat, pH 4,0 und 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 M NaCl.

5 ml des polyklonalen Serums wurden für 1 h bei 15000 upm abzentrifugiert, mit 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 auf 50 ml aufgefüllt und bei 4°C über Nacht mit der proteinbeladenen Matrix inkubiert. Nach Zentrifugation wurde die Matrix zum Entfernen unspezifisch gebundener Antikörper jeweils fünfmal mit 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 und 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,5 M NaCl gewaschen. Die Elution der Antikörper erfolgt durch mehrfache Zugabe von jeweils 750 µl 3 M KSCN. Die einzelnen Fraktionen wurden sofort gegen TBS dialysiert und photometrisch vermessen.

### **4.14 Paraffineinbettung von Mausegeweben**

Frisch präparierte Mausegewebe wurden für 1 h in 4% Paraformaldehydlösung fixiert. Zur Entwässerung wurden die Gewebe dann durch eine Alkoholreihe geführt. Dazu wurden sie je 1,5 h in 50%, 70% und 96% Ethanol und dann dreimal je 1,5 h in 100% Ethanol überführt. Es folgten weitere Inkubationen in Methylbenzoat (über Nacht, dann zweimal 1 h) und Xylol (dreimal 30 min). Die so vorbereiteten Gewebe wurden bei 65°C mit flüssigem Paraffin behandelt, wobei das Paraffin solange gewechselt wurde bis kein Xylolgeruch mehr wahrgenommen werden konnte. Zur endgültigen Einbettung wurden die Gewebe dann in Einwegplastik-Cubes mit flüssigem Paraffin überführt, ausgerichtet und zur Aushärtung bei 4°C belassen. Von den so eingebetteten Geweben wurden Mikrotomschnitte von 10 µm Stärke angefertigt. Diese wurden nach dem Strecken im 40°C Wasserbad auf histologische Objektträger (Shannon) aufgezogen und zum Trocknen über Nacht bei 37°C belassen.

#### **4.15 Entparaffinierung und Immunfärbung von Paraffinschnitten**

Zur Entparaffinierung wurden die Gewebeschnitte im Wasserbad bei 50°C wie folgt behandelt :

- 2x 10 min Rotihistol
- 2x 8 min Isopropanol
- 3 min 96% Ethanol
- 3 min 70% Ethanol
- 3 min 50% Ethanol.

Anschließend wurden die Schnitte für 5 min in TBS inkubiert. Entparaffinierte Schnitte wurden mit einem Spezialstift (DAKO Pen) hydrophob umrandet. Alle weiteren Schritte erfolgten in Glasküvetten oder in einer feuchten Kammer. Um eine gute Gewebzuganglichkeit zu erreichen wurden die Schnitte zuerst für 30 min bei 37°C einem Hyaluronidaseverdau unterzogen (1,5 mg/ml, PBS, pH 5,2) und anschließend für 8 min bei 37°C einem Verdau mit Proteinase K (5 µg/ml, 10mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA). Die so behandelten Schnitte wurden zum Pufferwechsel 5 min in PBS inkubiert und dann für 5 min mit 4% Paraformaldehyd in PBS erneut fixiert. Nach zweimaligem Waschen für jeweils 10 min in TBS erfolgt eine Blockierung der Schnitte für 60 min in 1% BSA/TBS. Die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper, welcher in der Blockierungslösung verdünnt wurde, erfolgte bei 4°C über Nacht. Die Schnitte wurden viermal für je 10 min in TBS gewaschen und erneut für 15 min blockiert (1% BSA/TBS). Es folgte die Behandlung mit dem Sekundärantikörper (Cy-3 markiertes anti-Kaninchen IgG, DAKO) für 60 min. Nach erneutem waschen (viermal 5 min TBS) wurden die Schnitte zum Schutz vor übermäßigem Ausbleichen mit DAKO Mount mit Deckgläsern versiegelt.

#### **4.16 Inhibitionsversuche auf Gewebeschnitten**

Zur Untersuchung der Spezifität des SMOC-1 Antiserums auf Gewebeschnitten, wurde die Arbeitsverdünnung (1:1000) mit einem Aliquot der SMOC-1 gekoppelten CNBr-Sepharose für 2 h inkubiert und der Überstand nach Zentrifugation für die Inkubation auf Ovarienschnitten verwendet. Für die Inhibitionsversuche auf dem Immunoblot wurde die Antikörperverdünnung mit 20 µg rekombinantem SMOC-1 inkubiert, abzentrifugiert und für die Entwicklung des Blots eingesetzt.

#### 4.17 Immunfluoreszenzfärbung von Maus Oocyten

Aus superovulierten Mäusen wurden die Oocyten durch Sektion des Oviducts herauspräpariert. Zur Entfernung der umgebenden Cumulus Zellen wurden diese für 15 min mit Hyaluronidase behandelt (1,5 mg/ml, PBS, pH 5,2). Die isolierten Oocyten wurden für 5 min in 4 % Paraformaldehyd/PBS fixiert und dreimal mit PBS/5 % Ziegenserum (NGS: normal goat serum) gewaschen. Anschließend wurde ein Teil der Oocyten für 5 min mit Detergenzlösung (PBS/0,1 % Tween 20) behandelt. Nach dreimaligem Waschen in PBS/5 % Ziegenserum wurden alle Oocyten für 2 h in der gleichen Lösung blockiert. Es folgte die Inkubation über Nacht mit dem SMOC-1 Antiserum (1:500 in PBS/ 5 % NGS). Eine Kontrolle wurde nur mit der Blocklösung inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Oocyten dreimal für je 1 h mit PBS/5 % NGS gewaschen und nach erneutem Wechsel des Waschpuffers in diesem über Nacht belassen. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper (Cy-3  $\alpha$ -Kaninchen, DAKO, 1:1000 in Blocklösung) erfolgte für 2 h. Anschließend wurde mehrfach gewaschen und die Oocyten unter einem Konfokalen-Laserscanning Mikroskop (Leica) betrachtet und fotografiert.

Für den Immunoblot wurden zwischen 300 und 400 Oocyten aus superovulierten Mäusen isoliert, in reduzierendem Probenpuffer aufgenommen und in einer 12 % SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt.

#### 4.18 Circular Dichroismus (CD) Spektroskopie

Circular Dichroismus ist eine Methode um die Sekundärstruktur eines Proteins in Lösung zu messen. Linear polarisiertes Licht kann als Überlagerung eines rechts und eines links drehenden polarisierten Lichtstrahles beschrieben werden. Beim Durchdringen einer optisch aktiven Substanz werden diese um verschiedene Winkel gedreht und unterschiedlich absorbiert. Das austretende Licht kann als elliptisch polarisiert beschrieben werden. Die molare Elliptizität  $[\Theta]_{\lambda}$  ist ein Maß für die unterschiedliche Schwächung des rechts und links zirkular polarisierten Lichtes beim Durchtritt durch die chirale Verbindung. Jeder Sekundärstrukturanteil bringt einen eigenen Anteil in das CD-Spektrum eines Proteins ein. Unter Verwendung verschiedener Algorithmen kann man aus der molaren Elliptizität die Anteile an  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt, Schleifen und ungeordneter Struktur (random coil) eines Proteins abschätzen. Darüberhinaus kann man konformelle Übergänge eines Proteins verfolgen.

Die Aufzeichnung aller CD-Spektren erfolgte auf einem JASCO 715 CD-Spektrometer (JASCO Corporation, Tokio, Japan) in thermostatierten Quarz-Küvetten bei 25° C. Die Schichtdicke der Küvetten betrug 1 mm. Soweit nicht anders erwähnt befanden sich die Proteine in 5 mM Tris-HCl, pH 7,4. Die Spektren wurden über einen Bereich von 197-250 nm mit einer Geschwindigkeit von 50 nm/min und einer Response-Zeit von 0,125 s aufgezeichnet. Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses, wurden je fünf Spektren akkumuliert. Die dargestellten Spektren wurde mit der geräteeigenen Software geglättet. Zur Sättigung der Proteine mit Calcium wurden 2 mM CaCl<sub>2</sub> zugegeben. Zur Messung der Calcium-freien Form wurden 4 mM EDTA zugefügt.

Zur Berechnung der molaren Elliptizität wurde von Proteinspektrum das Spektrum des reinen Puffer subtrahiert. Der durch die Zugabe von Calcium oder EDTA entstandene Verdünnungseffekt wurde durch Korrekturfaktoren ausgeglichen. Ausgehend von einem mittleren Molekulargewicht einer Aminosäure von M=110 g/mol wurde die molare Elliptizität [deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>] wie folgt berechnet:

$$[\Theta] = \frac{\Theta * M}{c * d}$$

Θ: gemessene Elliptizität [mdeg]

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

c: Proteinkonzentration [mg/ml]

d: Schichtdicke der Küvette [mm]

Die Berechnung der Sekundärstrukturanteile erfolgte unter Verwendung der Programme Contin und Selcon (Greenfield, 1996).

## V. Literatur

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

Antanitus, D.S. (1999) A Theory of Cortical Neuron-Astrocyte Interaction. *Neuroscientist* **4**, 154-159.

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

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

Aumailley, M. und Smyth, N. (1998) The role of laminins in basement membrane function. *J. Anat.* **193**, 1-21.

Aumailley, M., Wiedeman, H., Mann, K. und Timpl, R. (1989) Binding of nidogen and the laminin-nidogen complex to basement membrane collagen type IV. *Eur. J. Biochem.* **184**, 241-248.

Babcock, D.F., Herrington, J., Goodwin, P.C., Park, Y.B. und Hille, B. (1997) Mitochondrial participation in the intracellular Ca<sup>2+</sup> network. *J. Cell. Biol.* **136**, 833-844.

Bantlow, C.E. und Zimmermann, D.R. (2000) Proteoglycans in the Developing Brain: New Conceptual Insights for Old Proteins. *Physiol. Rev.* **80**, 1267-1290.

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

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

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

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

Bleil, J.D. und Wassarman, P.M. (1980a) Synthesis of zona proteins by denuded and follicle-enclosed mouse oocytes during culture in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 1029-1033.

Bleil, J.D. und Wassarman, P.M. (1980b) Structure and Function of the Zona Pellucida: Identification and Characterization of the Mouse Oocyte's Zona Pellucida. *Dev. Biol.* **76**, 185-202.

Bode, W. und Huber, R. (1991) Natural protein proteinase inhibitors and their interactions with proteinases. *Eur. J. Biochem.* **204**, 347-350.

- Bolander, M.E., Young, M.F., Fisher, L.W., Yamada, Y. und Termine, J.D. (1988) Osteonectin cDNA sequence reveals potential binding regions for calcium and hydroxyapatite and shows homologies with both a basement membrane protein (SPARC) and a serine proteinase inhibitor (ovomucoid) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2919-2923.
- Bonnet, F., Périn, J.P., Charbonnier, F., Camuzat, A., Roussel, G., Nussbaum, J.L. und Alliel, P.M. (1996) Structure and Cellular Distribution of Mouse Brain Testican. *J. Biol. Chem.* **271**, 4373-4380.
- Bonnet, F., Périn, J.P., Maillet, P., Jolles, P. und Alliel, P.M. (1992) Characterisation of a human seminal plasma glycosaminoglycan-bearing polypeptide. *Biochem. J.* **288**, 565-569.
- Bork, P., Downing, K.A., Kieffer, B. und Campbell, I.D. (1996) Structure and distribution of modules in extracellular proteins. *Q. Rev. Biophys.* **29**, 119-167.
- Brown, E.M., Vassilev, P.M. und Hebert, S.C. (1995) Calcium Ions as Extracellular Messengers. *Cell* **83**, 679-682.
- Busch, E., Hohenester, E., Timpl, R., Paulsson, M. und Maurer, P. (2000) Calcium Affinity, Cooperativity, and Domain Interactions of Extracellular EF-hands Present in BM-40. *J. Biol. Chem.* **275**, 25508-25515.
- Charbonnier, F., Chanoine, C., Cifuentes-Diaz, C., Gallien, C.L., Rieger, F., Alliel, P.M. und Périn, J.P. (2000) Expression of the proteoglycan SPOCK during mouse embryo development. *Mech. Dev.* **90**, 317-321.
- Charbonnier, F., Périn, J.P., Mattei, M.G., Camuzat, A., Bonnet, F., Gressin, L. und Alliel, P.M. (1998) Genomic Organization of the Human SPOCK Gene and Its Chromosomal Localization to 5q31. *Genomics* **48**, 377-380.
- Chazin, W.J. (1995) Releasing the calcium trigger. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 707-710.
- Celio, M.R., Pauls, T. und Schwaller, B. (Eds.) *Guidebook to the calcium-binding proteins*. Oxford University Press, 1996.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Cifuentes-Diaz, C., Alliel, P.M., Charbonnier, F., De La Porte, S., Molgó, J., Goudou, D., Rieger, F. und Périn, J.P. (2000) Regulated expression of the proteoglycan SPOCK in the neuromuscular system. *Mech. Dev.* **94**, 277-282.
- Davie, E.W., Fujikawa, K. und Kisiel, W. (1991) The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation. *Biochemistry* **30**, 10363-10367.
- Deák, F., Wagener, R., Kiss, I. und Paulsson, M. (1999) The matrilins: a novel family of oligomeric extracellular matrix proteins. *Matrix Biol.* **18**, 55-64.
- Dhanaraj, V., Ye, Q.-Z., Johnson, L.L., Hupe, D.J., Ortwine, D.F., Dunbar, J.B., Jr., Rubin, J.R., Pavlowsky, A., Humblet, C. und Blundell, T.L. (1996) X-ray structure of a hydroxamate inhibitor complex of stromelysin catalytic domain and its comparison with members of the zinc metalloproteinase superfamily. *Structure* **4**, 375-386.

- Denault, J.-B. und Leduc, L. (1996) Furin/PACE/SPC1: a convertase involved in exocytic and endocytic processing of precursor proteins. *FEBS Letters* **379**, 113-116.
- Dunbar, B.S., Avery, S., Lee, V., Prasad, S., Schwahn, D., Schwoebel, E., Skinner, S. und Wilkins, B. (1994) The Mammalian Zona Pellucida: ist Biochemistry, Immunochemistry, Molecular Biology, and Developmental Expression. *Reprod. Fertil. Dev.* **6**, 331-347.
- Dunn M.J. (1993) *Gel Electrophoresis: Proteins*. BIOS, Oxford.
- Dziadek, M., Paulsson, M., Aumailley, M. und Timpl, R. (1986) Purification and tissue distribution of a small protein (BM-40) extracted from a basement membrane tumor. *Eur. J. Biochem.* **161**, 455-464.
- Eckenhoff, R.G. (1989) Perinatal changes in lung surfactant calcium measured in situ. *J. Clin. Invest.* **84**, 1295-1301.
- Edwards, G.M., Wilford, F.H., Liu, X.W., Henninghausen, L., Djiane, J. und Streuli, CH. (1998) Regulation of mammary differentiation by extracellular matrix involves protein-tyrosine phosphatases. *J. Biol. Chem.* **273**, 9495-9500.
- Ekblom, P. (1981) Formation of basement membranes in the embryonic kidney: an immunohistological study. *J. Cell Biol.* **91**, 1-10.
- Ekblom, P., Alitalo, K., Vaheri, A., Timpl, R. und Saxen, L. (1980) Induction of a basement membrane glycoprotein in embryonic kidney: possible role of laminin in morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **77**, 485-489.
- Engel, J., Taylor, W., Paulsson, M., Sage, H. und Hogan, B. (1987) Calcium binding domains and calcium-induced conformational transition of SPARC/BM-40/osteonectin, an extracellular glycoprotein expressed in mineralized and nonmineralized tissues. *Biochemistry* **26**, 6958-6965.
- Engel, J., Odermatt, E., Engel, A., Madri, J.A., Furthmayr, H., Rohde, H. und Timpl, R. (1981) Shapes, domain organisations and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix. *J. Mol. Biol.* **150**, 97-120.
- Esch, F.S., Shimasaki, S., Mercado, M., Cooksey, K., Ling, N., Ying, S., Ueno, N. und Guillemin, R. (1987) Structural characterization of follistatin: a novel follicle-stimulating hormone release-inhibiting polypeptide from gonad. *Mol. Endocrinol.* **1**, 849-855.
- Evenäs, J., Malmendal, A. und Forsén, S. (1998) Calcium. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 293-302.
- Findlay, D.M., Fisher, L.W., McQuillan, C.I., Termine, J.D. und Young, M.F. (1988) Isolation of the osteonectin gene: evidence that a variable region of the osteonectin molecule is encoded within one exon. *Biochemistry* **27**, 1483-1489.
- Finnegan, D.J. (1989) Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends. Genet.* **5**, 103-107.
- Fosang, A.J. und Hardingham, T.E. (1996) *Matrix Proteoglycans. Extracellular Matrix, Vol. 2*, Edit. W.D. Comper, Harwood Academic Publishers GmbH.

- Funk, S.E. und Sage, E.H. (1991) SPARC modulates cell cycle progression in bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2648-2652.
- Funk, S.E. und Sage, E.H. (1993) Differential effects of SPARC and cationic SPARC peptides on DNA synthesis by endothelial cells and fibroblasts. *J. Cell Physiol.* **154**, 53-63.
- Garwood, J., Schnädelbach, O., Clement, A., Schütte, K., Bach, A. und Faissner, A. (1999) DSD-1-Proteoglycan is the mouse homolog of phosphacan and displays opposing effects on neurite outgrowth dependent on neuronal lineage. *J. Neurosci.* **19**, 3888-3899.
- Genini, M., Schwalbe, P., Scholl, F.A. und Schäfer, B.W. (1996) Isolation Of Genes Differentially Expressed in Human Primary Myoblasts And Embryonal Rhabdomyosarcoma. *Int. J. Cancer* **66**, 571-577.
- Gilmour, D.T., Lyon, G.J., Carlton, M.B.L., Sanes, J.R., Cunningham, J.M., Anderson, J.R., Hogan, B.L.M., Evans, M.J. und Colledge, W.H. (1998) Mice deficient for the secreted glycoprotein SPARC/osteonectin/BM-40 develop normally but show severe age-onset cataract formation and disruption of the lens. *EMBO J.* **17**, 1860-1870.
- Göhring, W., Sasaki, T., Heldin, C.-H. und Timpl, R. (1998) Mapping of the binding of platelet-derived growth factor to distinct domains of the basement membrane proteins BM-40 and perlecan and distinction from the BM-40 collagen-binding epitope. *Eur. J. Biochem.* **225**, 60-66.
- Greenfield, N.J. (1996) Methods to Estimate the Conformation of Proteins and Polypeptides from Circular Dichroism Data. *Anal. Biochem.* **235**, 1-10.
- Greve, J.M. und Wassarman, P.M. (1985) Mouse Egg Extracellular Coat is a Matrix of Interconnected Filaments Possessing a Structural Repeat. *J. Mol. Biol.* **181**, 253-264.
- Gubler, U. und Hoffman, B.J. (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* **25**, 263-269.
- Guermah, M., Christani, P., Langier, D., Dezelee, P., Bidou, L., Pessac, B. und Calothy, G. (1991) Transcription of a quail gene expressed in embryonic retinal cells is shut off sharply at hatching. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 4503-4507.
- Guncar, G., Pungercic, G., Klemencic, I., Turk, V. und Turk, D. (1999) Crystal structure of MHC class II-associated p41 li fragment bound to cathepsin L reveals the structural basis for differentiation between cathepsin L and S. *EMBO J.* **18**, 793-803.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**, p557-80.
- Hartmann, U. und Maurer, P. (2001) Proteoglycans in the nervous system - the quest for functional roles in vivo. *Matrix Biol.* submitted.
- Hasselar, P., Loskutoff, D.J., Sawdey, M. und Sage, E.H. (1991) SPARC induces the expression of type I plasminogen activator inhibitor in cultured bovine aortic cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 13178-13184.

- Heinemann, U., Lux, H.D. und Gutnick, M.J. (1977) Extracellular free calcium and potassium during paroxysmal activity in the cerebral cortex of the cat. *Exp. Brain Res.* **27**, 237-243.
- Hemmati-Brivanlou, A., Kelly, O.G. und Melton, D.A. (1994) Follistatin, an antagonist of activin is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell* **77**, 4511-4517.
- Hennings, H., Michael, D., Cheng, D., Steinert, P., Holbrook, K. und Yuspa, S.H. (1980) Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* **19**, 245-254.
- Herndon, M.E. und Lander, A.D. (1990) A diverse set of developmentally regulated proteoglycans is expressed in the rat central nervous system. *Neuron*, **4**, 949-961.
- Hohenadl, C., Mann, K.H., Mayer, U., Timpl, M., Paulsson, M. und Aeschlimann, D. (1995) Two Adjacent N-terminal Glutaminases of BM-40 (Osteonectin, SPARC) Act as Amine Acceptor Sites in Transglutaminase-Catalysed Modification. *J. Biol. Chem.* **270**, 23415-23420.
- Hohenester, E., Maurer, P., Hohenadl, C., Timpl, R., Jansonius, J.N. und Engel, J. (1996) Structure of a novel extracellular Ca<sup>2+</sup>-binding module in BM-40. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 67-73.
- Hohenester, E., Maurer, P. und Timpl, R. (1997) Crystal structure of a pair of follistatin-like and EF-hand calcium-binding domains in BM-40. *EMBO J.* **16**, 3778-3786.
- Inouye, S., Ling, N. und Shimasaki, S. (1991) Site-specific mutagenesis of human follistatin. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **179**, 352-358.
- Johnston, I.G., Paladino, T., Gurd, J.W. und Brown, I.R. (1990) Molecular cloning of SC-1: a putative brain extracellular matrix glycoprotein showing partial similarity to osteonectin/BM-40/SPARC. *Neuron* **2**, 165-176.
- Kallunki, P., Sainio, K., Eddy, R., Byers, M., Kallunki, T., Sariola, H., Beck, K., Hirvonen, H., Shows, T.B. und Tryggvason, K. (1992) A truncated laminin chain homologous to the B2 chain: Structure, spatial expression, and chromosomal assignment. *J. Cell Biol.* **119**, 679-693.
- Kawasaki, H., Nakamaya, S. und Kretsinger, R.H. (1998) Classification and evolution of EF-hand proteins. *BioMetals* **11**, 277-295.
- Kleinman, R.J. und Reichardt, L.F. (1996) Testing the agrin hypothesis. *Cell* **85**, 461-464.
- Kohfeldt, E., Maurer, P., Vannahme, C. und Timpl, R. (1997) Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican. *FEBS* **414**, 557-561.
- Kohfeldt, E., Sasaki, T., Göhring, W. und Timpl, R. (1998) Nidogen-2: A New Basement Membrane Protein with Diverse Binding Properties. *J. Mol. Biol.* **282**, 99-109.
- Kretsinger, R.H. (1979) The informational role of Ca<sup>2+</sup> in the cytosol. *Adv. Cyc. Nucl. Res.* **11**, 1-26.
- Kretsinger, R.H., Tolbert, D., Nakamaya, S. und Pearson, W. The EF-hand homologs and analogs. In: *Novel calcium binding proteins* (ed Heizmann, C.W.) 17-37 (Springer, Berlin, 1991).

- Krück (Ed.): Pathophysiologie Pathobiochemie. Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 2. Auflage 1994.
- Kupprion, C., Motamed, K. und Sage, E.H. (1999) SPARC inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 29635-29640.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lane, T.F. und Sage, E.H. (1990) Functional mapping of SPARC: peptides from two distinct Ca<sup>2+</sup>-binding sites modulate cell shape. *J. Cell Biol.* **111**, 3065-3076.
- Lee, Y.-J. und Streuli, CH. (1999) Extracellular matrix selectively modulates the response of mammary epithelial cells to different soluble signaling ligands. *J. Biol. Chem.* **274**, 22401-22408.
- Ledda, F., Bravo, A.I., Adris, S., Bover, L., Mordon, J. und Podhajcer, O.L. (1997) Suppression of SPARC expression by antisense RNA abrogates the tumorigenicity of human melanoma cells. *Nature Med.* **3**, 171-176.
- Lenarcic, B., Ritonja, A., Strukelj, B., Turk, B. und Turk, V. (1997) Equisatin, a new inhibitor of cysteine proteinases from *Actina equina*, is structurally related to thyroglobulin type-1 domain. *J. Biol. Chem.* **272**, 13899-13903.
- Mann, K., Deutzmann, R., Aumailley, M., Timpl, R., Raimondi, L., Yamada, Y., Pan, T. C., Conway, D. und Chu, M. L. (1989) Amino acid sequence of mouse nidogen, a multidomain basement membrane protein with binding activity for laminin, collagen IV and cells. *EMBO J.* **8**, 65-72.
- Marr, H.S., Basalamah, M.A. und Edgell, C.J.S. (1997) Endothelial Cell Expression of Testican mRNA. *Endothelium* **5**, 209-219.
- Matzuk, M.M., Lu, N., Vogel, H., Sellheyer, K., Roop, D.R. und Bradley, A. (1995) Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. *Nature* **374**, 360-363.
- Maurer, P. und Hohenester, E. (1997) Structural and Functional Aspects of Calcium Binding in Extracellular Matrix Proteins. *Matrix Biol.* **15**, 569-580.
- Maurer, P., Hohenadl, C., Hohenester, E., Göhring, W., Timpl, R. und Engel, J. (1995) The C-terminal Portion of BM-40 (SPARC/Osteonectin) is an Autonomously Folding and Crystallisable Domain that Binds Calcium and Collagen IV. *J. Mol. Biol.* **253**, 347-357.
- Maurer, P., Mayer, U., Bruch, M., Jenö, P., Mann, K., Landwehr, R., Engel, J. und Timpl, R. (1992) High-affinity and low-affinity calcium binding and stability of the multidomain extracellular 40-kDa basement membrane glycoprotein (BM-40/SPARC/osteonectin) *Eur. J. Biochem.* **205**, 233-240.
- Mason, I.J., Taylor, A., Williams, J.G., Sage, H. und Hogan, B.L.M. (1986) Evidence from molecular cloning that SPARC, a major product of mouse embryo parietal endoderm, is related to an endothelial cell "culture shock" glycoprotein of M<sub>r</sub>=43,000. *EMBO J.* **5**, 1465-1472.

- McPhalen, C.A., Strynadka, N.C.J. und James, M.N.G. (1991) Calcium-binding sites in proteins: a structural perspective. *Adv. Prot. Chem.* **42**, 77-144.
- McVey, J.H., Nomura, S., Kelly, P. Mason, I.J. und Hogan, B.L.M. (1988) Characterization of the mouse SPARC/osteonectin gene: intron/exon organization and an unusual promotor region. *J. Biol. Chem.* **263**, 11111-11116.
- Menon, G.K., Grayson, S. und Elias, P.M. (1985) Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. *J. Invest. Dermatol.* **84**, 508-512.
- Mercuri, E., Pennock, J., Goodwin, F., Sewry, C., Cowan, F., Dubowitz, L., Dubowitz, V. und Muntoni, F. (1996) Sequential study of central and peripheral nervous system involvement in an infant with merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* **6**, 425-429.
- Michel, U., Farnworth, P. und Findlay, J.K. (1993) Follistatins: more than follicle-stimulating hormone suppressing proteins. *Mol. Cell. Endocrinol.* **91**, 1-11.
- Molina, F., Bouanani, M., Pau, B. und Granier, C. (1996) Characterization of the type-1 repeat from thyroglobulin, a cysteine-rich module found in proteins from different families. *Eur. J. Biochem.* **240**, 125-133.
- Motamed, K. (1999) SPARC (osteonectin/BM-40). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 1363-1366.
- Murphy-Ullrich, J.E., Lane, T.F., Pallerio, M.A. und Sage, E.H. (1995) SPARC mediates focal adhesion disassembly in endothelial cells through a follistatin-like region and the calcium-binding EF-hand. *J. Cell Biol.* **57**, 341-350.
- Nakamura, T., Sugino, K., Titani, K. und Sugino, H. (1991) Follistatin, an activin-binding protein, associates with heparan sulfate chains of proteoglycans on follicular granulosa cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 19432-19437.
- Nakayama, K. (1997) Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem. J.* **327**, 625-635.
- Nicholson, C., ten Bruggencate, G., Steinberg, R. und Stockle, H. (1977) Calcium modulation in brain extracellular microenvironment demonstrated with ion-selective micropipette. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 1287-1290.
- Nicholson, C. (1980) Modulation of extracellular calcium and its functional implications. *FASEB J.* **39**, 1519-1523.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. und Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **10**, 1-6.
- Nitsche, E.M., Moquin, A., Adams, P.S., Guenette, R.S., Lakins, J.N., Sinnecker, G.H.G., Kruse, K. und Tenniswood, M.P. (1996) Differential Display RT-PCR of Total RNA From Human Foreskin Fibroblasts for Investigation of Androgen-Dependent Gene Expression. *Am. J. Med. Gen.* **63**, 231-238.

- Ogrinc, T., Dolenc, I., Ritonja, A. und Turk, V. (1993) Purification of the complex of cathepsin L and the MHC class II-associated invariant chain fragment from human kidney. *FEBS Lett.* **336**, 555-559.
- Oohira, A., Matsui, F., Tokita, Y., Yamauchi, S. und Aono, S. (2000) Molecular Interactions of Neural Chondroitin Sulfate Proteoglycans in the Brain Development. *Arch. Biochem. Biophys.* **374**, 24-34.
- Patel, K. (1998) Follistatin. *The Intern. J. Biochem. and Cell Biol.* **30**, 1087-1093.
- Patthy, L. und Nikolics, K. (1993) Functions of agrin and agrin-related proteins. *Trends Neurosci.* **16**, 76-81.
- Patthy, L. (1991) Exons - original building blocks of proteins. *Bioessays* **13**, 187-192.
- Paulsson, M. (1992) Basement Membrane Proteins; Structure, Assembly, and Cellular Interactions. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **27**, 93-127.
- Paulsson, M., Mörgelin, M., Wiedeman, H., Beardmore-Gray, M., Dunham, D., Hardingham, T.E., Heinegard, D., Timpl, R. und Engel, J. (1987) Extended and globular protein regions in cartilage proteoglycans. *Biochem. J.* **245**, 763-772.
- Paulsson, M., Deutzmann, R., Timpl, R., Dalzoppo, D., Odermatt, E. und Engel, J. (1985) Evidence for coiled-coil regions in the long arm of laminin. *EMBO J.* **4**, 309-316.
- Raines, E.W., Lane, T.F., Iruela-Arispe, M.L., Ross, R. und Sage, E.H. (1992) The extracellular glycoprotein SPARC interacts with platelet-derived growth factor (PDGF)-AB and -BB and inhibits the binding of PDGF to its receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1281-1285.
- Reed, M.J. und Sage, E.H. (1996) SPARC and the extracellular matrix: Implications for cancer and wound repair. In Güthert, U. und Birchmeier, W., eds. *Attempts to Understand Metastasis Formation I. Current Topics in Microbiology and Immunology*. Vol 231. Berlin, Springer-Verlag, 81-94.
- Reitz, R.E., Duane, T.A., Woods, J.R. und Weinstein, R.L. (1977) Calcium, magnesium, phosphorus, and parathyroid hormone interrelationships in pregnancy and newborn infants. *Obstet. Gynecol.* **50**, 701-705.
- Rupp, F., Payan, D.G., Magill-Sole, C., Cowan, D.M. und Scheller, R.H. (1991) Structure and expression of rat agrin. *Neuron.* **6**, 811-823.
- Sage, E.H. (1996) Angiogenesis inhibition in the context of endothelial cell biology. *Adv. Oncol.* **12**, 17-29.
- Sage, E.H. und Vernon, R.B. (1995) Regulation of angiogenesis by extracellular matrix: the growth and the glue. *J. Hypertens.* **12**, S145-152.
- Sage, E.H., Vernon, R., Funk, S., Everitt, E. und Angello, J. (1989) SPARC, a secreted protein associated with cellular proliferation, inhibits cell spreading in vitro and exhibits Ca<sup>2+</sup>-dependent binding to the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* **109**, 341-356.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sasaki, T., Hohenester, E., Göhring, W. und Timpl, R. (1998) Crystal structure and mapping by site-directed mutagenesis of the collagen-binding epitope of an activated form of BM-40/SPARC/osteonectin. *EMBO J.* **17**, 1625-1634.
- Selleck, S.B. (2000) Proteoglycans and pattern formation. *Trends Genet.* **16**, 206-212.
- Shibanuma, M., Mashimo, J., Mita, A., Kuroki, T. und Nose, K. (1993) Cloning from a mouse osteoblastic cell line of a set of transforming-growth-factor b1-regulated genes, one of which seems to encode a follistatin-related polypeptide. *Eur. J. Biol.* **217**, 13-19.
- Smyth, N., Vatansever, H.S., Murray, P., Meyer, M., Frie, C., Paulsson, M. und Edgar, D. (1999) Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. *J. Cell Biol.* **144**, 151-160.
- Streuli, C. (1999) Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 634-640,
- Strynadka, N.C.J. und James, M.N.G. (1989) Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins. *Ann. Rev. Biochem.* **58**, 951-998.
- Sumitomo, S., Inouye, S., Liu, X.-J., Ling, N. und Shimasaki, S. (1995) The heparin binding site of follistatin is involved in its interaction with activin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**, 1-9.
- Takeichi, M. (1995) Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin. Cell Biol.* **7**, 619-621.
- Termine, J.D., Kleinmann, H.K., Whitson, S.W., Conn, K.M., McGarvey, M.L. und Martin, G.R. (1981) Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* **26**, 99-105.
- Timpl, R. (1996) Macromolecular organization of basement membranes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 618-624.
- Timpl, R. (1993) Proteoglycans of basement membranes. *Experientia* **49**, 417-428.
- Timpl, R., Rohde, H., Robey, P.G., Rennard, S.I., Foidart, J.M. und Martin, G.R. (1979) Laminin-a glycoprotein from basement membranes. *J. Biol. Chem.* **254**, 9933-9937.
- Tremble, P.M., Lane, T.F., Sage, E.H. und Werb, Z. (1993) SPARC, a secreted protein associated with morphogenesis and tissue remodeling, induces expression of metalloproteinases in fibroblasts through a novel extracellularmatrix-dependent pathway. *J. Cell Biol.* **121**, 1433-1444.
- Tschesche, H., Kolkenbrock, H. und Bode, W. (1987) The covalent structure of the elastase inhibitor from *anemonia sulcata*- a "non-classical" Kazal-type protein. *Biol. Chem Hoppe-Seyler* **368**, 1297-1304.
- Vannahme, C., Schübel, S., Herud, M., Gösling, S., Hülsmann, H., Paulsson, M., Hartmann, U. und Maurer, P. (1999) Molecular Cloning of Testican-2; Defining a Novel Calcium-Binding Proteoglycan Family Expressed in Brain. *J. Neurochem.* **73**, 12-20.

Villareal, X.C., Mann, K.G. und Long, G.L. (1989) Structure of human osteonectin based upon analysis of cDNA and genomic sequences. *Biochemistry* **28**, 6483-6491.

Vracko, R. (1974) Basal lamina scaffold-Anatomy and significance for maintenance of orderly tissue structure. *Am. J. Pathol.* **77**, 313-346.

Westermeier R. (1990) *ElektrophoresePraktikum*. VCH, Weinheim.

Yamashita, M. und Konagaya, S. (1996) A novel cysteine protease inhibitor of the egg of chum salmon, containing a cysteine-rich thyroglobulin-like motif. *J. Biol. Chem.* **271**, 1282-1284.

Yates, J.L., Warren, N. und Sugden, B. (1985) Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* **313**, 812-815.

Yurchenco, P.D. und Schittny, J.C. (1990) Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.* **4**, 1577-1590.

---

## Verzeichnis der Abkürzungen

AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
bp	base pair
BSA	bovine serum albumin
CD	Circular Dichroismus
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
Cre	causes recombination
DNA	desoxyribonucleic acid
EBNA	Epstein-Barr nuclear antigen
ECM	extracellular matrix
EDTA	ethylenediaminetetraacetate
EST	expressed sequence tag
FACIT	fibril-associated collagen with interrupted triple helix
GAG	Glycosaminoglycan
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GCG	genetic computing group
HTGS	human tentative genomic sequence
MHC	major histocompatibility complex
OD	Optische Dichte
PAGE	polyacrylamid gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RNA	ribonucleic acid
RT	reverse transcriptase
SDS	sodium dodecyl sulphate
SSC	saline sodium citrate
SSPE	saline-sodium citrate-EDTA
TBS	tris buffered saline
TCA	trichloracetate
TGF	transforming growth factor
TOF	time of flight
ZMMK	Zentrum für Molekulare Medizin Köln

## **Danke**

Herrn Prof. Dr. Mats Paulsson danke ich sehr für das Angebot und die Überlassung des interessanten Themas, für die umfassende Betreuung, die Möglichkeit aktiv an Kongressen teilzunehmen, die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und das angenehme Arbeitsklima, welches für den Erfolg der Arbeit einen wichtigen Faktor darstellte.

Herrn Prof. Dr. D. Schomburg danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Patrik Maurer für die Themenstellung, die intensive Betreuung und immerwährende Diskussionsbereitschaft sowie die Hilfe bei der Vorbereitung vieler Vorträge, Poster, der Durchsicht des Manuskripts und der Einführung ins Hallenklettern. An dieser Stelle wünsche ich Ihm nochmals alles Gute für seine neue Betätigung in der privaten Wirtschaft.

Ich möchte allen Mitarbeitern unseres Arbeitskreises für die freundschaftliche Atmosphäre und Ihre Hilfsbereitschaft danken. Besonders den erfahreneren Semestern, die ich nicht alle namentlich erwähnen kann danke ich für die kompetente Vermittlung ihres Erfahrungsschatzes.

I thank Dr. Neil Smyth for a lot of stories - scientific or non-scientific in scientific or non-scientific environment.

Frau Silke Gössling gilt mein besonderer Dank für exzellente Lösungsansätze und gute Zusammenarbeit.

Ein ganz großes Danke Schön gilt bei dieser Gelegenheit meiner Familie, besonders meinen Eltern, die mir diese Arbeit ermöglichten und mich in jeder Weise unterstützt haben.

Und schließlich ein ganz herzliches Danke für Alles an meine Freundin Karin Beer !

---

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

Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. M. Paulsson betreut worden.

Köln, den 06.12.2000

Teilpublikationen:

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

Vannahme, C., Schübel, S., Herud, M., Gösling, S., Hülsmann, H., Paulsson, M., Hartmann, U. und Maurer, P. (1999) Molecular Cloning of Testican-2; Defining a Novel Calcium-Binding Proteoglycan Family Expressed in Brain. J. Neurochem. **73**, 12-20.

## **Kurzzusammenfassung**

Ausgehend von EST-Datenbankvergleichen wurden Klone identifiziert, die für neue Mitglieder der BM-40 Familie kodieren, bei denen es sich um modular aufgebaute, extrazelluläre, Calcium-bindende Proteine handelt. Die kompletten cDNAs von insgesamt vier neuen Homologen, SMOC-1, SMOC-2, Testican-2 und Testican-3 wurden isoliert, deren Aminosäuresequenz abgeleitet und ihr Domänenaufbau wurde untersucht. SMOC-1 und SMOC-2 zeigten dabei eine bislang unbekannte Domänenabfolge. Alle neuen Homologe enthielten eine extrazelluläre, Calcium-bindende (EC)-Domäne, die aus dem BM-40/SPARC/Osteonectin bekannt ist und in diesem Protein eingehend untersucht wurde. Aus der Analyse der Eigenschaften der EC-Domänen in den neuen Familienmitgliedern können weitere Erkenntnisse über die Calcium-Bindung in der EC-Domäne gewonnen werden. Weiterhin kann die Untersuchung der neuen Familienmitglieder ein besseres Verständnis über die Funktion der Proteine der BM-40 Familie bringen.

Die Gewebeverteilung der mRNA in der Maus wurde für alle neuen Homologe bestimmt, die Verteilung von Testican-2 mRNA im Maus Gehirn wurde mittels in-situ Hybridisierung analysiert. Weiterhin wurden die vier neuen cDNAs genutzt, um die zugehörigen Proteine in einem eukaryontischen System rekombinant zu exprimieren. Mit diesen wurde die Calcium-Bindung mittels CD-Spektroskopie untersucht. Aliquots der gereinigten Proteine wurden zur Produktion von Antiseren genutzt. Für SMOC-1 konnte auf Gewebeschnitten eine Lokalisation in der Basalmembranzzone gezeigt werden; dort ist es mit Laminin-1 kolokalisiert. Ein deutlicher Unterschied zeigte sich in Follikeln, wo SMOC-1 nicht in der Basalmembran sondern um die Oocyten lokalisiert ist.

**Short summary**

Based on a homology search in an EST-database several clones coding for novel members of the BM-40 family, a class of modular extracellular calcium-binding proteins, were identified. Complete cDNA for together four new homologs SMOC-1, SMOC-2, testican-2 and testican-3 were isolated, their putative amino acid sequence was deduced and their domain composition investigated. SMOC-1 and SMOC-2 showed a domain arrangement so far unknown in the BM-40 family. All new members contained an extracellular calcium-binding (EC)-domain, first characterised in BM-40/SPARC/osteonectin. From the analysis of their EC-domains further knowledge about the mechanism of calcium-binding may be gained, Further, the novel family members identified may offer additional clues to the overall function of the BM-40 family.

The tissue distribution in mouse of the mRNAs for all new homologs was investigated and for testican-2 the distribution in mouse brain was characterised by in-situ hybridisation. All novel cDNAs were used for recombinant expression of the corresponding proteins in an eucaryotic cell system. Calcium binding studies were performed with purified proteins. Aliquots were used to raise polyclonal antisera. For SMOC-1 a localisation at the basement membrane zone was shown on tissue sections, where it is colocalized with laminin-1. A different pattern was found in ovarian follicles, where SMOC-1 is located around the oocyte and not in the basement membrane.

## Lebenslauf

### Personalien

Name	Christian Vannahme
Adresse	42799 Leichlingen, Johannisberg 45
Geburtsdatum	20.01.1968
Geburtsort	Opladen, jetzt Leverkusen 3
Staatsangehörigkeit	Deutsch

### Schulbildung

08.74 - 06.78	Besuch der Kath. Grundschule Kirchstraße in Leichlingen
08.78 - 05.87	Besuch des Städt. Gymnasium Am Hammer in Leichlingen, Abschluß: Abitur
07.87 - 02.88	Aushilftätigkeit bei der Firma ICI Lacke Farben GmbH Hilden im Bereich Qualitätskontrolle/Qualitätssicherung
03.88 - 09.89	Zivildienst im Bereich Umweltschutz beim Garten-, Forst- und Friedhofsamt der Stadt Solingen

### Hochschulausbildung

09.89	Einschreibung für das Studienfach Chemie (Diplom) an der Universität zu Köln
10.92	Vordiplom
05.95	Mündliche Diplomprüfungen
06.95 - 03.96	Diplomarbeit "Enzymatische Synthesen von Tyrosindimeren" im Arbeitskreis von Frau Priv. Doz. Dr. S. Waffenschmidt am Institut für Biochemie der Universität zu Köln.
05.96 - 12.00	Dissertation „Isolierung und Charakterisierung neuer extrazellulärer Calcium-bindender Proteine der BM-40 Familie“ im Arbeitskreis von Prof. Dr. Mats Paulsson, Institut für Biochemie II, Medizinische Fakultät der Universität zu Köln.
05.96	Einstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter
09.96 - 07.98	Teilnahme am Graduiertenkolleg „Molekularbiologische Grundlagen pathophysiologischer Vorgänge“ an den Medizinischen Einrichtungen der Universität zu Köln
seit 08.98	Wissenschaftlicher Mitarbeiter