

Untersuchungen zur Funktion von Testicanen

Generierung von Testican-1 und -3 defizienten Mauslinien

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



vorgelegt von

Sandra Röhl

aus Brüssel

im September 2004

Berichtersteller:

Herr Prof. Dr. Mats Paulsson
Herr Prof. Dr. Siegfried Roth

Tag der mündlichen Prüfung:

2. Dezember 2004

Meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Extrazelluläre Matrix	1
1.2	Matrix-Metalloproteinasen (MMPs).....	2
1.3	Proteoglykane	3
1.4	Proteoglykane im zentralen Nervensystem.....	4
1.5	Testicane	7
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	11
1.7	Eigene Vorarbeiten	12
1.7.1	Testican-1 <i>Targeting</i> -Konstrukt	12
1.7.2	Genomische Organisation des Testican-1 Gens	13
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	Material	15
2.1.1	Puffer	15
2.1.2	Verbrauchsmaterial.....	15
2.1.3	Zellkulturmedien und Zubehör	16
2.1.4	Antikörper.....	16
2.1.5	Zelllinien.....	17
2.1.6	Oligonukleotide	17
2.2	Methoden	18
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	18
2.2.1.1	Isolierung genomischer DNA aus ES-Zellen.....	18
2.2.1.2	Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien.....	19
2.2.1.3	Southern Blot Analyse	19
2.2.1.4	Radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA	20
2.2.1.5	Hybridisierung radioaktiv markierter DNA Sonden mit filtergebundener DNA oder RNA	20
2.2.1.6	Isolierung von Gesamt-RNA aus Mausgewebe	21
2.2.1.7	Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNA.....	21
2.2.1.8	Denaturierende Agarose Gelelektrophorese	22
2.2.1.9	Northern Blot	22

2.2.1.10	Reverse Transkription	23
2.2.1.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	23
2.2.1.12	<i>Radiation Hybrid Mapping</i>	25
2.2.1.13	DNA-Sequenzierung	25
2.2.2	Proteinchemische Methoden	25
2.2.2.1	Proteinextrakte aus Gewebe	25
2.2.2.2	Immunpräzipitation	26
2.2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	27
2.2.2.4	Western Blot Analyse	28
2.2.2.5	Analyse von GAG-Ketten	29
2.2.2.6	Gelatine-Zymographie	30
2.2.3	Affinitätsreinigung von Antikörpern.....	32
2.2.3.1	Affinitätsreinigung des Testican-1 Antikörpers aus Kaninchen	32
2.2.3.2	Affinitätsreinigung des Testican-1 Antikörpers aus Huhn.....	34
2.2.3.3	Affinitätsreinigung des Testican-2 Antikörpers aus Kaninchen	34
2.2.4	Histologische Methoden	35
2.2.4.1	Präparation von Gefrier- und Paraffinschnitten	35
2.2.4.2	Färbungen.....	36
2.2.5	Methoden zum Gene-Targeting.....	38
2.2.5.1	Präparation embryonaler Fibroblasten	38
2.2.5.2	Mitomycin-Behandlung embryonaler Fibroblasten	39
2.2.5.3	Kultur von embryonalen Stammzellen.....	39
2.2.5.4	Elektroporation und Selektion embryonaler Stammzellen	40
2.2.5.5	Einfrieren von embryonalen Stammzellen.....	40
2.2.6	Zellkulturarbeiten	41
3	ERGEBNISSE	43
3.1	Untersuchungen zur genomischen Organisation des Testican-1 Gens.....	43
3.1.1	Das Testican-1 Gen	43
3.1.1.1	Chromosomale Lokalisation	43
3.1.1.2	Transkriptionsstart.....	44
3.1.1.3	Alternatives Spleißen	45
3.1.2	Affinitätsreinigung und Charakterisierung von Antikörpern	47
3.1.2.1	Testican-1 Antikörper aus Kaninchen.....	47

3.1.2.2	Testican-1 Antikörper aus Huhn	50
3.1.2.3	Testican-2 Antikörper aus Kaninchen.....	52
3.1.3	Analyse des endogenen Testican-1 Proteins	53
3.1.3.1	Testican-1 ist ein extrazelluläres Protein	53
3.1.3.2	Analyse der Glykosaminoglykan-Ketten von Testican-1	54
3.2	Generierung der Testican-1 defizienten Mauslinien.....	56
3.2.1	Genereller Ablauf	56
3.2.2	Herstellung der internen Sonde	58
3.2.3	Herstellung rekombinanter ES-Zell-Klone.....	59
3.2.4	Etablierung der Testican-1 defizienten Mauslinien.....	60
3.2.5	Genotypisierung der Testican-1 defizienten Mauslinien.....	61
3.3	Analyse der Testican-1 defizienten Mauslinien.....	62
3.3.1	Phänotyp der Testican-1 defizienten Mäuse.....	63
3.3.2	Testican mRNA Expression	64
3.3.2.1	RT-PCR.....	64
3.3.2.2	Northern Blot Analyse	65
3.3.3	Untersuchungen zur Protein Expression	66
3.3.3.1	Nachweis der Abwesenheit von Testican-1	66
3.3.3.2	Expressionsanalyse von BM-40 Familienmitgliedern	68
3.3.4	Morphologie des Gehirns	69
3.3.5	Histologische und Immunhistologischen Untersuchungen	70
3.3.5.1	Histologische Untersuchung des Gehirns	70
3.3.5.2	Immunhistologie	71
3.3.6	Untersuchungen zur Interaktion mit MMP-2	76
3.4	Generierung einer Testican-3 defizienten Mauslinie.....	77
3.4.1	<i>Targeting</i> -Konstrukt und Herstellung der Sonden	78
3.4.2	Herstellung rekombinanter ES-Zell-Klone.....	79
3.4.3	Etablierung einer Testican-3 defizienten Mauslinie.....	80
3.5	Analyse der Testican-3 defizienten Mauslinie.....	81
4	DISKUSSION	83
4.1	Generierung Testican-1 defizienter Mauslinien.....	83
4.2	Nachweis der Testican-1 Defizienz	84
4.3	Lokalisation von Testican-1	86

4.4	Analyse der Glykosaminoglykan-Ketten von Testican-1	88
4.5	Charakterisierung der Testican-1 defizienten Mäuse	89
4.6	Wird das Fehlen von Testican-1 kompensiert?.....	91
4.7	Interaktion von Testican-1 mit MMPs.....	93
4.8	Etablierung einer Testican-3 defizienten Mauslinie	95
4.9	Vor- und Nachteile von <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Studien	96
4.10	Fazit und Ausblick	97
5	ZUSAMMENFASSUNG	99
6	ABSTRACT.....	100
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	101
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	108
	DANKSAGUNG	110
	ERKLÄRUNG	111
	LEBENS LAUF	112

1 Einleitung

1.1 Extrazelluläre Matrix

Zu einem Gewebe zählt neben den Zellen auch der zwischen ihnen liegende Raum. Dieser Raum ist mit heterogenen Makromolekülen gefüllt, die ein dreidimensionales Strukturgerüst, die extrazelluläre Matrix (ECM), bilden. Die ECM hat sehr unterschiedliche Aufgaben, wie z.B. die Unterstützung von Zelladhäsion und die Speicherung von Wachstumsfaktoren. Sie spielt eine Rolle bei der Wegfindung von Zellen während der Embryonalentwicklung und schafft Strukturen, die einem Gewebe, je nach Funktion, besondere mechanische Eigenschaften verleihen. So ist beispielsweise im Knochen die ECM mineralisiert und verleiht ihm seine Stabilität. Sie ist zudem auch für die Dehnbarkeit von Sehnen verantwortlich und erlaubt es dem Knorpel, enormen Druckkräften standzuhalten. Eine Sonderform der extrazellulären Matrix stellt die Basalmembran (BM) dar. Sie bildet eine dünne Schicht zwischen Epithel-, Endothel-, Nerven-, Muskelzellen u.a. und dem angrenzenden Bindegewebe und kann wie z.B. in der Niere Filterfunktion übernehmen [zur Übersicht siehe Gustafsson und Fassler, 2000].

Die Proteine der ECM werden von den Zellen des jeweiligen Gewebes produziert und in den Zellzwischenraum sekretiert. Dabei ist die molekulare Zusammensetzung der ECM so vielfältig wie deren unterschiedliche Funktionen. Es lassen sich drei Hauptkomponenten der ECM festhalten: Collagene, Proteoglykane und nicht-collagene Matrixproteine wie z.B. Laminin und Fibronectin. Matrixproteine können an Zelloberflächenrezeptoren wie Integrine und an verschiedene andere Proteine der ECM binden und so eine Verbindung zwischen den Zellen und der ECM herstellen. In den vergangenen Jahren wurden Bedeutung und Funktion der ECM vor allem durch die Erstellung von Mausmodellen deutlich. Beispielsweise führt die gezielte Inaktivierung des LAMC1 Gens, das für die Laminin $\gamma 1$ Untereinheit codiert, im Mausmodell zur Abwesenheit von Basalmembranen und zu embryonaler Letalität bereits am Tag 5,5 post coitum [Smyth, 1999].

Die ECM spielt aber nicht nur bei der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle. Sie ist ebenso an Wundheilungs- und Regenerationsprozessen im adulten Organismus beteiligt. Dazu müssen die Moleküle der ECM ab- und umgebaut werden. Hierbei stellen die

Matrix-Metalloproteinasen eine wichtige Gruppe der Matrix abbauenden Enzyme dar [zur Übersicht siehe Yong, 2001].

1.2 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)

MMPs sind Zink-abhängige Endopeptidasen, die, nimmt man alle MMPs zusammen, sämtliche Proteine der ECM abbauen können. Sie werden als Zymogene in den extrazellulären Raum sekretiert und müssen durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. Derzeit zählen aufgrund von Sequenzhomologien mindestens 25 Mitglieder zur Familie der MMPs, die je nach Substratspezifität oder Domänenaufbau noch einmal in Untergruppen unterteilt werden. So werden MMP-2 und -9 aufgrund ihrer Eigenschaft Gelatine spalten zu können auch als Gelatinasen (A und B) oder MMPs mit einer Transmembran Domäne als Membran-Typ (MT)-MMP bezeichnet (z.B. MMP-14, das auch MT1-MMP genannt wird) [zur Übersicht siehe Yong, 2001].

Da es sich bei den MMPs um sehr potente Proteasen handelt, muss deren Aktivität im Organismus sehr präzise reguliert werden. Dies geschieht auf drei Ebenen [zur Übersicht siehe Yong, 2001]: Zum einen auf der Ebene der Transkription, d.h. die Transkription erfolgt in aller Regel nicht konstitutiv, sondern aufgrund eines aktivierenden Signals, wie z.B. eines Wachstumsfaktors. Die posttranslationale Modifikation bietet eine weitere Möglichkeit zur Regulation. Ein Cysteinrest im Propeptid des inaktiven Zymogens blockiert das Zinkion im aktiven Zentrum. Erst durch proteolytische Abspaltung des Propeptids wird das katalytische Zentrum der MMPs frei [Nagase, 1997]. Die Abspaltung kann unter anderem durch andere MMPs erfolgen. So sorgt beispielsweise MT1-MMP für die Aktivierung von proMMP-2 zu MMP-2. Außerdem enthalten einige MMPs, zu denen die MT-MMPs zählen, eine Furin/Prohormon-Convertase-Schnittstelle. Sie werden auf der Zelloberfläche vermutlich durch Plasmin aktiviert [Okumura, 1997]. Die dritte Kontrollmöglichkeit bietet die Interaktion der bereits aktiven MMPs mit TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*). Derzeit sind vier TIMPs bekannt. Sie binden an die katalytische Einheit der MMPs und inaktivieren sie auf diese Weise [Woessner und Nagase, 2000]. TIMPs können aber auch für die Aktivierung einiger MMPs notwendig sein. So bildet TIMP-2 mit proMMP-2 und MT1-MMP zunächst einen Komplex. Die

Abspaltung des Propeptids von MMP-2 erfolgt dann durch ein dem Komplex benachbartes MT1-MMP [Butler, 1998; zur Übersicht siehe Murphy, 1999].

Die vielfältige Substratspezifität der MMPs deutet bereits an, dass den MMPs eine bedeutende Rolle bei den vielfältigen Prozessen zukommt, die einen Umbau der ECM erfordern. Dazu zählen die Migration von Zellen, die Angiogenese und die bereits erwähnte Wundheilung [Nagase, 1998; Mignatti und Rifkin, 1996; Okada, 1997]. Ebenso spielen MMPs eine Rolle in der Embryonalentwicklung, dem Wachstum, der Brustentwicklung und bei einigen pathologischen Prozessen wie Arthritis oder der Metastasierung von Tumoren [Chin und Werb, 1997; Lark, 1997; Liotta, 1991].

Im zentralen Nervensystem (ZNS) werden MMPs unter anderem mit der Pathogenese multipler Sklerose und malignen Gliomen in Zusammenhang gebracht [Yong, 1998]. Insbesondere MMP-2, MMP-9 und alle MT-MMPs zeigen im aggressiven Glioblastom eine verstärkte Expression [Forsyth, 1999]. Unter physiologischen Bedingungen regulieren die MMPs während der ZNS-Entwicklung die Wanderung von Vorläuferzellen zu ihrem Bestimmungsort, spielen eine Rolle bei der Myelinisierung und fördern das Auswachsen von Axonen [Yong, 1998]. Im ZNS werden MMPs sowohl von Neuronen als auch von Gliazellen exprimiert [Kaczmarek, 2002].

1.3 Proteoglykane

Proteoglykane kommen in der ECM aller Gewebe einschließlich des Gehirns vor [zur Übersicht siehe Bandtlow und Zimmermann, 2000]. Sie sind am Aufbau der ECM beteiligt, indem sie an Collagene, Fibronectin und andere Matrix Komponenten binden. Proteoglykane können als Komponenten in der ECM (z.B. Lecticane), aber auch als transmembrane- (z.B. Syndecane) oder membran-assoziierte (z.B. Glypicane) Moleküle vorliegen [zur Übersicht siehe Hartmann und Maurer, 2001].

Sie bestehen aus einem Proteinanteil, verbunden mit Glykosaminoglykanen (GAG), die sulfatiert werden können. GAGs wiederum sind aus ca. 20-200 Disaccharid-Einheiten aufgebaut, die jeweils aus einer Uronsäure (Glucuronsäure oder Iduronsäure) und einem Aminozucker (N-Acetylglucosamin oder N-Acetylgalactosamin) bestehen. Sie werden in Abhängigkeit von ihren Disaccharid-Einheiten eingeteilt in: Chondroitin-/Dermatansulfat (CS/DS), Heparin-/Heparansulfat (HS), Keratansulfat (KS) und Hyaluronsäure, wobei die

Hyaluronsäure im Gegensatz zu den erstgenannten in proteinfreier Form auf der Zelloberfläche und in der ECM vorkommt [zur Übersicht siehe Kjellen und Lindahl, 1991; Prydz und Dahlen, 2000].

Ursprünglich wurden alle Core-Proteine, die GAG-Ketten tragen, zu einer Proteinklasse, den Proteoglykanen, zusammengefügt. Sie unterscheiden sich jedoch beträchtlich in Größe, Form und ihren chemischen Eigenschaften. So sind derzeit mehr als 30 Core-Proteine bekannt, die häufig geringe Sequenzhomologien zeigen und deren Größe von 10 bis über 500 kDa variiert. Zusätzlich kann die Anzahl der angehefteten GAG-Ketten von einer bis zu mehr als 100 betragen und ein Core-Protein kann auch verschiedene Typen von GAG-Ketten tragen [zur Übersicht siehe Prydz und Dahlen, 2000]. Außerdem können eine Reihe von Proteoglykanen wie z.B. Versican in unterschiedlichen Spleißvarianten auftreten, deren Zuckermodifikationen sich auch noch unterscheiden können [Dours-Zimmermann und Zimmermann, 1994]. In Abhängigkeit vom Gewebe oder dem Entwicklungszustand kann die Natur der GAG-Ketten (CS oder HS) ebenfalls variieren [Douglas und Kadler, 1998].

Trotz der großen Vielfalt haben Proteoglykane allerdings auch Gemeinsamkeiten. So sind die Core-Proteine vieler Proteoglykane aus verschiedenen Protein-Domänen aufgebaut, aufgrund derer sie in Proteinfamilien eingeteilt werden. Zum Beispiel zeichnet sich die Proteoglykan-Familie der Lecticanen unter anderem durch eine C-terminale Lectin-Domäne aus. Zu den Lecticanen zählen Aggrecan, Neurocan, Brevican und Versican [Yamaguchi, 2000].

Proteoglykane sind aufgrund der GAG-Ketten und der Sulfatierung stark negativ geladen. Dadurch können sie große Mengen Wasser anlagern. Dies ermöglicht beispielsweise dem Knorpel in den Gelenken die starken Druckunterschiede auszugleichen. Außerdem können Proteoglykane mit Wachstumsfaktoren interagieren und diese bei Bedarf freisetzen. Daher spielen Proteoglykane auch eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Wachstumsvorgängen und der Differenzierung von Zellen [zur Übersicht siehe Prydz und Dahlen, 2000].

1.4 Proteoglykane im zentralen Nervensystem

Ein großer Teil des Gehirns besteht aus dem extrazellulären Raum. Jedoch unterscheidet sich die Zusammensetzung der ECM des Gehirns beträchtlich von jener in anderen

Gewebe. Sie besteht im adulten Gehirn aus einer ungewöhnlich großen Anzahl an verschiedenen Proteoglykanen, Hyaluronsäure und Tenascinen [zur Übersicht siehe Novak und Kaye, 2000]. Die sonst so typischen ECM Proteine wie fibrilläre Collagene oder Fibronectin fehlen im adulten Gehirn, auch wenn Fibronectin während der Entwicklung transient exprimiert wird [zur Übersicht siehe Pearlman und Sheppard, 1996]. Allgemein wird den Proteoglykanen aufgrund von *in vitro* Studien und der exakten Regulation der Expression eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems zugeschrieben [zur Übersicht siehe Bandtlow und Zimmermann, 2000]. Im Gegensatz dazu zeigten jedoch Untersuchungen von Mausstämmen mit Nullmutationen von Proteoglykanen des Nervensystems, wie Brevican oder Neurocan keine schwerwiegenden Defekte [Brakebusch, 2002; Zhou, 2001]. Dies muss allerdings nicht bedeuten, dass Proteoglykane unwichtig sind, sondern dass ihre Funktionen zum Teil redundant sind.

Die Anlage des Nervensystems in Vertebraten ist wohl einer der komplexesten Prozesse während der Embryonalentwicklung. Daher ist auch die zeitliche und räumliche Abfolge der einzelnen Entwicklungsschritte genau reguliert. Die unreifen Neuronen wandern vom Ort ihrer Entstehung, der Ventrikularzone des Neuroepithels in der Wand des Neuralrohrs, zu ihrer letztendlichen Position im zentralen Nervensystem (ZNS). Die Wanderung der Neurone im ZNS beginnt erst, nachdem die Phase der Zellteilung abgeschlossen ist. Im Gegensatz dazu teilen sich Neuralleistenzellen des peripheren Nervensystems während der Migration [zur Übersicht siehe Hartmann und Maurer, 2001]. Neurone des ZNS benutzen radiale Gliazellen, um an ihnen entlang zu wandern. Sie bewegen sich in aufeinander folgenden Zell-Gruppen und ordnen sich, beispielsweise im Cortex in Schichten entsprechend ihrem Geburtsdatum an, wobei jüngere Neurone an den Älteren vorbei wandern und sich weiter außen platzieren [Hatten, 1993]. Nachdem sie ihre endgültige Position erreicht haben, beginnen die sich differenzierenden Neurone mit dem Auswachsen von Neuriten. An der Spitze dieser Neuriten befindet sich der so genannte Wachstumskegel. Er kann über lange Strecken hinweg wandern und sein Ziel finden. Für die korrekte Wegfindung dienen Signale aus der unmittelbaren Umgebung oder aus dem Zielgebiet. Solche Signale können auf den Wachstumskegel entweder positiv (anziehend oder permissiv) oder negativ (abstoßend oder inhibitorisch) wirken. Hat der Wachstumskegel sein Ziel, beispielsweise ein anderes Neuron, erreicht, wird eine initiale synaptische Verbindung geknüpft indem sich der Wachstumskegel zur Präsynapse umwandelt und sich anschließend strukturelle Veränderungen in der postsynaptischen

Zelle vollziehen. Viele dieser ersten Verbindungen werden später durch neuronale Aktivität gefestigt. Dies ist ein Prozess, der ein Leben lang andauert. An nahezu all diesen Prozessen, die bei der Verschaltung des Nervensystems eine Rolle spielen, sind Proteoglykane beteiligt [zur Übersicht siehe Hartmann und Maurer, 2001].

Im ZNS tragen die meisten Proteoglykane entweder HS- oder CS-Ketten und werden sowohl von Neuronen als auch von Gliazellen exprimiert. Während der Neurogenese von Nagetieren korreliert die Expression der HS tragenden Glypicanen mit Gehirnregionen sich teilender neuronaler und glialer Vorläuferzellen. Die Glypican Transkripte konnten in den Ventrikularzonen des Prosencephalon, Mesencephalon und Rhombencephalon nachgewiesen werden [zur Übersicht siehe Bandtlow und Zimmermann, 2000].

Während der Entwicklung des Cortex wird das rezeptorähnliche CS Proteoglykan Tyrosinphosphatase RPTP- β und sein extrazelluläres Spleißprodukt Phosphacan von den radialen Gliazellen und den an ihnen entlang wandernden Neuronen exprimiert. Dies legt nahe, dass diese beiden Proteine an der neuronalen Migration beteiligt sind [zur Übersicht siehe Bandtlow und Zimmermann, 2000].

Bezüglich des Auswachsens und der Wegfindung von Axonen führten anfängliche Untersuchungen zu der vereinfachten Ansicht, dass HS Proteoglykane anziehend bzw. permissiv wirken, wohingegen CS Proteoglykane mit einer inhibitorischen Funktion in Verbindung gebracht wurden. Es gibt aber auch andere Beispiele, wo CS Proteoglykane anziehende und HS Proteoglykane eine inhibierende Wirkung zeigen [zur Übersicht siehe Bovolenta und Fernaud-Espinosa, 2000]. Außerdem kann die Wirkung auch von der Art des Neurons abhängen. So wirkt Phosphacan (CS-Proteoglykan) auf Neurone des Hippocampus permissiv, wohingegen es eine inhibitorische Wirkung auf das Auswachsen von Neuriten der Dorsalwurzelganglien zeigt [Garwood, 1999]. Eine attraktive oder inhibierende Wirkung kann aber nicht nur von den Zucker-Ketten, sondern auch vom Core-Protein selbst ausgehen. So blieb die inhibierende Wirkung von Phosphacan auf Neuriten embryonaler Hühner Neuronen auch nach Entfernung der CS-Kette erhalten [Milev, 1994].

CS Proteoglykane scheinen auch eine Rolle bei der Entwicklung synaptischer Plastizität zu spielen. Zum Beispiel wurden Brevican und Neurocan in perineuralen Netzwerken gefunden, welche die Zellkörper der Neurone umgeben und perisomatische Synapsen stabilisieren und auch deren Einrichtung fördern. Die Änderung der synaptischen Verbindungsstärke von Nervenzellen wird als synaptische Plastizität bezeichnet und stellt

die Grundlage des Gedächtnisses dar. Dabei ist die Stärke einer synaptischen Verbindung von der Häufigkeit ihrer Verwendung abhängig. Während gelegentlich in der präsynaptischen Zelle ablaufende Aktionspotentiale zu keiner Veränderung führen, verursacht eine kurze Salve von mehreren Aktionspotentialen eine Langzeitpotenzierung (LTP), so dass die folgenden einzelnen Aktionspotentiale der präsynaptischen Zellen eine stark erhöhte Reaktion in den postsynaptischen Zellen hervorruft. Je nach Intensität der Aktionspotential-Salven kann dieser Effekt Stunden, Tage und sogar Wochen anhalten. Dabei können zwei Phasen der LTP unterschieden werden. Die frühe Phase dauert ca. 2-3 Stunden und beinhaltet im Gegensatz zur späten Phase (mehr als 3 Stunden) keine Neusynthese von Proteinen. Bemerkenswerterweise war die LTP bei Brevican defizienten Mäusen aufgehoben. Dennoch zeigten sie keine Lern- oder Gedächtnisdefizite [Brakebusch, 2002]. Bei Neurocan defizienten Mäusen war dagegen nur die späte LTP beeinträchtigt [Zhou, 2001]. So scheinen verschiedene CS Proteoglykane an verschiedenen Abschnitten der LTP beteiligt zu sein, deren Mechanismus jedoch noch nicht bekannt ist [zur Übersicht siehe Dityatev und Schachner, 2003].

1.5 Testicane

Testican wurde ursprünglich als CS/HS tragendes proteolytisches Fragment aus humaner Samenflüssigkeit isoliert [Bonnet, 1992]. Anschließend war es gelungen, die entsprechende cDNA aus einer humanen Testis cDNA-Bank zu gewinnen (daher rührt der Name Testican) und die Aminosäuresequenz des Proteins zu bestimmen [Alliel, 1993]. Die Sequenz zeigte zu Proteinen der BM-40 Familie homologe Domänen, weswegen Testican zu dieser Protein-Familie gezählt wird (vgl. Abb. 1.1). Auf der Suche nach neuen Mitgliedern der BM-40 Familie konnten in unserer Abteilung zwei verschiedene EST (*expressed sequence tag*) -Klone identifiziert werden, die insbesondere zu Testican homolog waren. Das zuerst entdeckte Testican wurde Testican-1 und die beiden später gefundenen folglich Testican-2 und -3 genannt [Vannahme, 1999].

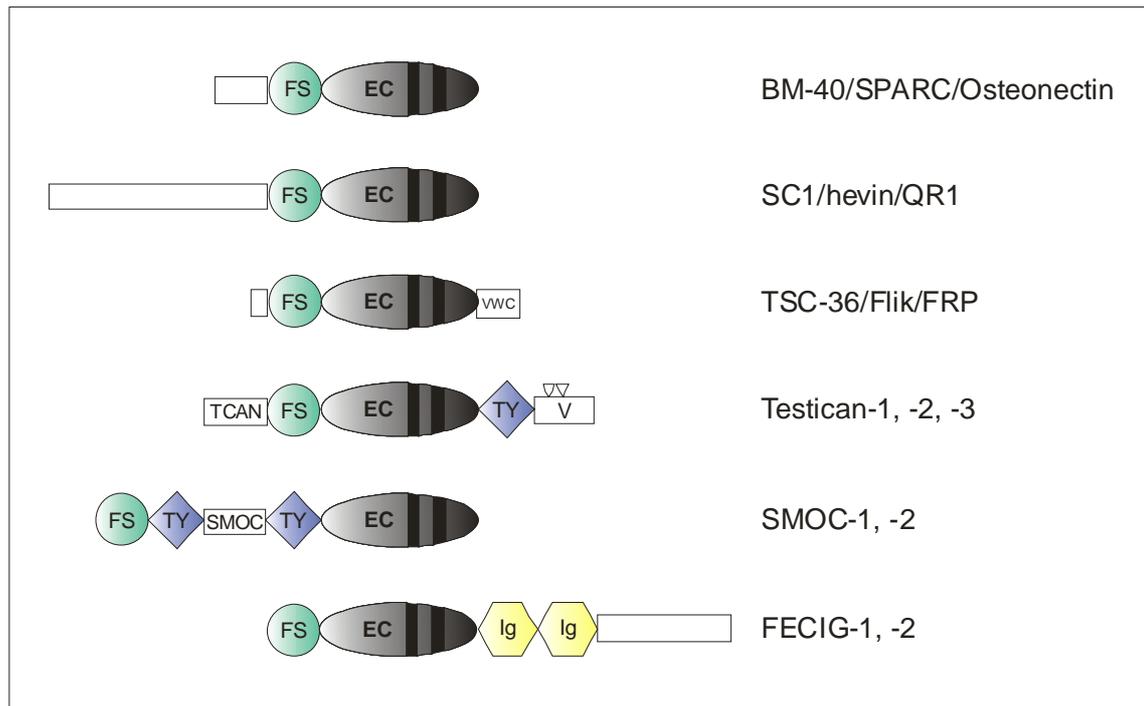


Abb. 1.1: Schematische Übersicht über die Struktur der Testicane und anderer Mitglieder der BM-40 Familie

FS = Follistatin-ähnliche Domäne

EC = extrazelluläre calciumbindende Domäne

TY = Thyroglobulin Domäne

V = Domäne V

Ig = Immunglobulin Domäne

VWC = von Willebrand Faktor Typ C homologe Domäne

TCAN = Testican spezifische Domäne

SMOC = SMOC spezifische Domäne

∇ = potentielle Glykosaminoglykan Bindestelle

Die nicht ausgefüllten Rechtecke stellen Domänen dar, die keine Homologie zu Datenbanksequenzen aufweisen. Die schwarzen Balken in der EC-Domäne stellen EF-Hand Motive dar.

Die Testicane kennzeichnet, ebenso wie alle anderen BM-40 Familienmitglieder, eine Follistatin-ähnliche (FS) Domäne und eine extrazelluläre calciumbindende (EC) Domäne. Die EC-Domäne enthält zwei EF-Hand Motive, die für eine Calciumbindung verantwortlich sind. Eine Calciumbindung konnte für viele Familienmitglieder durch Circular-Dichroismus-Spektroskopie bestätigt werden. Bei TSC-36 scheint jedoch die EC-Domäne nicht funktionell zu sein [Hambrock, 2004]. Zusätzlich weisen die Testicane eine N-terminale Domäne auf, die besonders bei Testican-2 reich an sauren Aminosäuren ist und keine Homologie zu anderen Proteinen zeigt. Außerdem enthalten sie eine Thyroglobulin (TY) Domäne, die bei den BM-40 Mitgliedern nur noch in SMOC-1 und -2 zu finden ist. Sie ist durch drei Disulfid-Brücken stabilisiert und enthält die seltene Aminosäure-Sequenz Cys-Trp-Cys-Val. Dieses Motiv ist sonst in Proteinen zu finden, die

an Zell/Zell oder Zell/Matrix Interaktionen beteiligt sind, wie z.B. in Nidogen-1 und -2 [Nagayoshi, 1989] und in Proteinen, die in der Lage sind, Wachstumsfaktoren zu binden wie z.B. das *insulin-like growth factor binding protein* [Shimasaki, 1991]. Aus diesem Grund wird bei den Testicanen ebenfalls über eine Rolle bei diesen Vorgängen spekuliert [Alliel, 1993]. Die C-terminale Domäne (Domäne V) ist für die Testicane spezifisch und enthält zwei potentielle Glykosaminoglykan Anheftungsstellen. Unter allen bekannten Mitgliedern der BM-40 Familie handelt es sich ausschließlich bei den Testicanen um Proteoglykane.

Da die Testicane ebenso wie alle anderen Mitglieder der BM-40 Familie eine N-terminale Signal-Sequenz aufweisen und eine hydrophobe Transmembranregion fehlt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um extrazelluläre Proteine handelt. Für Testican-2 konnte dies auch experimentell bestätigt werden [Schnepp, 2004].

Alle drei Testicane konnten sowohl im Menschen als auch in der Maus gefunden werden. Dabei ist die Aminosäure-Sequenz zwischen den beiden Spezies zu ca. 95 % konserviert. Zueinander zeigen Testican-1 und -3 eine Homologie von 55 % bzw. 47 % von Testican-1 und -3 zu Testican-2. Außer in verschiedenen Vertebraten konnten Testican Homologe auch in Invertebraten wie *Drosophila* und *C.elegans* entdeckt werden.

Anhaltspunkte zur Funktion der Testicane geben derzeit *in vitro* Untersuchungen und Analysen der Expression von Testican-1, -2 und -3. Während der Embryonalentwicklung der Maus konnten Testican-1 Transkripte im zentralen und peripheren Nervensystem beobachtet werden. Die Testican-1 Expression beginnt am Embryonaltag 10,5 (E10,5). Sie korreliert mit Phasen neuronaler Migration und dem Auswachsen von Neuriten [Charbonnier, 2000]. Während der Entwicklung neuromuskulärer Verbindungen konnte Testican-1 Protein zunächst im Cytoplasma von Myotuben (ab Tag E12) lokalisiert werden. Im Laufe der Entwicklung bis hin zur adulten Maus konzentriert sich Testican-1 an den neuromuskulären Synapsen und colokalisiert mit Acetylcholinrezeptoren [Cifuentes-Diaz, 2000]. Northern Blot Daten von verschiedenen adulten Mausgeweben (u.a. Gehirn und Skelettmuskel) dokumentieren jedoch, dass Testican-1 Transkripte auf das Gehirn beschränkt sind. Durch eine anschließende immunhistochemische Analyse konnte Testican-1 an der postsynaptischen Membran von Pyramidalneuronen der CA3 Region des Hippocampus lokalisiert werden [Bonnet, 1996]. Neueste Untersuchungen zeigen im Gehirn die deutlichste Lokalisation von Testican-1 im Thalamus [Edgell, 2004].

Im Menschen wird Testican-1 zusätzlich zum Gehirn in vielen anderen Geweben, wie Prostata, Testis, Herz und Blut exprimiert [BaSalamah, 2001; Marr, 1997]. Zusätzlich konnten Testican-1 Proteinfragmente in humaner Cerebrospinalflüssigkeit nachgewiesen werden [Stark, 2001]. *In vitro* Untersuchungen konnten anhand eines Zellkulturmodells zeigen, dass durch rekombinantes Testican-1 die Anheftung neuronaler Zellen (N2A) und das Auswachsen von Neuriten inhibiert wird [Marr und Edgell, 2003].

Testican-2 zeigt in der Maus eine breitere Expression als Testican-1, die am Embryonaltag 6,5 beginnt. Während der Entwicklung wird das Protein im Nervensystem und den darin enthaltenen Blutgefäßen, in Herz, Skelettmuskel, endokrinen Drüsen und der Lunge exprimiert. In der adulten Maus reduzieren sich die Testican-2 exprimierenden Gewebe auf das Gehirn (Endothelzellen der Blutgefäße und Neurone), endokrine Organe und Lunge [Schnepf, 2004]. Eine Northern Blot Analyse verschiedener adulter Mausgewebe zeigte Signale in Gehirn, Lunge und Testis [Vannahme, 1999]. Durch immunhistochemische Untersuchungen konnte Testican-2 im Gehirn, vor allem im Bulbus olfactorius, Hippocampus und in den Purkinjezellen des Cerebellums nachgewiesen werden [Schnepf, 2004]. Erste *in vitro* Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe weisen auf eine inhibitorische Wirkung von Testican-2 auf das Neuritenwachstum hin. Durch Zugabe von rekombinatem Testican-2 zu Kulturen primärer Cerebellumzellen konnte das Auswachsen von Neuriten verhindert werden [Lindgren, 1999]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Testican-2 während der Embryogenese weit verbreitet exprimiert wird, daher könnte Testican-2 auch eine Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems spielen [Schnepf, 2004].

Die Testican-3 Expression beginnt ebenso wie die Expression von Testican-1 am Embryonaltag 10,5 und ist während der Mausentwicklung in verschiedenen Geweben zu lokalisieren. Testican-3 konnte unter anderem im ZNS, in Basalmembranen der Blutgefäße und des Herzens, in der Leber und im Innenohr nachgewiesen werden. Im adulten Gehirn scheint das Testican-3 Protein weit verbreitet zu sein und kann in Bulbus olfactorius, Thalamus, Hippocampus, Cortex und Striatum immunhistologisch nachgewiesen werden [Hechler, 2003]. In der adulten Maus scheint die Testican-3 Expression aufgrund der Northern Blot Analyse auf das Gehirn beschränkt zu sein (unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe).

Möglicherweise spielen die Testicane auch eine Rolle bei der Tumordinvasion. Invasive Tumore zeichnen sich dadurch aus, dass sie umliegende Gewebe infiltrieren. Sie

exprimieren dazu Proteinasen wie MMP-2, MMP-9 und MT-MMPs, die ihnen die Fähigkeit verleihen auch Basalmembranen zu durchbrechen [Forsyth, 1999]. Die Proteinasen müssen jedoch zuvor aktiviert werden. *In vitro* konnte eine Bindung von humanem Testican-1 und -3 an MT1-MMP gezeigt werden, wodurch eine Aktivierung von MMP-2 verhindert wird [Nakada, 2001]. Humanes Testican-2 kann dagegen an Testican-1 und -3 binden und so möglicherweise die Migration von MT1-MMP exprimierenden Gliomazellen in der Gegenwart der anderen Testicane erlauben. Somit würde Testican-2 im Gegensatz zu den anderen Testicanen zum malignen Verhalten eines Astrozyten-Tumors beitragen [Nakada, 2003].

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Bisher gaben lediglich *in vitro* Studien Anhaltspunkte zur Funktion der Testicane. In dieser Arbeit soll nun mit Hilfe eines Modells die Funktion von Testican-1 und -3 im Gesamtorganismus untersucht werden. Die Maus stellt dafür ein ideales Modell dar, da sich Maus und Mensch genomisch und physiologisch sehr ähneln. Außerdem haben Mäuse eine rasche Generationsfolge, eine hohe Anzahl an Nachkommen und relativ niedrige Haltungskosten [Malakoff, 2000]. Der entscheidende Vorteil im Vergleich zu anderen Organismen ist jedoch, dass in den vergangenen Jahrzehnten Techniken zur Veränderung speziell des Mausgenoms entwickelt wurden. Zwei verschiedene Mausmodelle spielen dabei eine entscheidende Rolle:

1. Transgene Mäuse werden durch DNA-Injektion in den Vorkern befruchteter Oocyten hergestellt [Gordon und Ruddle, 1983; Palmiter und Brinster, 1985]. Dabei inseriert das fremde, genetische Material (das Transgen) heterolog an einer oder mehreren Stellen in das Genom, wobei der Ort der Integration und die Anzahl der inserierten Kopien zufällig sind. Mit dieser Methode kann ein endogenes Gen evtl. mit einer Mutation überexprimiert werden.
2. So genannte *knock-out* Mäuse werden mit Hilfe von genetisch veränderten embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) hergestellt. Bei dieser *Gene-Targeting* Methode wird gezielt ein bestimmtes Gen durch homologe Rekombination inaktiviert. Es gibt dabei auch die Möglichkeit, ein bestimmtes Gen gewebespezifisch auszuschalten (konditionaler *Knock-out*) [Copeland, 2001]. Diese Methode kann aber nicht zur Inaktivierung eines Gens sondern auch zur gezielten Einführung von Mutationen in ein bestimmtes Gen verwendet

werden, um die die Auswirkungen dieser Mutation *in vivo* analysieren zu können. In diesem Fall spricht man von einem *Knock-in*.

Ein durch Überexpression, durch Verlust oder durch Mutation eines Gens entstandener Phänotyp ermöglicht es, Rückschlüsse auf die Funktion eines Gens bzw. eines Proteins *in vivo* zu ziehen.

In dieser Arbeit sollten *Targeting*-Konstrukte von Testican-1 bzw. Testican-3 in embryonale Stammzellen eingebracht werden. Nach der Selektion sollten durch Hybridisierungs- experimente einzelne ES-Zell-Klone auf ein homologes Rekombinationsereignis hin untersucht werden. Ausgehend von diesen Klonen, in denen das Testican-1 bzw. Testican-3 Gen inaktiviert wurde, sollten durch Blastocysteninjektion Testican-1 und Testican-3 defiziente Mauslinien generiert werden. Die Abwesenheit des jeweiligen Genprodukts sollte durch proteinspezifische Antikörper sichergestellt werden. Im Anschluss sollten die Mäuse auf einen möglichen Phänotyp hin untersucht werden.

1.7 Eigene Vorarbeiten

1.7.1 Testican-1 *Targeting*-Konstrukt

Das *Targeting*-Konstrukt zur Inaktivierung des Testican-1 Gens in der Maus wurde bereits im Rahmen einer Diplomarbeit hergestellt [Röll, 2000]; ebenso die externe Sonde zur Überprüfung der homologen Rekombination des *Targeting*-Konstrukts mit dem Genom der ES-Zellen. Zur Erläuterung werden hier noch einmal die wichtigsten Merkmale des *Targeting*-Vektors und der entsprechenden genomischen Sequenz aufgeführt.

Ausgangspunkt für die Klonierung des Testican-1 *Targeting*-Konstrukts war ein 10 kb großes genomisches EcoRI/EcoRV Fragment des Mausstamms 129/Ola, das aus Cosmid-DNA isoliert und in den Vektor pGEM-7Zf+ kloniert wurde. Dieses DNA Fragment enthält das erste und zweite Exon des murinen Testican-1 Gens, wobei sich zu Beginn des zweiten Exons das Startcodon (ATG) für die Proteinsequenz befindet. In das zweite Exon wurde dann über eine interne NotI-Schnittstelle die Neomycin-Selektionskassette (Neo-Kassette) in sense Orientierung inseriert. Durch die Unterbrechung des Gens unmittelbar nach dem ATG sollte die Entstehung eines trunkierten Proteins ausgeschlossen werden. Bei der Herstellung des *Targeting*-Konstrukts wurde auf die Verwendung isogener DNA

(daher 129/Ola) geachtet, um die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination zu erhöhen [zur Übersicht siehe Soriano, 1995].

Eine homologe Rekombination des *Targeting*-Konstrukts mit dem Genom der ES-Zellen kann durch Southern Blot Analyse mittels einer radioaktiv markierten Sonde (Probe 1) nachgewiesen werden. Die Sonde besteht aus einer 800 bp langen, 3' des Konstruktes gelegenen genomischen Sequenz, daher wird diese Sonde auch als externe Sonde bezeichnet. Nach Restriktionsspaltung der ES-Zell-DNA mit EcoRI erscheint in der Southern Blot Analyse im Falle des Wildtyp Allels ein 12 kb Fragment und im Falle des mutierten Allels ein 9 kb Fragment. Der Grund dafür ist die zusätzliche EcoRI Schnittstelle in der Selektionskassette (siehe Abb. 3.11). Um ausschließen zu können, dass ES-Zellen mit homolog integriertem Konstrukt ein *Targeting*-Konstrukt über eine nicht homologe Rekombination zusätzlich in ihr Genom integriert haben, werden diese ES-Zell-Klone mit einer weiteren internen Sonde (Probe 2) analysiert. Durch die zusätzliche nicht homologe Integration eines weiteren Konstrukts könnte ein zweites Gen inaktiviert werden und ein möglicher Phänotyp dann durch das zusätzlich inaktivierte Gen hervorgerufen werden. Die interne Sonde wird mit dem Arm des *Targeting*-Konstrukts hybridisiert, der nicht durch die externe Sonde überprüft wird. So besteht die Möglichkeit durch die interne Sonde zusätzlich die korrekte Integration des zweiten Arms des *Targeting*-Konstrukts zu überprüfen, da dieser in seltenen Fällen nicht homolog integriert, sondern über eine heterologe Integration an einer anderen Stelle in das Genom integrieren kann. Dies könnte dieselben Folgen haben wie eine zusätzliche heterologe Integration eines weiteren *Targeting*-Konstrukts. Die interne Sonde wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt (siehe Kapitel 3.2.2)

1.7.2 Genomische Organisation des Testican-1 Gens

Im Rahmen der Diplomarbeit sollte auch die genomische Organisation des murinen Testican-1 Gens aufgeklärt werden. Zu diesem Zeitpunkt waren cDNA Sequenz und genomische Organisation des humanen Gens [Marr, 1997; Charbonnier, 1998], ebenso wie die cDNA Sequenz des murinen Gens, publiziert [Bonnet, 1996]. Da die humane und die murine Nukleotid-Sequenz zu 90 % identisch sind, wurde angenommen, dass sich die genomische Organisation des Testican-1 Gens zwischen den beiden Spezies, wenn überhaupt, nur geringfügig unterscheidet. Wichtigster Unterschied zwischen humaner und

muriner cDNA Sequenz ist nach Bonnet et al. eine zusätzliche Sequenz von 9 Basen in der Maus, die für die Aminosäuren EVE codiert [Bonnet, 1996].

Beim Durchmustern einer EST (*expressed sequence tag*)-Datenbank konnten sechs verschiedene humane Testican-1 EST-Sequenzen identifiziert werden. Davon entsprachen fünf der publizierten Sequenz, die weitere Sequenz codierte zusätzlich noch für die Aminosäuren EVE. Durch eine Analyse der genomischen Sequenz in der Datenbank konnte die für EVE codierende Sequenz als eigenständiges Exon identifiziert werden, so dass das humane Gen nicht aus den von Charbonnier et al. veröffentlichten 11, sondern aus 12 Exons besteht [Charbonnier, 1998]. Beim Durchmustern einer murinen EST-Datenbank wurden ebenfalls Sequenzen mit und ohne die für EVE codierende Sequenz gefunden. Da zumindest im humanen Testican-1 Gen EVE von einem eigenständigen Exon codiert wird und cDNA Sequenzen mit und ohne EVE gefunden wurden, kann das für EVE codierende Exon vermutlich alternativ gespleißt werden. Diese Annahme galt es nun im Rahmen dieser Arbeit experimentell für das murine Testican-1 Gen zu bestätigen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

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

2.1.1 Puffer

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

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

Alle weiteren Puffer werden bei den entsprechenden Methoden beschrieben.

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Histo-Objektträger und mikroskopische Deckgläser: Shandon, Faust

Nitrocellulose-Membran: Protran NC, Schleicher und Schuell

Röntgenfilm: Fuji Medical X-Ray Film RX, Fuji

Säulen-Material: CNBr-activated Sepharose 4B, Pharmacia Biotech

2.1.3 Zellkulturmedien und Zubehör

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM),	Gibco
Non essential Amino Acids (NEA),	Gibco
L-Glutamine (200 mM),	Gibco
Penicillin/Streptomycin,	Gibco
Fetal Bovine Serum (FCS),	Biochrom KG
HAT Media Supplement (50x) HybriMax [®] ,	Sigma
Geneticin G-418	Gibco

2.1.4 Antikörper

Primärantikörper

- Polyklonaler Antikörper gegen murines rekombinantes Testican-1 aus Kaninchen, Pineda Antikörper-Service.
- Polyklonaler Antikörper gegen murines rekombinantes Testican-1 aus Huhn, Pineda Antikörper-Service.
- Polyklonaler Antikörper gegen murines rekombinantes Testican-2 aus Kaninchen, Pineda Antikörper-Service.
- Polyklonaler Antikörper gegen murines rekombinantes Testican-3 aus Kaninchen, Pineda Antikörper-Service.
- Polyklonaler Antikörper gegen murines rekombinantes SC1 aus Kaninchen, Pineda Antikörper-Service.
- Monoklonaler Antikörper gegen Tubulin aus Maus: N356, Amersham
- Polyklonaler Antikörper gegen GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) aus Kaninchen, Dako
- Polyklonaler Antikörper gegen NSE (*neuron specific enolase*) aus Kaninchen, Chemicon International
- Polyklonaler Antikörper gegen SV2 (*synaptic vesicle protein 2*) aus Maus, Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa)
- Polyklonaler Antikörper gegen Neurofilament/2H3 aus Maus, Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa)

Sekundärantikörper

- Anti-Kaninchen-IgG, HRP(*Horseradish Peroxidase*)-gekoppelt aus Schwein, Dako
- Anti-Kaninchen-IgG, Cy3-gekoppelt aus Ziege, Dianova
- Anti-Huhn-IgY, HRP(*Horseradish Peroxidase*)-gekoppelt aus Kaninchen, Dianova

2.1.5 Zelllinien

WI26-Zellen: humane Lungenfibroblasten

N2A-Zellen: murine Neuroblastomzellen

N18TG2-Zellen: murine Neuroblastomzellen

NG108-Zellen: fusionierte N18TG2 und C6-Zellen

C6-Zellen: Ratten-Gliomzellen

C2F3-Zellen: murine Myoblastenzellen

2.1.6 Oligonukleotide

Bezeichnung	Oligonukleotid in 5' → 3' Richtung
Ex1s	GGAACCCCAGCAACTCGGC
Ex1s2	GTGGGCTCACAAAGCGGCCG
Ex1a	GTTGCTGGGGTTCTGTACC
Ex2s2	CAATTCCTAGACAATGACC
Ex2a	CTGGGAGACAGTGCTCAGCC
Ex2a2	GCCACTGGTCATTGTCTAGG
Ex3a	GAAGGGCTTGTGGGATTCC
Ex4a	GAGCCGTCTGGTAGTCCTGG
T1_NCR1	GGAGCTCAGGCTTCTCCGCC
T1_NCR2-2	CTAACATCATTTCCCTGAGC
EVE_AS	CGTGTATATTCCTGGTTGGC
mpreEVE_S	ATGTTGTGGGCAATGAGTCG
Neo_a	TGTGCCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCC
Tub-S	TCACTGTGCCTGAACTTACC
Tub-A	GGAACATAGCCGTAAACTGC
Oligo-dT	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGCT
T3-Ex1s2	CCGTGCCCCGCTCTCAACAAG
T3-Ex2a2	CTGAGAGATTGTCGTGAGCC

2.2 Methoden

Alle Methoden, die hier nicht näher beschrieben sind, wurden aus Sambrook et al. übernommen [Sambrook, 1989].

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Isolierung genomischer DNA aus ES-Zellen [Floss, 1996]

Zur Isolierung genomischer DNA wurden die ES-Zellen in 48-Loch Platten auf embryonalen Fibroblasten kultiviert. Da es für die Gewinnung der DNA keine Rolle spielte, ob die ES-Zellen differenziert waren, wurde hierfür das preiswertere Medium der Fibroblasten verwendet. Um die DNA zu präparieren, wurde das Medium entfernt und die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 300 µl Lysis-Puffer aufgenommen, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und üN bei 60 °C im Wasserbad inkubiert. Durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol wurde die DNA gefällt und durch Zentrifugieren (10 min, 17.000 x g, RT) sedimentiert. Die DNA wurde mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und in 50 µl ddH₂O aufgenommen. Ethanolreste wurden im Heizblock (5 min, 60 °C) abgedampft. Anschließend wurde die DNA üN bei 4 °C gelöst. Für einen Restriktionsverdau wurden 15 µl dieser DNA Präparation eingesetzt.

Lysis-Puffer :

10 mM Tris pH 8,0

10 mM EDTA pH 8,0

10 mM NaCl

0,5 % N-Laurylsarcosin

4 mg/ml Proteinase K

2.2.1.2 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien [Laird, 1991]

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde genomische DNA aus den Schwanzspitzen verwendet. Dazu wurden 0,5-1 cm lange Schwanzspitzen mit 500 µl Lysis-Puffer üN bei 60 °C im Wasserbad inkubiert.

Erfolgte die Analyse der genomischen DNA mittels PCR, wurde sie mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit einer gelben Pipettenspitze aus der Fällung gefischt und in ein Eppendorf-Gefäß, das bereits 200 µl ddH₂O enthielt, überführt. Die DNA wurde entweder üN bei 4 °C oder 2 h bei 60 °C gelöst. In die anschließende PCR wurden 2 µl dieser DNA eingesetzt. Wurde die DNA mit Hilfe des Southern Blots analysiert, erfolgte nach der Lyse eine Phenol-Chloroform Extraktion der DNA. Von dieser DNA-Präparation wurden 15 µl für den Restriktionsverdau und die daran anschließende Southern Blot Analyse eingesetzt.

Lysis-Puffer :

100 mM Tris pH 8,0

5 mM EDTA pH 8,0

200 mM NaCl

0,2 % SDS

0,4 mg/ml Proteinase K

2.2.1.3 Southern Blot Analyse [Southern, 1975]

Das als Southern Blot bezeichnete Verfahren dient dazu, die im Agarosegel nach Größe aufgetrennte DNA auf eine Nylonmembran zu transferieren. Durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Probe können spezifische Fragmente identifiziert werden.

Das Agarosegel wurde zunächst zusammen mit einem Lineal fotografiert, um später die Zuordnung der radioaktiven Signale zu ihrer Größe zu ermöglichen. Anschließend wurde das Gel für 25 bis 30 min unter Schütteln in 0,25 M HCl in Wasser inkubiert, kurz mit Wasser gespült und für weitere 25 bis 30 min in der Denaturierungslösung geschüttelt. Der Transfer der DNA auf die Nylonmembran (Roti-Nylon Plus, Roth) erfolgte in Denaturierungspuffer über einen Zeitraum von ca. 16 h aufgrund von Kapillarkräften.

Nach dem Transfer wurde die Nylonmembran kurz in 2 x SSC-Lösung gewaschen und getrocknet.

Denaturierungspuffer:

1,5 M NaCl

0,25 M NaOH

2.2.1.4 Radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA

Die radioaktive Markierung der DNA Proben erfolgte mit dem „Ready-To-Go DNA Labelling Beads (-dCTP)“ Kit der Firma Amersham nach den Angaben des Herstellers. Die zu markierende DNA wurde mit Restriktionsenzymen aus Plasmiden geschnitten oder durch PCR gewonnen (siehe Kapitel 2.2.1.11). Für die Reaktion wurden 30 ng DNA eingesetzt. Nicht inkorporierte Nukleotide wurden über eine Nick-G50 Säule (Amersham) abgetrennt. Die Sonde wurde vor ihrem Einsatz im Southern- oder Northern Blot 5 min aufgekocht und sofort zu 10 ml der Prähybridisierungslösung gegeben (vgl. folgendes Kapitel).

2.2.1.5 Hybridisierung radioaktiv markierter DNA Sonden mit filtergebundener DNA oder RNA

Die Nylonmembran wurde in einer Hybridisierungsröhre ca. 4 h mit 30 ml Formamid-Mix bei 42 °C in einem Ofen prähybridisiert. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der radioaktiv markierten Sonde an die Membran wurde während der Prähybridisierung 800 µl denaturiertes Heringssperma (10 mg/ml, Sigma) der Lösung zugesetzt. Anschließend wurden 20 ml der Prähybridisierungslösung verworfen und die denaturierte radioaktive Sonde zu den verbleibenden 10 ml Lösung zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte üN bei 42 °C. Am folgenden Tag wurde die radioaktive Probe abgegossen und die Membran für je 15 min in 2 x SSC/0,1 % SDS; 0,4 x SSC/0,1% SDS; 0,1 x SSC/0,1 % SDS bei 65 °C gewaschen. Falls die Hintergrundaktivität noch zu hoch war, wurde mit der 3. Waschlösung nachgewaschen. Die Membran wurde nach dem Waschen in Frischhaltefolie eingepackt, und zusammen mit einem Röntgenfilm in einer lichtundurchlässigen Kassette fixiert. Die Exposition erfolgte bei -80 °C, wobei die Dauer der Exposition von der Intensität der Strahlung abhing und von einigen Minuten bis zu einigen Tagen variieren konnte.

<u>Formamid-Mix:</u>	<u>50 x Denhardt's:</u>	<u>20 x SSPE:</u>
5 x Denhardt's	1 % Ficoll 400	3 M NaCl
1,5 % SDS	1 % Polyvinylpyrrolidone	200 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O
50 % Formamid	1 % BSA	20 mM EDTA
5 % SSPE		

2.2.1.6 Isolierung von Gesamt-RNA aus Mausgewebe [Chomczynski, 1987]

Das Gewebe (50 – 100 mg) wurde zunächst in einem 1 ml Denaturierungslösung mit Hilfe des Polytron Messers homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat nacheinander mit 100 µl Na-Acetat pH 4,0, 1000 µl Phenol und 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (21.000 x g, 20 min, 4 °C) verblieb die RNA in der wässrigen Phase. Diese wurde abgenommen, mit 1 Volumen Isopropanol versetzt und 1 h bei -20 °C inkubiert. Die RNA wurde durch Zentrifugation sedimentiert. Das Pellet wurde in 300 µl Denaturierungslösung, die auf 65 °C erhitzt war resuspendiert. Anschließend wurde die RNA noch einmal mit Isopropanol gefällt (s.o.) und mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Zuletzt wurde das RNA-Pellet in 100 µl ddH₂O resuspendiert und zum Lösen 10 min bei 65°C inkubiert.

Denaturierungslösung:

4 M Guanidinium Isothiocyanat (GTC)
25 mM Na-Citrat pH 7,0
0,5 % N-Laurylsacrosin
0,1 M 2-Mercaptoethanol (fisch zugesetzt)

2.2.1.7 Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNA

Die Isolierung von mRNA aus oben gewonnener Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des „QuickPrep micro mRNA Purification „Kits der Firma Amersham, durchgeführt. Für die Gewinnung der mRNA wurden 300 – 400 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Diesen wurden 400 µl Extraktionspuffer (Puffer des Kits) und 800 µl Elutionspuffer (Puffer des Kits) zugefügt. Die Isolierung der mRNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Nachdem die Konzentration der mRNA bestimmt worden war, wurde sie, ebenfalls nach

Herstellerangaben, präzipitiert und bei -20 °C gelagert. Für die Northern Blot Analyse wurden 5 µg mRNA eingesetzt.

2.2.1.8 Denaturierende Agarose Gelelektrophorese [Lehrach, 1977]

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung wurden Agarosegele mit einer Endkonzentration von 1,2 % Agarose verwendet, und wie folgt hergestellt: 0,9 g Agarose wurden mit 7,5 ml 10 x MOPS Puffer (pH 7,0) und 54,1 ml DEPC-Wasser aufgeköcht und auf 60 °C abgekühlt. Anschließend wurden 13,4 ml Formaldehydlösung hinzu gegeben und die Mischung in eine horizontale Gel-Apparatur (8,5 cm x 10 cm) gegossen. Nach dem Erhärten des Gels wurde das Gel mit RNA-Laufpuffer überschichtet. Die RNA-Proben wurden wie folgt vorbereitet: Aus der Fällung wurden 5 µg RNA herausgenommen, abzentrifugiert (21.000 x g, 10 min, 4 °C) und das Pellet in 5 µl ddH₂O resuspendiert. Dann wurden 1 µl 10 x MOPS, 3,5 µl Formaldehyd und 10 µl Formamid zugefügt, die RNA 15 min bei 65 °C inkubiert und sofort für 1 min auf Eis gestellt. Die RNA wurde anschließend mit 2 µl RNA Blaumarker und 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versehen und auf das Agarosegel aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei 6 V/cm.

<u>RNA-Laufpuffer:</u>	<u>10 x MOPS pH 7,0:</u>	<u>RNA-Blaumarker:</u>
6 % Formaldehyd	20 mM MOPS	50 % Glycerin
in MOPS Puffer pH 7,0	50 mM NaAcetat	1 mM EDTA
	1 mM EDTA	0,4 % Bromphenolblau

RNA-Marker: 0,24-9,5 Kb RNA Ladder, Invitrogen
9,49; 7,46; 4,40; 2,37; 1,35; 0,24 Kb

2.2.1.9 Northern Blot

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der RNA im Agarosegel erfolgte der Transfer auf die Nylonmembran (Hybond-N, Amersham) in 20 x SSC Lösung (vgl. Southern Blot Analyse). Die Membran wurde nach dem Transfer in 2 x SSC gewaschen und zweimal im UV-Crosslinker bestrahlt. Zur Hybridisierung der filtergebundenen RNA siehe Kapitel 2.2.1.5.

2.2.1.10 Reverse Transkription

Für die Herstellung von cDNA wurde das Enzym Reverse Transkriptase (Superscript II, Invitrogen) und ein Oligo-dT- oder ein Testican-1 spezifischer Primer verwendet. Ausgangsmaterial für die Synthese waren 2 µg isolierte Gesamt RNA (siehe Kapitel 2.2.1.6). Diese wurde zusammen mit 25 µM Oligo-dT-Primer auf ein Volumen von 12 µl aufgefüllt und zur Beseitigung von Sekundärstrukturen der RNA für 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Dem Reaktionsansatz wurden dann 0,5 µl Reverse Transkriptase (200 U/µl), 4 µl Enzym-Puffer, 0,5 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl, Roche), 1µl dNTP Mix (je 10 mM bezüglich dATP, dGTP, dCTP, dTTP) und 2 µl 0,1 %iges DTT zugefügt und für 50 min bei 42 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Denaturierung des Enzyms durch zehnmünütige Inkubation bei 72 °C gestoppt. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert. Zur Amplifikation wurde 1 µl dieser cDNA für die Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt (siehe folgendes Kapitel).

2.2.1.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR können durch Verwendung spezifischer Oligonukleotide (Primer) DNA Abschnitte *in vitro* amplifiziert werden [Saiki, 1988]. Dabei wird die doppelsträngige DNA zunächst denaturiert, anschließend können sich die spezifischen Oligonukleotide an die DNA anlagern (*Annealing*). Die DNA Polymerase synthetisiert nun in Anwesenheit von dNTP's wieder einen DNA-Doppelstrang (*Extension*). Um die DNA zu Beginn der Reaktion vollständig zu denaturieren, wurde sie in einem ersten Schritt 5 min bei 95 °C denaturiert. Für den letzten Zyklus wurde eine Polymerisationsdauer von 10 min gewählt, um noch nicht fertig gestellte Produkte zu vervollständigen. Die Reaktion wurde in einem programmierbaren „Thermocycler“ durchgeführt.

Um möglichst spezifische PCR Produkte zu erhalten, wurde zunächst eine hohe *Annealing*-Temperatur gewählt, die in den ersten 10 Zyklen um je 0,5 °C erniedrigt wurde. In den weiteren 25 Zyklen wurde dann eine niedrigere Temperatur gewählt, um das Produkt auch in ausreichenden Mengen zu erhalten. Da die Aktivität der Polymerase im Laufe der Reaktion nachlässt, wurde bei den letzten 25 Zyklen die Extensions-Zeit um je zehn Sekunden verlängert. Die Extensions-Zeit wurde entsprechend der Produktgröße gewählt, wobei pro 1 kb mindestens eine Minute verwendet wurde. Für DNA-Fragmente bis zu einer Größe von 1kb wurde die Taq-Polymerase (Roche), für größere Fragmente die „Expand Long“-Polymerase (Roche) verwendet.

Da die Methode der PCR in dieser Arbeit hauptsächlich zur Genotypisierung der Testican-1 oder -3 Mäuse verwendet wurde, werden hierfür beispielhaft ein entsprechender Reaktionsansatz und das Programm des „Thermocyclers“ beschrieben. Um alle drei möglichen Genotypen (+/+, +/-,-/-) in einer Reaktion nachweisen zu können, wurden drei Primer verwendet, wobei der sense Primer 5' der Neo-Kassette, ein antisense Primer 3' der Neo-Kassette und ein weiterer antisense Primer in der Neo-Kassette gelegen ist. Abhängig davon, ob Testican-1 oder -3 Mäuse analysiert werden sollten, wurden die entsprechenden T1 oder T3 Primer verwendet.

Reaktionsansatz:

2 µl	DNA
5 µl	Expand Long Puffer
1 µl	DMSO
0,4 µl	dNTP's [25 µM]
0,2 µl	sense Primer (T1-Ex1s2 oder T3-Ex1s2)
0,2 µl	antisense Primer (T1-Ex2a2 oder T3-Ex2a2)
0,2 µl	Neo antisense Primer
0,75 µl	Expand Long Polymerase
40,45 µl	ddH ₂ O

Thermocycler-Programm:

3 min	95°C		
30 sec	95 °C		10 Zyklen
30 sec	64 °C	-0,5 °C je Zyklus	
2 min	72 °C		
30 sec	95 °C		25 Zyklen
30 sec	58 °C		
2 min	72 °C	+10 sec je Zyklus	
10 min	72 °C		

2.2.1.12 Radiation Hybrid Mapping

Um die chromosomale Lokalisation des murinen Testican-1 Gens zu bestimmen, wurden 100 verschiedene Hybrid DNAs aus T31 Maus und Hamster DNA in eine PCR Reaktion eingesetzt [McCarthy, 1997]. Mit dem gewählten Primerpaar, das anhand der Intron 2 (mpreEVE_S; Primer in sense Orientierung) und Intron 3 (EVE_AS; Primer in antisense Orientierung) Sequenz des Testican-1 Gens konstruiert wurde, ergab sich eine Fragmentgröße von 480 bp. Für die PCR Reaktion wurden folgende Bedingungen gewählt: Anlagerung der Primer 30 sec bei 57 °C, Verlängerung der Primer für 40 sec bei 72 °C, Denaturierung 30 sec bei 94 °C für 40 Zyklen und eine finale Verlängerung der DNA-Fragmente für 10 min bei 72 °C. Die Analyse dieser 100 Hybrid DNAs wurde zur Bestätigung wiederholt. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt und anschließend ausgewertet, welche Hybrid DNA ein PCR Produkt und welche keines ergab.

Diese Daten wurden der Jackson Laboratory Radiation Hybrid Datenbank (<http://www.jax.org/resources/dokuments/cmdata/rhmap/rhsubmit.html>) übermittelt, die dann die Position des Testican-1 Gens in Bezug auf bekannte genomische Marker bestimmte.

2.2.1.13 DNA-Sequenzierung

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

2.2.2 Proteinchemische Methoden

2.2.2.1 Proteinextrakte aus Gewebe

Proteinextrakte, die für eine Immunpräzipitation verwendet werden sollten wurden wie folgt hergestellt: Bei -80 °C gelagertes oder frisch präpariertes Gewebe wurde auf Eis in fünffachem Volumen eisgekühltem TBS/NP-40 Puffer aufgetaut und direkt mit einem Glas-Homogenisator zerkleinert, bis eine homogene Suspension entstand. Das Homogenat

wurde für ca. 30 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 21.000 x g, 4 °C zentrifugiert. Für eine Immunpräzipitation wurden 270 bis 1000 µl des Überstandes verwendet. Der restliche Überstand wurde bei -20 °C gelagert.

TBS/NP40-Puffer:

150 mM NaCl

50 mM Tris/HCl pH 7,4

2 mM EDTA

1 % NP-40

Complete-Proteaseinhibitor, Roche (1 Tablette in 2 ml ddH₂O gelöst; dann 1:25 eingesetzt)

Wurden Proteinextrakte für die Gelatine-Zymographie angefertigt wurde das Gewebe auf Eis präpariert und auch ständig gekühlt, um die MMPs nicht zu aktivieren. Das Gewebe wurde mit einem Skalpell zerkleinert; zu 15 mg frisch präpariertem Gewebe wurden anschließend 300 µl PBS/0,25 % Triton hinzugefügt. Um ein Homogenat herzustellen, wurde das Gewebe durch eine Kanüle gesaugt, für eine Stunde auf Eis inkubiert und anschließend 30 min bei 21.000 x g, 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mit dem *detergent compatible protein assay* (Bio-Rad) bestimmt und 10 µg des Proteinextrakts je Spur des gelatinehaltigen Gels geladen. Extrakte wurden immer frisch hergestellt und nicht verwahrt.

PBS/Triton Puffer:

8,4 mM Na₂HPO₄

1,5 mM NaH₂PO₄

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

0,25 % Triton

2.2.2.2 Immunpräzipitation

Testican-1 oder -3 wurden aus 270 bis 1000 µl Gewebeextrakt oder 1 bis 4 ml Zellkulturüberstand mittels eines spezifischen Antikörpers aus Kaninchen präzipitiert. Dazu wurden 2 µg des Antikörpers an 30 µl der Protein A-Agarose Suspension gekoppelt

(eine Stunde, 4 °C). Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit 1 ml TBS entfernt. Während der Kopplung des Antikörpers wurden je 30 µl der Protein-A Agarose Suspension (ohne Antikörper) mit dem Gewebeextrakt oder dem Zellkulturüberstand bei 4 °C inkubiert, um Proteine, die unspezifisch an die Protein-A Agarose gebunden hatten, zu entfernen (*Preclearing*). Über Nacht erfolgte dann die Immunpräzipitation bei 4 °C mit 30 µl Antikörper-gekoppelter Protein-A Agarose. Am folgenden Tag wurden die *Agarose-Beads* drei mal 5 min bei Raumtemperatur (RT) mit 1 ml TBS/0,5 % NP-40 gewaschen und in 40 µl 2 x Probenpuffer (reduzierend) aufgekocht (Probenpuffer siehe Kapitel 2.2.2.3). Der gesamte Ansatz wurde in einem SDS-Polyacrylamid (PAA)-Gel aufgetrennt und im Western Blot analysiert.

2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

[Laemmli, 1970]

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE unter Verwendung eines Tris/Glycin-Puffersystems durchlaufen die Proteine zuerst ein großporiges Sammelgel (pH 6,8), werden an der Grenzschicht zum Trenngel konzentriert und laufen dann als scharfe Bande in das Trenngel (pH 8,8) ein, wo sie nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Als Trennmatrix wurde eine Mischung aus Acrylamid und Bisacrylamid (37,5:1) verwendet, die durch Zugabe von Ammoniumpersulfat und N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) polymerisiert wurde. Für das Sammelgel wurde eine Acrylamid-Konzentration von 5 %, für das Trenngel eine Acrylamid-Konzentration von 8 % oder ein Gradient von 4-15 % gewählt.

	Sammelgel	Trenngel		
	(4 %)	(4 %)	(8 %)	(15 %)
AA/Bis (30 %/0,8 %)	4,1 ml	3,6 ml	7,2 ml	13,6 ml
1 M Tris pH 8,8		10,2 ml	10,2 ml	10,2 ml
1 M Tris pH 6,8	3,7 ml			
H ₂ O	22,3 ml	12,8 ml	9,2 ml	2,8 ml
10 % SDS	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl
10 % APS	300 µl	100 µl	95 µl	85 µl
TEMED	41 µl	30 µl	24 µl	15 µl

Die zu untersuchenden Proben wurden mit reduzierendem 2 x SDS-Probenpuffer (mit 5 % β -Mercaptoethanol) versetzt, für 5 min auf 100 °C erhitzt und auf einem SDS-PAA-Gel der Größe 7,5 cm x 10 cm x 1,2 mm aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte unter Wasserkühlung bei konstanter Stromstärke von etwa 30 mA. Zur Abschätzung der Massen wurden Eichproteine parallel mit aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend mittels Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert.

Elektrophorese-Puffer:

25 mM Tris/HCl

192 mM Glycin

0,1 % SDS

2 x Probenpuffer:

50 % Glycerin

2 % SDS

0,5 % Bromphenolblau

50 mM Tris/HCl pH 6,8

Molekularmassenstandard:

HMW (high molecular weight)-Marker (Fluka): 205, 116, 97, 66, 45, 29 [kDa]

2.2.2.4 Western Blot Analyse

Die Proteine wurden entweder direkt (Slot Blot) oder nach der SDS-PAGE elektrophoretisch aus dem Gel heraus auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran NC, Schleicher & Schüll) transferiert. Für den Slot Blot wurde die Membran in die Apparatur (Höfer) eingespannt und zwischen 5 und 50 ng eines nativen Proteins in einem Volumen von 40 μ l (verdünnt in TBS) in die vorgesehene Öffnung pipettiert. Anschließend wurde für ca. eine Minute ein Vakuum angelegt, um die Proteine auf die Membran zu saugen. Der Nachweis der Proteine erfolgte analog zu elektrophoretisch transferierten Proteinen. Im Unterschied zum Slot Blot lagen diese allerdings nach der SDS-PAGE in denaturierter Form vor. Die elektrophoretische Übertragung der Proteine erfolgte mit Hilfe einer Blot-Kammer (Höfer) und dem Transfer-Puffer bei 4 °C entweder über Nacht bei 100 mA oder innerhalb einer Stunde bei 400 mA. Nach dem Transfer wurde die Membran kurz mit Wasser gewaschen; anschließend wurden die Proteine mit 0,2 % Ponceau S-Lösung (Serva) reversibel gefärbt, um die Markerproteine zu kennzeichnen.

Vor der Immundetektion wurden freie Bindungsstellen auf der Membran durch 5 % Milchpulver in TBS blockiert, um eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu vermeiden. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit einem Protein-

spezifischen Primär-Antikörper in einer Verdünnung von 1:75 bis 1:2000 in TBS/5 % Milchpulver. Nach dreimaligem Waschen mit TBS/0,1 % Tween 20 erfolgte die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper (1 h, RT), der den Fc-Teil des ersten Antikörpers erkennt. Nach erneutem Waschen wurde das Signal durch Chemilumineszenz mittels einer ECL (*enhanced chemoluminescence*)-Lösung sichtbar gemacht. Die ausgesendeten Lichtsignale wurden auf einem Röntgenfilm (RX-Super, Fujifilm) exponiert.

Transfer-Puffer:

50 mM Borsäure, pH 8,5
10 % Methanol

ECL-Lösung:

100 mM Tris/HCl pH 8,5
1,25 mM Luminol
225 nM Cumarin
0,03 % Wasserstoffperoxid

2.2.2.5 Analyse von GAG-Ketten

Proteoglykane treten aufgrund ihrer unterschiedlich langen Glycosaminoglycan (GAG)-Ketten in der Western Blot Analyse als polydisperse Bande in Erscheinung. Um zu analysieren, welche Art der GAG-Ketten an das Testican-1 Core-Protein angeheftet sind, wurden die GAG-Ketten mit verschiedenen Lyasen enzymatisch abgespalten. Durch Heparinase I und III werden Heparansulfat und durch Chondroitinase ABC Chondroitin- und Dermatansulfat abgespalten. Nach vollständiger Abspaltung der GAG-Ketten sollte die polydisperse Proteoglykan-Bande einer distinkten Bande in der Western Blot Analyse weichen. Für die Analyse von rekombinantem Testican-1 wurden ca. 200 ng gereinigtes Protein eingesetzt. Um endogenes Testican-1 zu analysieren, wurde das Protein zuvor entweder aus 4 ml konditioniertem Zellkulturüberstand oder aus 1 ml Gewebeextrakt (siehe Kapitel 2.2.2.1) immunpräzipitiert. Die Abspaltung der Zucker-Ketten mit den oben genannten Lyasen erfolgte in entsprechenden Puffern nach den Herstellerangaben. Je Ansatz wurden 2 µl Enzym verwendet, was den folgenden Enzymmengen entspricht:

2 µl Heparinase I = 200 mU

2 µl Heparinase III = 40 mU

2 µl Chondroitinase ABC = 20 mU

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

<u>Heparinase:</u>	<u>Chondroitinase:</u>	<u>Kombination:</u>
20 mM Tris/HCl pH 7,5	20 mM Tris/HCl pH 8.0	20 mM Tris/HCl pH 7,5
50 mM NaCl	50 mM NaCl	50 mM NaCl
4 mM CaCl ₂	50 mM NaAcetat pH 7,7	4 mM CaCl ₂
		nach H'ase Inkubation
		50 mM NaAcetat pH 7,7
		zugesetzt

2.2.2.6 Gelatine-Zymographie

Die Zymographie ist ein Verfahren, das die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen einer Probe mit einem Enzymaktivitätsassay kombiniert. In dieser Arbeit wurde mittels Gelatine-Zymographie überprüft, ob es im Gehirn Testican-1 defizienter Mäuse zu einer verstärkten Aktivierung von MMP-2 kommt. Dafür wurden zunächst Proteinextrakte aus Wildtyp und Testican-1 defizienten Gehirnen hergestellt (siehe Kapitel 2.2.2.1). Anschließend wurde die Proteinkonzentration mit dem *detergent compatible protein assay* (Bio-Rad) bestimmt und 10 µg des Proteinextrakts je Spur des Gels geladen. Die Proben wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt, das Enzymsubstrat (Gelatine) enthielt (Gel bei 20 mA 3-4 h laufen lassen). Nach der Elektrophorese wurde das SDS durch Waschen (3 x 30 min; RT) mit einer 2,5 %igen Triton X-100 Lösung aus dem Gel entfernt. Dadurch wurden die im Gel enthaltenen Proteine renaturiert. Anschließend wurde das Gel über Nacht bei 37 °C in MMP-Substratpuffer inkubiert. Während dieser Zeit können in dem Gel enthaltene Gelatinasen, die während der Elektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt wurden, ihr Substrat degradieren. Am folgenden Tag wurde das Gel eine Stunde mit Coomassie gefärbt und anschließend wieder entfärbt. Die Stellen des Gels, an denen sich eine Gelatinase befunden hat, erscheinen nun als farblose Bande. Generell gibt es zwei Gelatinasen, A und B (MMP-2 und MMP-9), deren Aktivität mit einer Gelatine-Zymographie untersucht werden kann. Da sich die inaktiven Formen (MMP-2: 72 kDa und MMP-9: 92 kDa) in ihrem Molekulargewicht von den aktiven Formen (MMP-2: 62 kDa

und MMP-9: 82 kDa) unterscheiden, können diese in der SDS-PAGE gut voneinander getrennt werden. Nach der Auftrennung in dem SDS-Gel werden auch die inaktiven Formen durch die Denaturierung und anschließende Renaturierung in dem Gel aktiviert. Somit können beide MMPs sowohl in ihrer aktiven als auch inaktiven Form detektiert werden.

	Sammelgel	Trenngel
	4 %	10 %
AA/Bis (30 %/0,8 %)	1 ml	4,66 ml
1,5 M Tris pH 8,8; 4 % SDS		3,5 ml
0,5 M Tris pH 6,8; 0,4 % SDS	1,2 ml	
H ₂ O	2,7 ml	1 ml
0,3 % Gelatine in H ₂ O (handwarm)		4,66 ml
10 % APS	50 µl	140 µl
TEMED	2,5 µl	7 µl
Bromphenolblau 5 mg/ml	100 µl	

Elektrophorese-Puffer:

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

5 x Probenpuffer:

60 mM Tris pH 6,8
2 % SDS
0,1 % Bromphenolblau
25 % Glycerol

MMP-Substrat-Puffer:

50 mM Tris pH 8.0
5 mM CaCl₂

Coomassie:

2,5 g Coomassie
250 ml Isopropanol
750 ml H₂O

Gelatine: Typ B *Bovine Skin*

Molekulargewichtsstandard: SeeBlue Pre-Stained Standard, Invitrogen
(205, 98, 64, 50, 36, 16, 6, 4 kDa)

2.2.3 Affinitätsreinigung von Antikörpern

2.2.3.1 Affinitätsreinigung des Testican-1 Antikörpers aus Kaninchen

Zu Beginn dieser Arbeit lag in unserer Arbeitsgruppe ein polyklonaler, affinitätsgereinigter Testican-1 Antikörper aus Kaninchen vor. Dieser zeigte jedoch neben dem spezifischen Signal Kreuzreaktivitäten zu unbekanntem Proteinen und Testican-2. Um diese Kreuzreaktionen zu entfernen, wurde das Serum an einer Affinitätssäule gekoppelt mit Wi26-Zellextrakt und über eine zweite Säule, gekoppelt mit Testican-2 Protein, angereichert. Anschließend wurden Testican-1 spezifische Antikörper mit Hilfe einer Testican-1 Affinitätssäule angereichert (Schema siehe Abb. 3.4).

Kopplungspuffer:

0,1 M NaHCO₃ pH 8,3
0,5 M NaCl

Complete-Proteaseinhibitor, Roche:

1 Tablette wurde in 2 ml H₂O aufgenommen und mit einer Verdünnung von 1:25 verwendet

Acetat-Puffer:

0,1 M NaAcetat pH 4.0
0,5 M NaCl

Tris-Puffer:

0,1 M Tris pH 8,0
0,5 M NaCl

Erstellung des Proteinextrakts aus Wi26-Zellen

Für die Erstellung des Proteinextrakts wurden Wi26 Zellen von 25 Platten (Ø 10 cm) verwendet. Die Zellen wurden 3 x mit PBS gespült und mit einem Schaber von den Platten abgekratzt. Anschließend wurden die Zellen in 6 ml Kopplungspuffer mit Proteaseinhibitor (Complete) aufgenommen, homogenisiert und 45 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde 30 min bei 21.000 x g, 4°C zentrifugiert und die Proteinkonzentration des Überstandes bestimmt. Der Proteinextrakt wurde im Anschluss daran an eine Säulenmatrix aus Cyanbromid (CNBr)-Sephrose gekoppelt.

Erstellung der Affinitätssäulen (Wi26 und Testican-1)

Für die Antikörperreinigung wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Affinitätssäulen hergestellt, an deren Säulenmatrix das Proteinextrakt aus Wi26 Zellen bzw. rekombinantes

Testican-1 Protein gekoppelt wurde. Die dritte, für die Reinigung des Antikörpers verwendete Affinitätsäule, mit gekoppeltem rekombinantem Testican-2 Protein, wurde mir freundlicherweise von Frau Schnepf zu Verfügung gestellt.

Die gewünschte Menge gefriergetrocknete CNBr-Sepharose wurde abgewogen (1 g ergibt 3,5 ml Gelvolumen) und im 1 mM HCl suspendiert. Nach mehrmaligem Wechseln der HCl-Lösung war die Matrix gequollen und aktiviert und konnte für die Kopplung von Proteinen verwendet werden. Da die Kopplung der Proteine an das Säulenmaterial über Aminogruppen erfolgte, wurde rekombinantes Testican-1 Protein, das in Tris-Puffer vorlag, vor der Kopplung zweimal 6 h und einmal 12 h bei 4 °C gegen Kopplungspuffer dialysiert, um das Tris zu entfernen.

Die in HCl suspendierte Matrix wurde zusammen mit dem Protein über Nacht bei 4 °C inkubiert. Für die Erstellung der Testican-1 Antigen-Säule wurden 500 µg rekombinantes Testican-1 Protein und 500 µl Gelmatrix verwendet. Um die Wi26-Zellextrakt-Säule zu erstellen wurden 27 mg Proteinextrakt mit 3 ml Gelmatrix inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Matrix abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Proteinkonzentration des Überstandes photometrisch bestimmt, um beurteilen zu können, ob die Kopplung des Proteins an die Matrix erfolgreich war. Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurde die Protein-gekoppelte Matrix für 2 h mit 0,1 M Tris pH 8,0 inkubiert. Anschließend wurde das Material in eine Säule gepackt und die Säule alternierend mit zehn Säulenvolumen Acetat- bzw. Tris-Puffer gewaschen. Der Vorgang wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurde die Säule in TBS äquilibriert.

Reinigung des Antikörpers

Zur Abreicherung der kreuzreagierenden Antikörper wurde das zentrifugierte (1 h, 21.000 x g, 4 °C) und anschließend mit TBS (1:1) verdünnte Testican-1 Serum aus Kaninchen langsam über die Wi26-Säule gegeben. Unspezifische Antikörper sollten an der Säule verbleiben. Der Durchfluss wurde im Anschluss über die Testican-2 gekoppelte Säule gegeben. Hier sollten ebenfalls nur unspezifische Antikörper an die Säule binden. Um die beiden Säulen im Anschluss zu regenerieren, wurden die gebundenen, unspezifischen Antikörper mit 3 M Kaliumthiocyanat (KSCN) von der Säule eluiert. Die Säulen wurden sofort nach der Elution mit 10 Säulenvolumen TBS gewaschen und in TBS mit 0.01 % Azid bei 4°C gelagert.

Zuletzt wurden spezifische Antikörper über die Testican-1 gekoppelte Säule angereichert. Hierbei sollten die spezifischen Antikörper auf der Säule verbleiben. Dazu wurde der Durchfluss der beiden ersten Säulen langsam auf die Testican-1 Säule gegeben. Im Anschluss wurde die Säule mit fünf Säulenvolumen TBS gewaschen. Die an der Säule angereicherten Testican-1 Antikörper wurden mit 8 Fraktionen zu je 2 ml 3 M KSCN von der Säule eluiert. Um die Antikörper und das an die Säule gebundene Testican-1 durch das KSCN nicht zu denaturieren, wurde die Säule sofort nach der Elution mit zehn Säulenvolumen TBS gespült und der eluierte Antikörper gegen TBS dialysiert. Dies geschah innerhalb von 30 min ab Beginn der Elution. Nach der Dialyse wurde von allen Antikörper-Fraktionen die Konzentration photometrisch bestimmt. Fraktionen mit einer Konzentration von mehr als 50 µg/ml wurden vereinigt und noch einmal vermessen. Es ergab sich eine Antikörperkonzentration von 360 µg/ml für den gereinigten Testican-1 Antikörper aus Kaninchen (rb-T1). Die Säule wurde anschließend ebenfalls in TBS mit 0,01 % Azid gelagert.

2.2.3.2 Affinitätsreinigung des Testican-1 Antikörpers aus Huhn

Der zweite in dieser Arbeit verwendete polyklonale Testican-1 Antikörper aus Huhn wurde lediglich affinitätsgereinigt. Dazu wurde die Testican-1 gekoppelte Säule verwendet. Im Anschluss an die Affinitätsreinigung zeigten sich keinerlei Kreuzreaktivitäten, so dass eine weitere Reinigung nicht nötig war. Für den affinitätsgereinigten Testican-1 Antikörper aus Huhn (ck-T1) ergab sich eine Konzentration von 110 µg/ml.

2.2.3.3 Affinitätsreinigung des Testican-2 Antikörpers aus Kaninchen

Der polyklonale Testican-2 Antikörper aus Kaninchen (rb-T2) wurde analog zu dem rb-T1 Antikörper gereinigt (Reinigungsschema siehe Abb. 3.4). Allerdings wurde zur Abreicherung der unspezifischen Kreuzreaktivität eine Säule gekoppelt mit Proteinextrakten aus EBNA-Zellen verwendet, die mir freundlicherweise von Frau Schnepf zu Verfügung gestellt wurde. Anschließend wurde die Kreuzreaktivität zu Testican-1 mit Hilfe einer Säule gekoppelt mit rekombinantem Testican-1 Protein abgereichert. Die Anreicherung spezifischer Testican-2 Antikörper erfolgte über eine Säule gekoppelt mit rekombinantem Testican-2 (vgl. Kapitel 2.2.3.1).

2.2.4 Histologische Methoden

2.2.4.1 Präparation von Gefrier- und Paraffinschnitten

Wildtyp und Testican-1 defiziente Mäuse wurden durch Äther/Chloroform (im Verhältnis 1:1) betäubt und getötet. Anschließend wurden die Gehirne entnommen und für Gefrierschnitte in Tissue-Tek-Einbettlösung (Sakura) auf Trockeneis oder in Stickstoffdampf eingefroren. Die Blöckchen wurden bei -80 °C gelagert. Für Paraffinschnitte wurden die Gehirne für ca. eine Stunde in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert, 15 min in PBS gewaschen und über Nacht in 70 % Ethanol bei 4 °C inkubiert. Die Paraffineinbettung erfolgte mit einem Einbettautomaten (Citadell 1000, Shandon) mit folgendem Programm: jeweils 1 h 70 %, 80 %, 90 %, 96% Ethanol, 3 x 2 h 100 % Ethanol und 3 x 1,5 h Xylol, 2 h Paraffin Nr. 3, 3 h Paraffin Nr. 6. Zur endgültigen Einbettung wurden die Gehirne in Einwegplastik-Cubes mit flüssigem Paraffin überführt, ausgerichtet und zur Aushärtung auf eine Kühlplatte gestellt. Die Lagerung der Blöckchen erfolgte bei 4 °C.

Die Anfertigung von Gefrierschnitten erfolgte bei einer Temperatur von ca. -18 °C in einem Kryostat (Leika). Dabei wurden sagittale Gehirnschnitte mit einer Dicke von 7 µm erstellt. Die Schnitte wurden auf Objektträger (Shannon) überführt und bei -20 °C gelagert. Von in Paraffin eingebetteten Gehirnen wurden ebenfalls Sagittalschnitte angefertigt. Hierzu wurde ein Mikrotom (Microtom GmbH) verwendet. Die 6 µm dicken Schnitte wurden zum Strecken in ein 40 °C warmes Wasserbad und anschließend auf Objektträger (Shannon) überführt. Zum Trocknen wurden die Objektträger über Nacht auf eine Heizplatte (37 °C) gelegt. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur gelagert.

4 % Paraformaldehyd:

400 ml ddH₂O auf 60 °C erwärmen

20 g Paraformaldehyd einrühren

1 N NaOH zugeben bis die Lösung wieder klar ist

50 ml 10 x PBS zugeben

pH-Wert mit HCl auf 7,4 einstellen

auf 500 ml mit ddH₂O auffüllen

Aliquots bei -20 °C lagern

2.2.4.2 Färbungen

Kresylechtviolett-Färbung

Die Gefrierschnitte wurden 10 min getrocknet, 5 min mit PBS gewaschen und 10 min mit 2 % PFA (siehe Kapitel 2.2.4.1) fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (5 min) wurden die Schnitte mit der auf 60 °C erwärmten Färbelösung in einer Küvette inkubiert. Anschließend wurden die Präparate zur Entwässerung und zur Differenzierung kurz in 70 %, 96 % und 100 %igen Alkohol getaucht und mit Entellan (Merck) eingebettet.

Stammlösung:

2 g Kresylechtviolett (Chroma)

100 ml ddH₂O

Puffer:

2 g NaAcetat

3 ml Eisessig

1 l ddH₂O

Färbelösung:

1 ml Stammlösung

100 ml Puffer

Vor Gebrauch filtrieren

Immunhistochemische Färbung (DAB-Färbung)

Zur Lokalisierung Testican spezifischer Signale im Gehirn wurden Gefrierschnitte mit Diaminobenzidin (DAB)-Lösung gefärbt. Die Gefrierschnitte wurden zunächst eine Stunde bei RT getrocknet, mit Fixogum umrandet und mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Gewebe 5 min mit 0,5 % PFA fixiert und 3 x mit PBS gewaschen. Um eine endogene Peroxidaseaktivität zu inhibieren wurden die Präparate 5 min mit 0,3 % *Normal Goat Serum* (NGS)/0,3 % H₂O₂ inkubiert und anschließend 3 x mit PBS/Tween gewaschen. Die Blockierung erfolgte 1 h bei RT mit 1,5 % NGS in PBS/Tween. Während der Blockierung wurde der Testican-1 Antikörper (rb-T1) mit rekombinantem Testican-2 inkubiert (im Verhältnis Antikörper:Protein 5:1; bezogen auf mg), um die Kreuzreaktivität des Antikörpers mit Testican-2 zu inhibieren. Anschließend erfolgte die Inkubation des Primäantikörpers über Nacht bei 4 °C, wobei die Antikörper in der Blockierungslösung verdünnt wurden. Alle drei Testican spezifischen Antikörper (rb-T1, rb-T2 und der Testican-3 Antikörper), die in der Immunhistochemie verwendet wurden, wurden mit einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Nach der Inkubation des Primäantikörpers wurden die Schnitte 3 x mit PBS/Tween gewaschen und eine Stunde mit dem biotinylierten Sekundäantikörper (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories), in einer Verdünnung von 1:200 inkubiert. Die Schnitte wurden erneut mit PBS/Tween gewaschen und zur Signalverstärkung 30 min mit einer Avidin-Biotin Lösung inkubiert. (Avidin und Biotin

wurden zuvor bereits nach Angaben des Herstellers zur Reaktion gebracht.) Nach dreimaligem Waschen mit PBS/Tween und kurzem Spülen mit PBS ohne Detergenz wurden die Präparate mit der DAB-Lösung inkubiert, bis die gewünschte Fabintensität erreicht war. Anschließend wurden die Schnitte 3 x 5 min mit PBS und 1 x 5 min mit H₂O gewaschen, getrocknet und mit Elvanol eingebettet.

DAB-Lösung:

50 µl DAB (40 mg/ml)
2,5 ml 0,6 % NiSO₄
500 µl 1 M Tris pH 7,5
2 ml H₂O
25 µl DMSO
5 µl 3 % H₂O₂

Elvanol:

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

Immunfluoreszenz-Färbung

Zur Detektion verschiedener neuronaler Proteine (2H3, Neurofilament; SV2, *synaptic vesicle protein 2*; NSE, *neuron specific enolase*; GFAP, *glial fibrillary acidic protein*) im Gehirn von Wildtyp und Testican-1 defizienten Mäusen wurde in dieser Arbeit die indirekte Immunfluoreszenz-Färbung verwendet. Dabei wurde ein spezifischer Antikörper an das Antigen gebunden und mit einem Cy3 markierten Sekundärantikörper visualisiert. Bei der Cy3-Markierung handelt es sich um das Fluochrom-Indocabocyanin, das eine maximale Absorption bei 553 nm (grün) und Emission bei 575 nm (rot) aufweist.

Um eine bessere Erhaltung der Morphologie des Gehirns zu gewährleisten, wurden für diese Art der Färbung Paraffinschnitte verwendet. Dies war aus technischen Gründen für die Färbungen mit den Testican spezifischen Antikörpern nicht möglich. Zur Entparaffinierung wurden die Gewebeschnitte wie folgt behandelt:

- 2 x 5 min Xylol
- 2 min 100 % Ethanol
- 2 min 100 % Ethanol
- 2 min 96 % Ethanol
- 2 min 70 % Ethanol
- 2 min PBS

Anschließend wurden die Schnitte mit einem Fettstift (Dako Pen) umrandet und mit 1,5 % NGS in PBS/Tween blockiert (1 h, RT). Die Inkubation des Primärantikörpers, welcher in der Blockierungslösung verdünnt wurde, erfolgte über Nacht bei 4 °C (2H3 1:100; SV2 1:500; NSE 1:500; GFAP 1:500). Die Schnitte wurden 3 x mit PBS/Tween gewaschen und mit dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert (1 h, RT). Die Verdünnung des Sekundär-antikörpers (1:800) erfolgte ebenfalls in der Blockierungslösung. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS/Tween wurden die Schnitte kurz mit PBS gespült, getrocknet und mit Elvanol (siehe DAB-Färbung) eingebettet.

2.2.5 Methoden zum Gene-Targeting

2.2.5.1 Präparation embryonaler Fibroblasten

Embryonen eines Neomycin-resistenten Mausstammes (CD1_Neo) wurden zwischen Tag 12 und Tag 14 p.c. aus dem Uterus entnommen. Nach Entfernung von Kopf und Eingeweiden wurden die Embryonen mit einem Skalpell zerkleinert. Jeweils zehn dieser Embryonen wurden in 10 ml Medium (ohne FCS) aufgenommen mit 1 ml 10 x Trypsin (0,5 %) versetzt und 10 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Durch die Behandlung mit Trypsin kann das Gewebe dissoziiert werden. Nach 10 min wurden 5 ml Überstand, welcher einzelne Zellen enthält, abgenommen und mit 5 ml serumhaltigen Medium versetzt. Anschließend wurden die Zellen kurz zentrifugiert, in frischem EMFI (embryonale Fibroblasten)-Medium resuspendiert und ausplattiert. Zu dem restlichen Gewebe wurden 5 ml PBS und 0,5 ml 10 x Trypsin zugegeben und erneut bei 37 °C inkubiert. Das Prozedere wurde wiederholt, bis sich das Gewebe vollständig aufgelöst hatte. Insgesamt wurden je Zellkulturplatte (Ø 15 cm) die Zellen von zwei bis drei Embryonen ausplattiert. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in wassergesättigter Atmosphäre bis zur Konfluenz kultiviert (ca. 2 Tage) und anschließend eingefroren (siehe Kapitel 2.2.6). Dabei wurde eine Platte auf fünf Einfrierröhrchen verteilt.

EMFI-Medium:

DMEM (*high glucose*)

10 % FCS

2 mM Glutamin

100 U/ml Penicillin/Streptomycin

2.2.5.2 Mitomycin-Behandlung embryonaler Fibroblasten

Embryonale Fibroblasten dienen als Substrat, um darauf embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) zu kultivieren. Damit die ES-Zellen nicht von den Fibroblasten überwachsen werden, wurde deren Mitose durch Behandlung mit Mitomycin inhibiert. Dazu wurde Mitomycin in einer Endkonzentration von 10 µg/ml dem Medium einer konfluenten Zellkulturplatte zugesetzt. Die Zellen wurden für mindestens 2 h bei 37 °C inkubiert, 3 x mit PBS gründlich gewaschen, durch Trypsin (0,05 %) von der Platte abgelöst (5 min, 37 °C) und in frischem EMFI-Medium aufgenommen. Anschließend wurden Zellen auf Gelatine beschichteten Zellkulturschalen in derselben Dichte wieder ausplattiert. Für die Gelatinebeschichtung wurden die Platten mit PBS/0,1 % Gelatine für 15 bis 30 min bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag konnten ES-Zellen auf den Mitose-Inaktivierten Fibroblasten kultiviert werden.

Gelatine: Bovine skin Typ B 2 %ige-Stocklösung, Sigma

2.2.5.3 Kultur von embryonalen Stammzellen

ES-Zellen der Linie IB10 [Hooper, 1987] wurden auf Neomycin-resistenten, Mitose-inaktivierten embryonalen Fibroblasten (Kulturschalen Ø 10 cm) in wassergesättigter Atmosphäre und 5 % CO₂ bei 37 °C mit ES-Zell-Medium kultiviert. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage passagiert. Dazu wurden die ES-Zellen mit 0,05 % Trypsin von der Platte abgelöst, durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vereinzelt, gesplittet und schließlich in frischem Medium auf neuen embryonalen Fibroblasten ausplattiert. Für die Präparation genomischer DNA wurden die ES-Zellen mit EMFI-Medium kultiviert.

ES-Zell-Medium:

DMEM (*high glucose*)

20 % Serum Replacement

1 mM β-Mercaptoethanol

1 % 100 x MEM (non essential aminoacids)

1 mM Na-Pyruvat

2 mM Glutamin

1500 U/ml LIF

100 U/ml Penicillin/Streptomycin

2.2.5.4 Elektroporation und Selektion embryonaler Stammzellen

Vier Stunden vor der Elektroporation wurde ein Mediumwechsel der ES-Zellen durchgeführt. Für die Elektroporation wurden konfluente Zellen einer Zellkulturplatte Ø 10 cm verwendet. Die ES-Zellen wurden trypsinisiert, 5 min bei 200 x g abzentrifugiert und in 9 ml PBS/25 mM NaCl resuspendiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert, in 750 µl PBS/25 mM NaCl aufgenommen und zusammen mit 30 µg linearisiertem Targeting-Konstrukt 5 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden anschließend zusammen mit der DNA in eine Elektroporationsküvette überführt (Elektrodenabstand: 0,4 cm, Bio-Rad). Die Elektroporation wurde mit 500 µF und 230 V in einem *GenePulser* (Bio-Rad) durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in ES-Zell-Medium resuspendiert und auf vier Zellkulturschalen mit embryonalen Fibroblasten ausplattiert. Nach 24 Stunden wurde das ES-Zell-Medium durch Selektionsmedium (ES-Zell-Medium mit 350 µg/ml G418) ersetzt. Die Selektion von ES-Zellen mit integriertem *Targeting*-Konstrukt erfolgte 7-9 Tage, wobei das Medium täglich gewechselt wurde. G418 resistente Zell-Klone wurden unter dem Mikroskop mit einer Eppendorf-Pipette isoliert, auf 96-Lochplatten überführt und 5 min mit 50 µl Trypsinlösung (0,05 %) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Pipettieren vereinzelt. Durch Zugabe von 25 µl Trypsininhibitor (10 mg/ml) wurde das Trypsin inaktiviert. Die Zellen wurden auf 24-Lochplatten überführt, die bereits 800 µl ES-Zell-Medium je Loch enthielten. Waren die ES-Zellen bis zur Konfluenz gewachsen, wurden 2/3 eines jeden ES-Zell-Klons eingefroren; das verbleibende Drittel wurde für die Präparation von DNA auf 48-Lochplatten überführt.

2.2.5.5 Einfrieren von embryonalen Stammzellen

Waren die ES-Zellen bis zur Konfluenz gewachsen, wurde zunächst das Medium der entsprechenden Vertiefung der 24-Lochplatten abgesaugt. Die Zellen wurden 5-10 min mit 150 µl Trypsin (0,05 %) inkubiert. Anschließend wurden 50 µl Trypsininhibitor (10 mg/ml) und 700 µl ES-Zell-Medium zugegeben. Die Zellen wurden gut vereinzelt. Für die Präparation von DNA wurden 300 µl der resuspendierten Zellen auf 48-Lochplatten überführt. Die verbleibenden 600 µl wurden in Einfrierröhrchen (Greiner-Labortechnik) pipettiert und mit demselben Volumen 2 x Einfrier-Medium versetzt. Durch vorsichtiges Schütteln wurden die Zellen mit dem Einfrier-Medium gemischt, auf Trockeneis eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

2 x Einfrier-Medium:

33 ml ES-Zell-Medium

10 ml DMSO

7 ml Serum Replacement

2.2.6 Zellkulturarbeiten

Alle in dieser Arbeit verwendeten Säugetierzellen wurden in Brutschränken bei 5-7 % CO₂, 37 °C und wassergesättigter Atmosphäre kultiviert.

Auftauen von Zellen

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

Passagieren von Zellen

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

Zellkulturmedien:

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

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

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

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

Ernte serumfreier Überstände

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

Einfrieren von Zellen

Nach Ablösung der Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung und anschließenden Zentrifugieren wurden die Zellen in Einfriermedium (Medium mit 20% FCS und 10 % DMSO) aufgenommen und die Zellen vereinzelt. Das DMSO soll die Bildung von Eiskristallen beim Einfrierprozess verhindern. Die Zellsuspension wurde in Cryo-Röhrchen (Greiner-Labortechnik) überführt und langsam bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur genomischen Organisation des Testican-1 Gens

3.1.1 Das Testican-1 Gen

Die genomische Organisation des murinen Testican-1 Gens konnte bereits zuvor weitestgehend aufgeklärt werden [Röll, 2000]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Exon-Intron Übergänge untersucht, um zu bestimmen, aus wie vielen Exons das murine Testican-1 Gen aufgebaut ist. Zusätzlich wurde die genomische Organisation des murinen Gens mit dem humanen Gen verglichen. Bei diesen Analysen blieben jedoch noch drei Fragen offen: 1. Wo und auf welchem Chromosom ist das Testican-1 Gen lokalisiert? 2. Wo befindet sich der Transkriptionsstart des Testican-1 Gens? 3. Handelt es sich bei der für die drei Aminosäuren EVE codierenden cDNA-Sequenz um ein eigenständiges Exon, das alternativ gespleißt werden kann?

3.1.1.1 Chromosomale Lokalisation

Vorweg sei gesagt, dass diese Analyse zu einem Zeitpunkt durchgeführt wurde, als die Sequenz des Maus Genoms [Waterston, 2002] noch nicht veröffentlicht war. Zur Bestimmung der chromosomalen Lokalisation des murinen Testican-1 wurde die Methode des *Radiation Hybrid (RH) Mapping* verwendet [McCarthy, 1997]. Dazu wurden 100 verschiedene Hybrid DNAs, bestehend aus T31 Maus und Hamster DNA, als Matrize in eine PCR-Reaktion eingesetzt. Die für die PCR-Reaktion benötigten Primer wurden anhand der Intron 2 (mpreEVE_S; Primer in sense Orientierung) und Intron 3 (EVE_AS; Primer in antisense Orientierung) Sequenz des Testican-1 Gens konstruiert, so dass sich eine Fragmentgröße von 480 bp ergab. Nach Auftrennung wurde ausgewertet, welche Hybrid DNA ein PCR Produkt und welche kein Produkt ergaben.

Diese Daten wurden der Jackson Laboratory Radiation Hybrid Datenbank (<http://www.jax.org/resources/dokuments/cmdata/rhmap/rhsubmit.html>) übermittelt, die dann die Position des Testican-1 Gens in Bezug auf bekannte genomische Marker bestimmen konnte. Die Analyse wurde zur Bestätigung wiederholt. Beide Male konnte das

Testican-1 Gen auf Chromosom 13 zwischen den Genen Rab24 (Mitglied der Ras Superfamilie; benannt nach dem Organ aus dem es zuerst isoliert wurde: *rat brain*) und Tpbpa (*trophoblast specific protein alpha*) lokalisiert werden und befindet sich 35 cM entfernt vom Centromer. Die hier gewonnenen Daten decken sich mit den Daten heute zugänglicher Genom-Datenbanken.

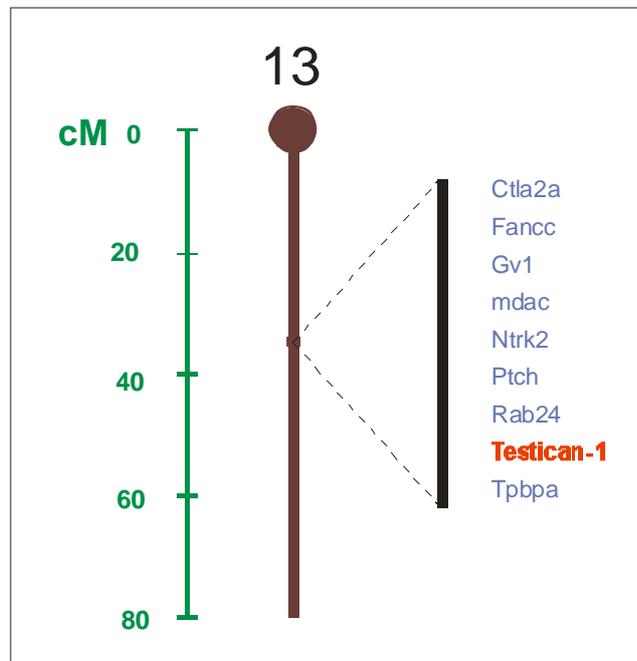


Abb. 3.1: Chromosomale Lokalisation des murinen Testican-1 Gens

Das murine Testican-1 Gen befindet sich auf Chromosom 13,35 cM entfernt vom Centromer, zwischen den Genen Rab24 und Tpbpa.

3.1.1.2 Transkriptionsstart

1996 war es Bonnet et al. gelungen, die cDNA des Testican-1 Gens aus einer murinen cDNA Gehirn Bibliothek zu isolieren [Bonnet, 1996]. Es blieb jedoch offen, an welcher Position sich der Transkriptionsstart des Gens befindet. Durch reverse Transkription (RT) von Maus Gehirn RNA und anschließende Polymerase-Kettenreaktion (PCR) konnte dieser nun näherungsweise ermittelt werden. Dazu wurde zunächst in einer RT-Reaktion mittels eines in Exon 5 (Ex4a) gelegenen antisense Primers die Testican-1 spezifische cDNA gewonnen, die dann als Matrize in die anschließende PCR-Reaktion eingesetzt wurde. Für die PCR-Reaktion wurden als sense Primer verschiedene Oligonukleotide verwendet, die sich im Abstand von ca. 100 Basen 5' des codierenden Bereichs des Testican-1 Gens befanden (Ex1s/NCR1/NCR2-2). In Abbildung 3.2A ist schematisch die Position der Primer dargestellt. Als antisense Primer diente ein Exon 2 spezifisches

Oligonukleotid (Ex2a). Nur mit den Primerpaaren Ex1s/Ex2a und NCR1/Ex2a kam ein PCR-Produkt zustande (in rot gekennzeichnet), nicht aber mit dem weiter 5' gelegenen sense Primer NCR2-2. Dies bedeutet, dass sich der Promotor des murinen Testican-1 Gens zwischen den Primern NCR1 und NCR2-2, also zwischen 187 und 309 Basenpaaren 5' des Transkriptionsstarts (ATG) befindet. Die in der PCR verwendeten Primerpaare wurden zuvor alle auf genomischer DNA auf Funktionalität geprüft. Um sicherzustellen, dass die PCR-Produkte wirklich Testican-1 spezifisch sind, wurde nach der Auftrennung im Agarosegel eine Southern Blot Analyse durchgeführt. Die Hybridisierung erfolgte mit einem Exon 1 spezifischen Oligonukleotid (Ex1a). In Abbildung 3.2B ist das entsprechende Autoradiogramm dargestellt.

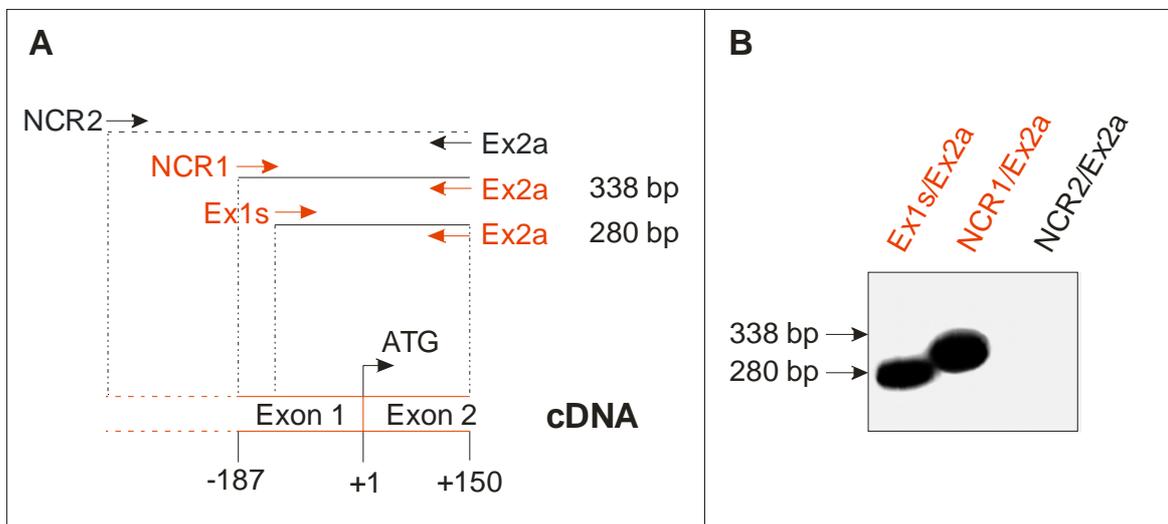


Abb. 3.2: Transkriptionsstart-Analyse des murinen Testican-1 Gens durch RT-PCR

A: Schematische Darstellung der Position von im Experiment verwendeten Primerpaaren.

B: Autoradiogramm

Durch reverse Transkription mit einem Testican-1 spezifischen Oligonukleotid wurde zunächst eine cDNA hergestellt. Die anschließenden PCR-Reaktionen wurde mit verschiedenen sense Primern durchgeführt, die anhand der genomischen Sequenz 5' des ATG's von Testican-1 generiert worden waren und einem antisense Primer in Exon 2 (Ex2a). Mit in rot gekennzeichneten Primerpaaren entstand ein PCR Produkt. Durch Southern Blot Analyse und Hybridisierung mit einem Exon 1 spezifischen Oligonukleotid (Ex1a) wurde bestätigt, dass es sich bei dem Produkt tatsächlich um Testican-1 handelt. Da die beiden sense Primer NCR1 und NCR2-2 122 bp voneinander entfernt liegen und nur mit dem ersten Primer ein PCR-Produkt entstand, muss sich der Transkriptionsstart zwischen diesen Primern befinden.

3.1.1.3 Alternatives Spleißen

Wie bereits in Kapitel 1.7.2 erwähnt wurde vermutet, dass es sich bei der Testican-1 cDNA Sequenz 3' von Exon 2, welche für die drei Aminosäuren EVE (Glutamat-Valin-Glutamat) codiert, um ein eigenständiges Exon, das alternativ gespleißt werden kann. Dies galt es nun durch RT-PCR Analyse auf Maus Gehirn RNA zu bestätigen. Es wurde Gesamt-RNA aus

Maus Gehirnen verschiedenen Alters verwendet, um gleichzeitig beurteilen zu können, ob sich das Expressionsmuster während der postnatalen Entwicklung der Maus verändert. Um die RT-Reaktion durchzuführen, wurde in diesem Fall ein Oligo-dT-Primer verwendet. Die Oligonukleotide für die anschließende PCR-Reaktion wurden 5' (Ex2s2) und 3' (Ex4a) der für EVE codierenden Sequenz gewählt, so dass sich ein PCR-Produkt von 211 bp für das Testican-1 Transkript mit und 202 bp für das Transkript ohne EVE ergibt. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem hoch auflösenden Agarosegel. Um zu verifizieren, dass es sich bei den PCR-Produkten um Testican-1 Fragmente handelt, wurde anschließend eine Southern Blot Analyse durchgeführt. Die Hybridisierung erfolgte mit einem Exon 4 spezifischen Oligonukleotid (Ex3a). (Früher war noch davon ausgegangen worden, das Testican-1 aus 11 Exons besteht und die drei Aminosäuren EVE nicht von einem eigenen Exon codiert werden. Daher stimmt ab Exon 3 die Nummerierung der Oligonukleotide nicht mit der Nummerierung der Exons überein.) Das Autoradiogramm in Abbildung 3.3 zeigt beide Spleißvarianten des Testican-1 Gens unabhängig vom Entwicklungszustand der Maus. Abschließend kann festgehalten werden, dass das murine Testican-1 Gen tatsächlich aus 12 Exons besteht und das Exon, welches für die Aminosäuren EVE codiert alternativ gespleißt werden kann.

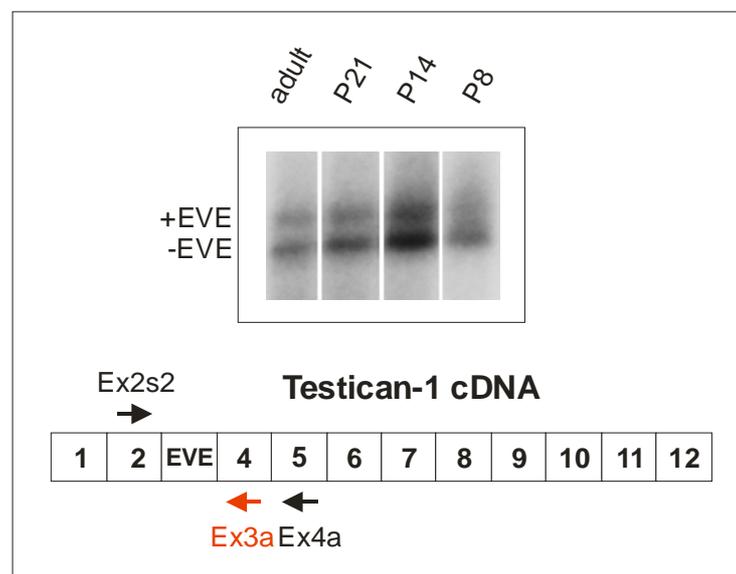


Abb. 3.3: Alternatives Spleißen des Microexons EVE

Das dritte Exon von Testican-1 codiert für die drei Aminosäuren Glutamat-Valin-Glutamat (EVE) und wird unabhängig vom Alter der Maus alternativ gespleißt. Oben ist das Autoradiogramm der RT-PCR Analyse gezeigt und unten schematisch die Position der Oligonukleotide der PCR in schwarz. In rot ist die Position des Oligonukleotids angegeben, das zur Hybridisierung des Southern Blots verwendet wurde. (P: Postnatal Tag)

3.1.2 Affinitätsreinigung und Charakterisierung von Antikörpern

In unserer Arbeitsgruppe waren bereits mehrere Antikörper gegen Proteine der Testican Familie hergestellt worden. Aufgrund der ähnlichen Aminosäuresequenz zeigten alle Rohseren eine starke Kreuzreaktivität gegenüber anderen Familienmitgliedern. Da aber spezifische Antikörper unabdingbar für die Analyse der Testican-1 bzw. -3 defizienten Mäuse sind, wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Testican Antikörper affinitätsgereinigt. Der Testican-3 Antikörper aus Kaninchen wurde von Herrn Hechler (Institut für Biochemie II) gereinigt, charakterisiert und zur Verfügung gestellt.

3.1.2.1 Testican-1 Antikörper aus Kaninchen

Zu Beginn dieser Arbeit war in unserer Arbeitsgruppe schon ein affinitätsgereinigter, polyklonaler Testican-1 Antikörper aus Kaninchen (rb-T1) vorhanden. Während der Charakterisierung dieses Antikörpers zeigte sich jedoch trotz der Affinitätsreinigung in einer Western Blot Analyse von Proteinextrakten verschiedener Zelllinien, entsprechenden Zellüberständen und rekombinanten Proteinen (Testican-1, -2 und -3) noch immer eine Kreuzreaktivität gegenüber Testican-2 sowie anderen unbekanntem Proteinen. Um diese Kreuzreaktionen zu entfernen, wurde erneut eine Affinitätsreinigung durchgeführt. Ausgehend vom Rohserum wurden die unspezifischen Antikörper gegen die unbekanntem Proteine über eine Cyanbromid (CNBr)-Sephrose Säule mit kovalent gekoppeltem Wi26 Proteinextrakt abgereichert. Dieser Reinigungsschritt wurde zweimal durchgeführt. Anschließend wurden die mit Testican-2 reagierenden Antikörper über eine Testican-2 Säule (rekombinantes Testican-2 kovalent an CNBr-Sephrose gekoppelt) aus dem Serum entfernt. Im Anschluss daran erfolgte eine Anreicherung der Testican-1 spezifischen Antikörper an eine Testican-1 Säule (rekombinantes Testican-1 kovalent an CNBr-Sephrose gekoppelt). Die an die Säule gebundenen Testican-1 Antikörper wurden mit 3 M Kaliumthiocyanat (KSCN)-Lösung eluiert. Um eine Denaturierung der Antikörper durch das KSCN zu verhindern, wurden die Antikörper nach der Elution sofort gegen TBS dialysiert und anschließend photometrisch die Konzentration des Antikörpers bestimmt. In Abbildung 3.4 sind in einem Flussdiagramm schematisch die einzelnen Reinigungsschritte des Testican-1 Antikörpers aus Kaninchen dargestellt.

Für die Abreicherung der mit unbekanntem Proteinen reagierenden Antikörper wurden Proteinextrakte aus Wi26 Zellen verwendet, da diese in einem Vorversuch kein Testican-1 spezifisches Signal zeigten. Außerdem handelte es sich bei diesem Signal um eine scharfe Bande und nicht um den sonst für Proteoglykane so typischen (hochmolekularen) Schmier. Daher ist davon ausgegangen worden, dass es sich bei der scharfen Bande mit einem niedrigen Molekulargewicht um ein unspezifisches Signal handelt. Da die Western Blot Analyse bei Proteinextrakte aus Wi26 Zellen ausschließlich dieses unspezifische Signal zeigte, wurden diese für die Abreicherung verwendet.

Der Reinigungserfolg wurde nach jeder Säule durch Western Blot Analyse mit verschiedenen Zellextrakten und rekombinanten Proteinen (Testican-1 und -2) überprüft. Auch nach der aufwendigen Reinigung bestand noch eine Kreuzreaktivität gegenüber rekombinatem Testican-2. Diese Kreuzreaktivität konnte durch die Inkubation des Antikörpers mit rekombinatem Testican-2 (im Verhältnis 5:1 / AK:Protein bezogen auf die absolute Proteinmenge) inhibiert werden.

Im Anschluss wurde untersucht, ob der Antikörper zu weiteren Proteinen der BM-40 Familie Kreuzreaktivitäten aufweist. Eine Kreuzreaktivität des Antikörpers wurde sowohl im nativen als auch im denaturierten Zustand der Proteine überprüft. In der Slot Blot Analyse wurde untersucht, ob der Antikörper in der Lage ist, spezifisch natives Testican-1 Protein zu detektieren. Dies ist eine wichtige Voraussetzung, da der Antikörper für die immunhistologische Analyse der Wildtyp- bzw. der Testican-1 und -3 defizienten Mäuse eingesetzt werden sollte und dabei das Protein in der nativen Form vorliegt. Dazu wurden alle zu Verfügung stehenden rekombinanten Proteine der BM-40 Familie in nativem Zustand auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen und mit dem inhibierten Testican-1 Antikörper (Verdünnung 1:150) inkubiert. Es zeigt sich ein Signal mit SC1, das bei ca. der zehnfachen Menge SC1 im Vergleich zu Testican-1 auftritt (siehe Abb. 3.5 A). Eine Inhibition des SC1 Signals mit rekombinatem SC1 Protein war nicht erfolgreich.

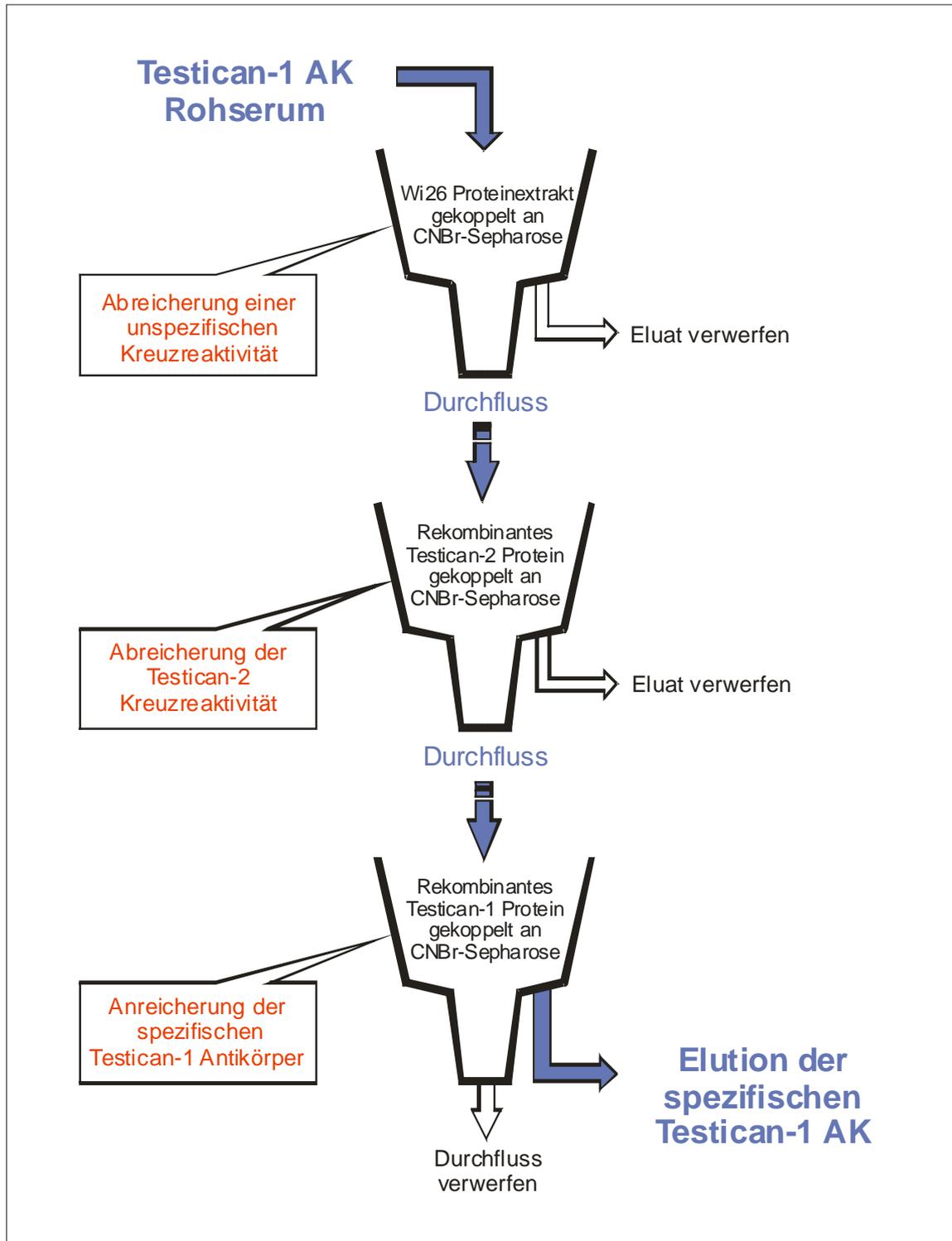


Abb. 3.4: Flussdiagramm zur Affinitätsreinigung des rb-Testican-1 Antikörpers

Unspezifische, gegen unbekannte Proteine gerichtete Antikörper aus dem Rohserum wurden über Proteinextrakt aus Wi26 Zellen, gekoppelt an eine CNBr-Sepharose Matrix, abgereichert. Gegen Testican-2 gerichtete Antikörper wurden über rekombinantes Testican-2 Protein, das an die Säulenmatrix gekoppelt war, abgereichert. Anschließend erfolgte eine Anreicherung der spezifischen gegen Testican-1 gerichteten Antikörper. Dazu war rekombinantes Testican-1 Protein an das Säulenmaterial gekoppelt worden. (CNBr: Cyanbromid).

Anschließend wurde der rb-T1 Antikörper auf Funktionalität unter denaturierenden Bedingungen geprüft. Dazu wurden je 20 ng derselben Proteine der BM-40 Familie einer SDS-PAGE und anschließender Western Blot Analyse unterzogen (Abb. 3.5B). Für die Immundetektion wurde der rb-T1 Antikörper ebenfalls mit rekombinantem Testican-2 inhibiert. Unter diesen Bedingungen reagiert er, wenn auch in geringerer Intensität, noch mit SC1. Da Testican-1 und SC1 aber sehr unterschiedlich in ihrer Größe sind, können sie trotzdem in der Western Blot Analyse eindeutig voneinander unterschieden werden.

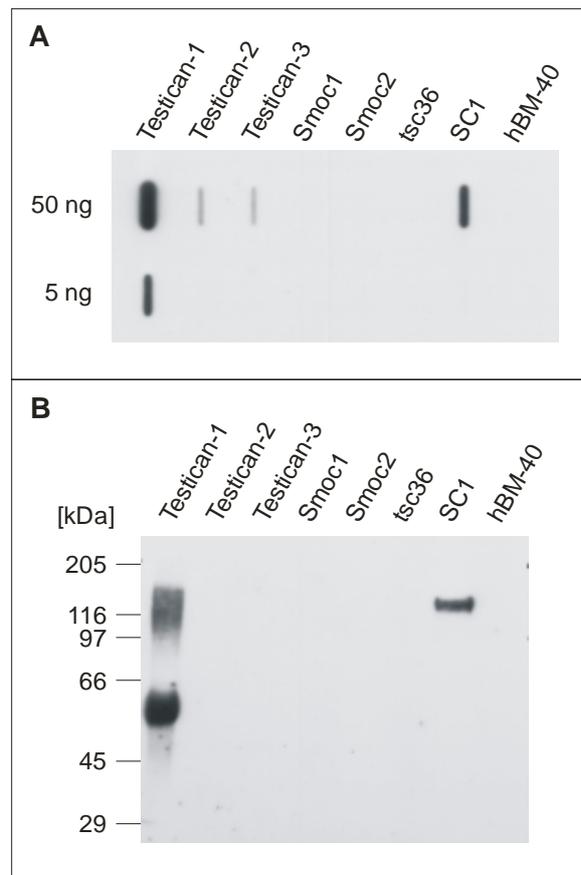


Abb. 3.5: Untersuchung der Kreuzreaktion des rb-T1 Antikörpers unter

A: -nativen (Slot Blot Analyse) und

B: -denaturierenden (Western Blot Analyse) Bedingungen

Es wurden in A 5 ng und 50 ng und in B 20 ng der verschiedenen Proteine der BM-40 Familie aufgetragen und mit dem gereinigten und inhibierten Testican-1 Antikörper aus Kaninchen in einer Verdünnung 1:150 inkubiert.

3.1.2.2 Testican-1 Antikörper aus Huhn

Um z.B. auf einem Gewebeschnitt parallel zwei verschiedene Proteine zu markieren, ist es notwendig zwei Primärantikörper zu verwenden, die aus verschiedenen Spezies stammen. Die Primärantikörper können dann mit Sekundärantikörpern, die beispielsweise

unterschiedlich fluoreszmarkiert sind, nachgewiesen werden. Da viele käuflich zu erwerbende Antikörper im Kaninchen hergestellt werden, sollte hier ein weiterer Antikörper gegen rekombinantes Testican-1 in Huhn generiert werden. Zur Immunisierung wurden 500 µg des Proteins an die Firma Pineda Antikörper Service geschickt.

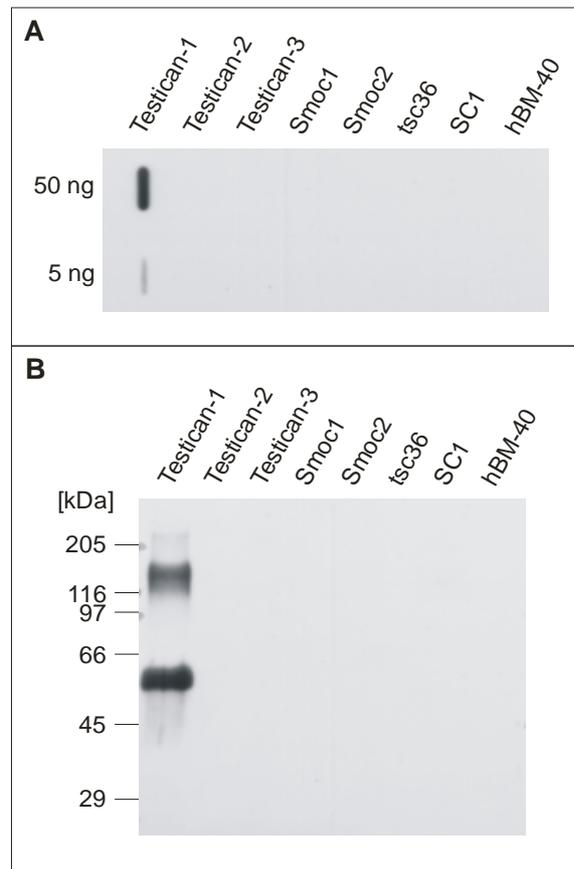


Abb. 3.6: Untersuchung der Kreuzreaktion des Testican-1 Antikörpers aus Huhn unter

A: -nativen (Slot Blot Analyse) und

B: -denaturierenden (Western Blot Analyse) Bedingungen

Es wurden in A 5 ng und 50 ng und in B 20 ng der verschiedenen Proteine der BM-40 Familie aufgetragen und mit dem affinitätsgereinigten Testican-1 Antikörper aus Huhn in einer Verdünnung 1:75 inkubiert.

Das nach der Immunisierung gewonnene Serum wurde über eine Testican-1 Säule affinitätsgereinigt (vgl. Kapitel 3.1.2.1). Anschließend erfolgte, wie schon bei dem Testican-1 Antikörper aus Kaninchen die Charakterisierung. Der Testican-1 Antikörper aus Huhn (ck-T1) wurde zum einen unter nativen Bedingungen im Slot Blot, zum anderen unter denaturierenden Bedingungen im Western Blot analysiert und auf Kreuzreaktivität gegenüber den anderen Proteinen der BM-40 Familie hin untersucht (vgl. Kapitel 3.1.2.1). Wie in Abbildung 3.6 zu sehen ist, reagiert der ck-T1 Antikörper sowohl unter nativen, als auch denaturierenden Bedingungen hoch spezifisch und zeigt keinerlei Kreuzreaktion.

3.1.2.3 Testican-2 Antikörper aus Kaninchen

Die Affinitätsreinigung des Testican-2 Antikörpers (rb-T2) aus Kaninchen erfolgte analog zur Reinigung des rb-T1 Antikörpers (vgl. Kapitel 3.1.2.1). Allerdings wurden hier statt der Wi26 Zellen EBNA-293 Zellen für die Herstellung des Proteinextraktes verwendet (vgl. Frau Schnepf, Dissertation). Der rb-T2 Antikörper erkennt nach der Affinitätsreinigung spezifisch das Protein, mit dem das Kaninchen immunisiert wurde, sowohl unter nativen, als auch denaturierenden Bedingungen und zeigt keine Kreuzreaktion gegenüber einem anderen Protein der BM-40 Familie.

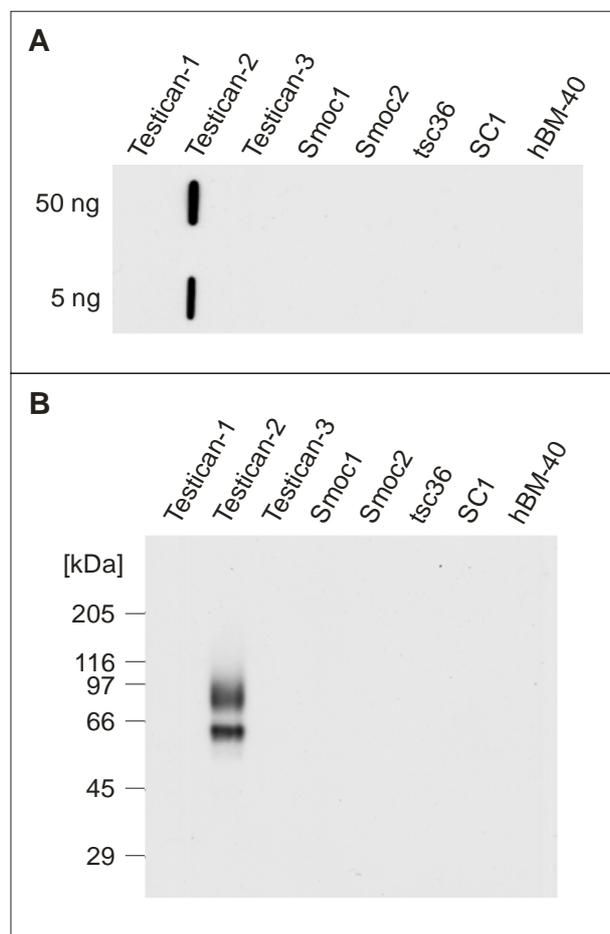


Abb. 3.7: Untersuchung der Kreuzreaktion des rb-T2 Antikörpers unter

A: -nativen (Slot Blot Analyse) und

B: -denaturierenden (Western Blot Analyse) Bedingungen

Es wurden in A 5 ng und 50 ng und in B 20 ng der verschiedenen Proteine der BM-40 Familie aufgetragen und mit dem affinitätsgereinigten Testican-2 Antikörper aus Kaninchen in einer Verdünnung 1:100 inkubiert.

3.1.3 Analyse des endogenen Testican-1 Proteins

3.1.3.1 Testican-1 ist ein extrazelluläres Protein

Aufgrund der Aminosäuresequenz, die N-Terminal ein Signalpeptid und keine Transmembran-Region aufweist, ist davon auszugehen, dass es sich bei Testican-1 um ein extrazelluläres Protein handelt. Dies sollte nun auch experimentell belegt werden. Daher wurde versucht, das Protein in konditioniertem, serumfreiem Überstand verschiedener Zelllinien nachzuweisen. Für dieses Experiment wurden vor allem Zelllinien neuronalen Ursprungs gewählt, da Testican-1 im Gehirn exprimiert wird. Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich um Neurone (N2A, N18TG2), um eine Hybrid-Linie aus Neuroblastom- und Gliomzellen (NG108), um Gliomzellen (C6) und eine Myoblasten Linie (C2F3). Die Fibroblastenlinie Wi26 wurde als negativ Kontrolle verwendet.

Da sich in einem Vorversuch (Western Blot) eine geringe Expressionsrate des endogenen Testican-1 Proteins andeutete, wurde der Nachweis durch Immunpräzipitation erbracht werden. Dazu wurde der rb-T1 Antikörper an Protein-A Agarose gekoppelt und die Immunpräzipitation von je 1 ml konditioniertem Überstand durchgeführt. Mit den Eluaten erfolgte eine SDS-PAGE mit anschließender Western Blot Analyse. Für die Detektion von Testican-1 wurde der ck-T1 Antikörper verwendet. Testican-1 konnte lediglich im Überstand der C2F3 Zellen nachgewiesen werden. Das endogene Protein stellt sich als polydisperse Bande zwischen 60 und 250 kDa dar (Abb. 3.8). Somit wurde der Beweis erbracht, dass es sich bei Testican-1 um ein extrazelluläres Protein handelt. Bei der Doppelbande unterhalb von 66 kDa, die in allen Spuren zu sehen ist, handelt es sich um unspezifische Banden (vermutlich Keratin), da diese Banden in anderen Analysen von Testican-1 nicht zu sehen waren (vgl. Abb. 3.9 und 3.17).

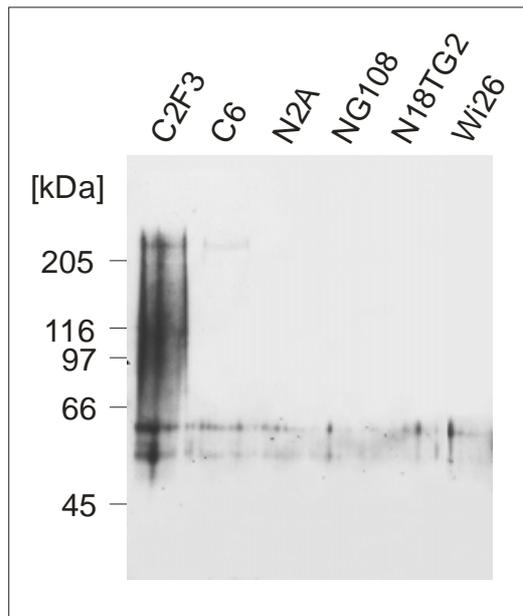


Abb. 3.8: Endogene Expression von Testican-1

Immunpräzipitation von 1 ml konditioniertem Überstand verschiedener Zelllinien mit dem rb-T1 Antikörper. Testican-1 wurde in der anschließenden Western Blot Analyse mit dem ck-T1 Antikörper nachgewiesen.

3.1.3.2 Analyse der Glykosaminoglykan-Ketten von Testican-1

Das errechnete Molekulargewicht von Testican-1 liegt bei 47.5 kDa; wie aber bereits in Abb. 3.8 zu sehen ist, erscheint Testican-1 in der SDS-PAGE als polydisperse Bande. Da es sich bei Testican-1 um ein Proteoglykan handelt, lässt sich das Laufverhalten durch unterschiedliche Länge der GAG-Ketten erklären. Durch Abspaltung der GAG-Ketten mit Heparinase I und III (spaltet Heparansulfat) und Chondroitinase ABC (spaltet Chondroitinsulfat und Dermatansulfat) wurde untersucht, welche Glycosaminoglycane an das Core-Protein gebunden sind. Da die Natur der GAG-Ketten (z.B. CS oder HS) in Abhängigkeit von der Zell- oder Gewebe-spezifischen Expression einiger für die Glykosylierung notwendigen Enzyme variieren kann [siehe Kapitel 1.3 und zur Übersicht Bandtlow und Zimmermann, 2000], wurde Testican-1 aus verschiedenen Quellen untersucht. So wurde endogenes Testican-1 aus C2F3 Zellen und aus dem Gehirn adulter Mäuse sowie rekombinantes Protein aus EBNA-293 Zellen bezüglich der Zuckerketten analysiert.

Endogenes Testican-1 wurde zunächst mit Hilfe des an Protein-A Agarose gekoppelten rb-T1 Antikörpers aus 4 ml konditioniertem, serumfreien Zellüberstand bzw. 1 ml

Gehirnextrakt präzipitiert. Die Abspaltung der GAG-Ketten erfolgte nach der Präzipitation, als das Protein an den Antikörper gebunden war. Anschließend wurde das Protein durch Aufkochen von den Antikörpern getrennt und einer SDS-PAGE und Western Blot Analyse unterzogen. Die Detektion des Western Blots erfolgte mit dem ck-T1 Antikörper.

Die Zuckerketten des rekombinanten Testican-1 Proteins wurden ohne vorherige Präzipitation abgespalten, da hier das Protein bereits in reiner Form vorlag. Die anschließende Western Blot Analyse erfolgte hier mit einem, gegen den *Myc-Tag* des rekombinanten Proteins gerichteten Antikörper (Anti-Myc-Antikörper).

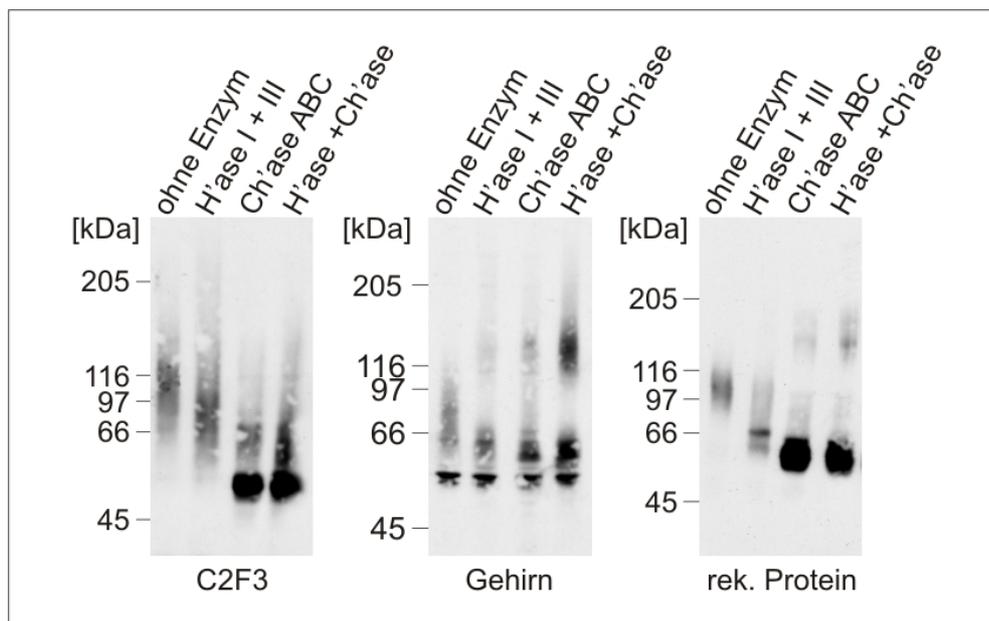


Abb. 3.9: Analyse der GAG-Ketten von endogenem Testican-1 aus C2F3 Zellen und Gehirn und rekombinantem Protein aus EBNA-293 Zellen

Immunpräzipitation von endogenem Testican-1 aus 4 ml konditioniertem Zellüberstand der C2F3 Zellen bzw. aus 1 ml Proteinextrakt aus adultem Gehirn mit dem rb-T1 Antikörper. Im präzipitierten Zustand erfolgte die Abspaltung von Heparansulfat-Ketten mit Heparinase I + III (H'ase) und der Chondroitinsulfat-/Dermatansulfat-Ketten mit Chondroitinase (Ch'ase) ABC. Von dem rekombinanten Protein wurden die GAG-Getten ohne vorherige Immunpräzipitation abgespalten. Die Proben wurden auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit dem ck-T1 (C2F3 und Gehirn) bzw. dem Anti-Myc-Antikörper (rekombinantes Testican-1) im Western Blot nachgewiesen. rek. Protein: rekombinantes Testican-1 Protein in EBNA-293 Zellen hergestellt.

Sowohl bei endogenem Testican-1 aus C2F3 Zellen und Gehirn als auch bei dem rekombinanten Testican-1 aus EBNA-293 Zellen zeigt sich mit Heparinase I und III und deutlicher mit Chondroitinase ABC eine Verschiebung zu kleineren Molekulargewichten, wobei es sich bei der Bande um 50 kDa vermutlich um das Testican-1 Core-Protein handelt. Dies bedeutet, dass es sich bei Testican-1 *in vivo* um ein Heparan- und

Chondroitin- oder Dermatansulfat Proteoglykan handelt. Allerdings scheint im Gehirn ein geringerer Teil des Testican-1 Core-Proteins glykosyliert zu sein, da das Core-Protein im Gegensatz zu Testican-1 aus C2F3 Zellen bereits im unbehandelten Zustand zu sehen ist (siehe Abb. 3.9). Zusätzlich erscheint bei Testican-1 aus Gehirn und rekombinantem Protein nach der Behandlung mit Heparinase und/oder Chondroitinase auch eine höher molekulare Form (über 116 kDa) im Vergleich zum unbehandelten Protein. Dies lässt darauf schließen, dass Proteine mit sehr langen Zuckerketten erst nach Abspaltung der GAG-Ketten (HS und CS/DS) in dem Gel aufgetrennt werden können. Bei den, an dem Core-Protein noch verbleibenden Zuckerketten, könnte es sich um Keratansulfat handeln.

3.2 Generierung der Testican-1 defizienten Mauslinien

3.2.1 Genereller Ablauf

Im Genom so genannter *knock-out* Mäuse wurde ein bestimmtes Gen inaktiviert, um Rückschlüsse auf die Funktion des entsprechenden Proteins ziehen zu können. Um ein Gen gezielt zu inaktivieren, muss zunächst ein *Targeting*-Vektor hergestellt werden. Er beinhaltet ein Stück DNA des entsprechenden Gens und eine Selektionskassette. Dieses *Targeting*-Konstrukt wird dann durch Elektroporation in ES-Zellen eines bestimmten Mausstamms (hier 129/Ola), eingebracht. In den ES-Zellen kann das Konstrukt mit dem intakten Genom rekombinieren und die Vektor DNA gegen die native DNA in der gewünschten Region austauschen (homologe Rekombination). Häufiger erfolgt jedoch eine zufällige Integration an einer undefinierten Stelle im Genom (nicht homologe Rekombination). ES-Zellen mit dem integrierten Konstrukt werden selektioniert und durch Southern Blot Analyse werden die ES-Zell-Klone mit homolog integriertem Konstrukt identifiziert. Diese ES-Zellen werden durch Mikroinjektion in Blastocysten eines anderen Mausstammes (hier C57Bl/6) eingebracht. Die Blastocysten werden dann von Leihmüttern (Foster-Mäusen) ausgetragen. Es entstehen chimäre Mäuse, bestehend aus zwei verschiedenen Zelltypen (129/Ola und C57Bl/6).

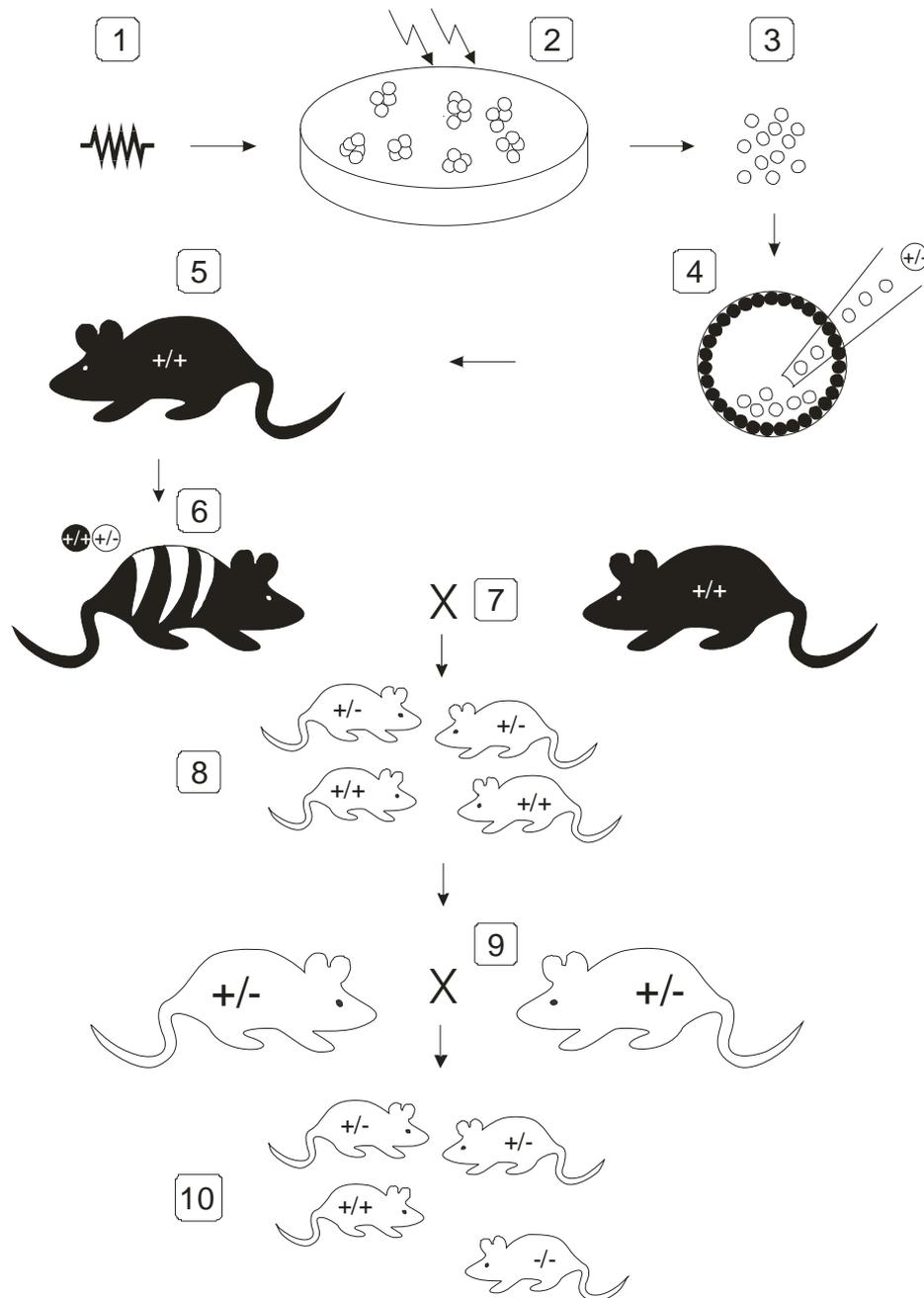


Abb. 3.10: Schema zur Generierung einer *knock-out* Maus

- 1.) Konstruktion des *Targeting*-Vektors
- 2.) Transfektion des *Targeting*-Vektors in ES-Zellen durch Elektroporation
- 3.) Identifizierung homolog rekombinierter ES-Zellen
- 4.) Mikroinjektion dieser ES-Zellen in Blastocysten
- 5.) Transplantation der Blastocysten in Foster-Mütter
- 6.) Es entstehen Chimäre Mäuse
- 7.) Rückkreuzen der Chimären, um Keimbahngängigkeit zu überprüfen
- 8.) Analyse der Nachkommen; Maximal 50 % Heterozygote
- 9.) Heterozygote Nachkommen werden untereinander verpaart
- 10.) Analyse der Nachkommen; Verhältnis 1:2:1 (wildtyp:heterozygot:homozygot)

Da der Mausstamm aus dem die Blastocysten gewonnen werden eine andere Fellfarbe besitzt als der, aus dem die ES-Zellen gewonnen werden, lässt sich eine Chimäre gut an ihrer gemischten Fellfarbe erkennen. Die Keimbahngängigkeit der modifizierten ES-Zellen in der Chimäre lässt sich, nach einer Rückkreuzung an der Fellfarbe (hier Agouti) der Nachkommen erkennen. Für die Rückkreuzung wird der Blastocysten-spendene Mausstamm verwendet. Da aber in den ES-Zellen nur ein Allel durch die homologe Rekombination mutiert wurde, tragen nur 50 % der ES-Zell-farbigen Nachkommen die Mutation. Heterozygote Nachkommen der F1-Generation werden dann untereinander verpaart, so dass eine Nullmutation bezüglich des Gens entsteht. In Abbildung 3.10 sind die einzelnen Schritte zur Herstellung einer *knock-out* Maus noch einmal schematisch dargestellt.

3.2.2 Herstellung der internen Sonde

Die interne Sonde (Probe 2) wurde im Rahmen dieser Arbeit erstellt und entspricht den ersten 400 bp des *Targeting*-Konstrukts. Sie soll später bei der Analyse der ES-Zellen zeigen, dass sich kein zusätzliches *Targeting*-Konstrukt über eine nicht homologe Rekombination in das Genom integriert hat, wodurch sonst unter Umständen ein weiteres Gen mutiert sein könnte. Um dies analysieren zu können, sollte die DNA der bereits positiv (heterozygot) getesteten ES-Zellen mit XbaI geschnitten werden. Auch hier befindet sich eine zusätzliche Schnittstelle in der Selektionskassette, wodurch sich in der Southern Blot Analyse Wildtyp- (16 kb) und mutiertes Allel (10 kb) voneinander unterscheiden lassen. In die Abbildung 3.11 sind das *Targeting*-Konstrukt und der entsprechende genomische Locus eingezeichnet. Die Analyse der ES-Zellen ist im folgenden Kapitel beschrieben.

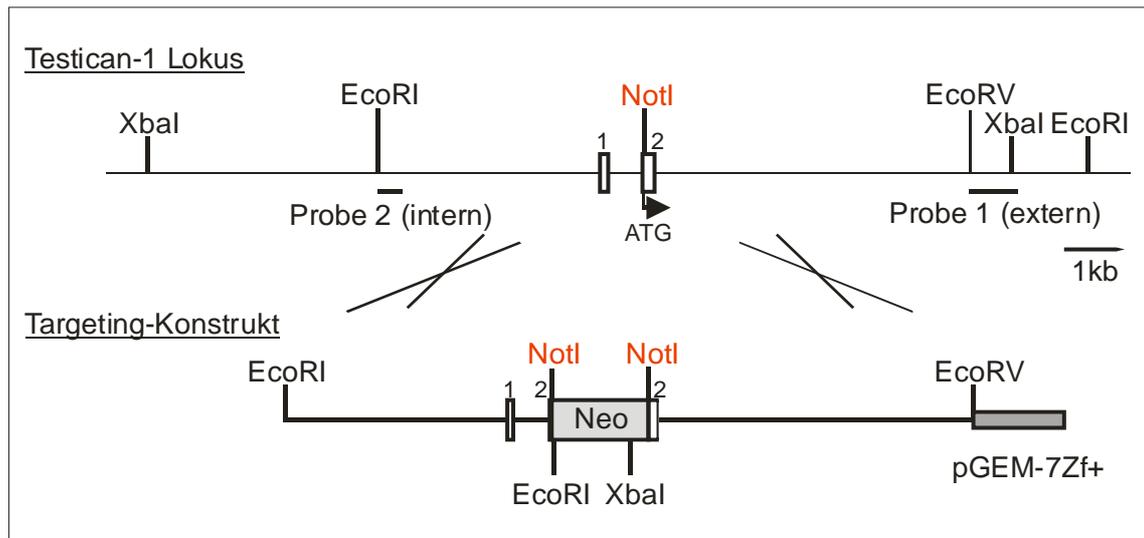


Abb. 3.11: Testican-1 Gene-Targeting Konstrukt

Dargestellt sind der genomische Bereich des Testican-1 Gens, der zur Generierung des *Targeting*-Konstrukts verwendet wurde, die beiden Sonden, das *Targeting*-Konstrukt und alle relevanten Schnittstellen. *NotI*: Insertion der Neo-Selektionskassette; *EcoRI*: Analyse homolog integrierter ES-Zell-Klone mit Hilfe der externen Sonde (Probe 1); *XbaI*: Ausschließen einer heterologen Integration eines zusätzlichen Konstrukts mit der internen Sonde (Probe 2); *EcoRI/EcoRV*: Klonierung des DNA-Fragments zur Konstruktion des *Targeting*-Vektors. Die weißen Rechtecke stellen die ersten beiden Exons des Testican-1 Gens dar. pGEM-7Zf+: Klonierungs-Vektor; Neo: Neomycin-Selektionskassette.

3.2.3 Herstellung rekombinanter ES-Zell-Klone

Wie schon erwähnt erfolgt die Einführung des *Targeting*-Konstrukts in die ES-Zellen durch Elektroporation. In dieser Arbeit wurde die ES-Zelllinie IB10, einem Abkömmling der Zelllinie E14 [Hooper, 1987] aus dem Mausstamm 129/Ola verwendet. Es wurden $1-2 \times 10^7$ Zellen mit $30 \mu\text{g}$ des mit KpnI linearisierten *Targeting*-Konstrukts transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 7-9 Tage unter selektiven Bedingungen kultiviert. G418 resistente Klone wurden isoliert und auf 24-Loch-Platten expandiert. Je 2/3 der konfluenten Zellen einer Vertiefung wurden eingefroren, das weitere Drittel wurde für die Präparation genomischer DNA verwendet. Diese wurde mit Hilfe der externen und internen Sonde analysiert. Aus ca. 800 isolierten ES-Zell-Klonen konnten drei mit korrekt integriertem *Targeting*-Konstrukt identifiziert werden (Klon 15, 194 und 369). Der vierte in Abbildung 3.12 gezeigte Klon (431) zeigt mit Probe 1 lediglich die 12 kb Wildtyp-Bande. Die heterologe Integration des Konstrukts bei Klon 431 wird durch das Auftreten einer Bande bei 6 kb nach der Analyse mit Probe 2 deutlich. Die anderen drei Klone zeigen mit Probe 2 die erwarteten Banden bei 10 kb (mutiert) und 16 kb (Wildtyp). Es hat also keine zusätzliche Integration eines *Targeting*-Konstrukts stattgefunden.

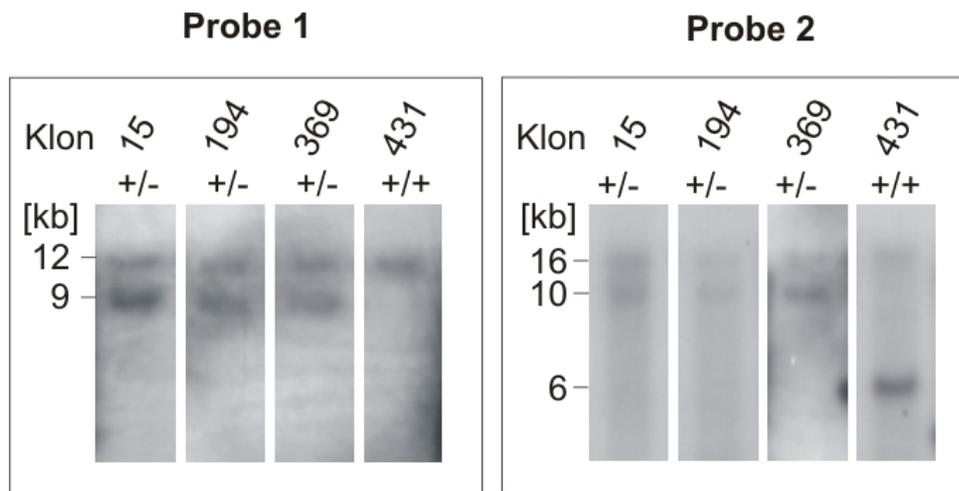


Abb. 3.12: DNA-Analyse von ES-Zell-Klonen

Southern Blot Analyse von verschiedenen ES-Zell-Klonen, links nach Restriktionsspaltung der genomischen DNA mit EcoRI und anschließender Southern Blot Analyse mit der externen Sonde (Probe 1), rechts nach Spaltung mit XbaI und der anschließenden Southern Blot Analyse mit der internen Sonde (Probe 2). Die Klone 15, 194 und 369 zeigen im Vergleich zu Klon 431 eine homologe Integration des Testican-1 Targeting-Konstrukts, ohne ein zusätzliches Konstrukt im Genom heterolog integriert zu haben.

3.2.4 Etablierung der Testican-1 defizienten Mauslinien

Alle drei heterozygoten ES-Zell-Klone wurden zur Herstellung chimärer Mäuse in Blastocysten injiziert. Als Blastocysten-Spender wurde der Inzuchtstamm C57Bl/6 (Fellfarbe: schwarz) verwendet. Die Blastocysten wurden am Tag 3,5 p.c. aus den Uteri schwangerer Mäuse isoliert. In jede Blastocyste wurden 10-15 ES-Zellen mittels Mikroinjektion eingebracht. Zur Regenerierung wurden die Blastocysten für 1-2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 5-10 Blastocysten in jedes Uterushorn eines Foster-Tieres (Tag 2,5 p.c.) implantiert. Als Foster-Tiere wurden Weibchen aus einer Kreuzung der Mausstämmen BALB/c und C57Bl/6 verwendet, da sich diese Tiere in der Vergangenheit als besonders gute Mütter erwiesen haben. Die Mikroinjektion der ES-Zellen in Blastocysten und der anschließende Blastocystentransfer wurde von Herrn Dr. Smyth und Herrn Krzyzak (Zentrum für Molekulare Medizin Köln, ZMMK) durchgeführt.

Da die verwendeten ES-Zellen aus dem Mausstamm 129/Ola stammen, tragen sie homozygot wildtyp den Agouti-Pigmentloкус (A/A), so dass Chimäre anhand ihrer gemischten, schwarz-agouti Fellfarbe (Fellchimärität) deutlich zu erkennen waren. Um die Keimbahngängigkeit der mutierten ES-Zellen zu überprüfen, wurden männliche Chimären mit mehr als 50 % agouti Fellfarbe mit C57Bl/6 Weibchen verpaart. Zwei der drei injizierten ES-Zell-Klone waren keimbahngängig (Klon 15 und Klon 369). Aus beiden

Klonen wurde unabhängig voneinander je eine Testican-1 defiziente Mauslinie gezüchtet, die in dieser Arbeit mit Tes15 bzw. Tes369 bezeichnet werden. Beide Linien wurden während dieser Arbeit 4 x mit C57Bl/6 Wildtyp Tieren gekreuzt, um einen möglichst einheitlichen, genetischen Hintergrund der Linien zu erhalten.

Zusätzlich wurden männliche Chimäre der Klone 15 und 369 mit Sv129 Weibchen verpaart, um beide Linien auf einen zweiten genetischen Hintergrund zu züchten. Bei einem möglichen Phänotyp könnte somit gezeigt werden, dass er nicht durch den genetischen Hintergrund bedingt ist. Dieses Phänomen wurde z.B. bei der Inaktivierung des *Egfr* (*epidermal growth factor receptor*)-Gens beobachtet. Mit einem CF-1 Hintergrund starben die Embryonen bereits während der Einnistungsphase in den Uterus. Dagegen konnten mutante Tiere auf einem CD-1 Hintergrund postnatal bis zu drei Wochen alt werden [Threadgill, 1995]. Tiere des Sv129 Hintergrundes wurden jedoch im Verlauf dieser Arbeit nicht weiter verwendet.

3.2.5 Genotypisierung der Testican-1 defizienten Mauslinien

Für die Analyse der Testican-1 defizienten Mäuse wurde genomische DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien präpariert. Die Genotypisierung erfolgte zunächst durch Restriktionsspaltung der genomischen DNA mit EcoRI und einer anschließenden Southern Blot Analyse mit der externen Sonde (Probe 1) analog zur Analyse der ES-Zell-DNA (siehe Abb. 3.13A; vgl. Kapitel 3.2.1 und 3.2.2). Um die Tiere einfacher und schneller genotypisieren zu können, wurde im Verlauf der Arbeit eine Genotypisierung mittels PCR etabliert (siehe Abb. 3.13B). Die PCR wurde mit drei Primern gleichzeitig durchgeführt, um anhand eines Reaktionsansatzes Wildtyp, heterozygote und Testican-1 defiziente Mäuse voneinander unterscheiden zu können. In Abbildung 3.13C ist schematisch die Position der Primer eingezeichnet. Im Falle des Wildtyps enthält die genomische DNA keine Neomycin-Selektionskassette und das PCR Produkt entsteht mit dem sense Primer in Exon 1 (Ex1s2) und dem antisense Primer in Exon 2 (Ex2a2). Die mutierte DNA enthält zusätzlich die Selektionskassette. Der zusätzliche antisense Primer (Neo_a) wurde so gewählt, dass mit dem sense Primer (Ex1s2) im Fall der Mutation ein größeres PCR-Produkt als bei der Wildtyp-DNA entsteht. Da die Neomycin-Selektionskassette 1,6 kb groß ist, kommt bei den gewählten PCR-Bedingungen das Produkt aus den Primern Ex1s2/Ex2a2 bei einem mutierten Locus nicht zustande.

Um zu zeigen, dass in beiden Testican-1 defizienten Mauslinien das Genom mutiert wurde, ist beispielhaft in Abbildung 3.13 eine Southern Blot Analyse für die Linie Tes15 und eine PCR Analyse die für Linie Tes369 mit den drei möglichen Genotypen (+/+, +/-, -/-), dargestellt.

Es kann festgehalten werden, dass der mutierte Testican-1 Locus nach den Mendelschen Regeln im Verhältnis 1:2:1 (wildtyp:heterozygot:homozygot mutant) weitervererbt wird.

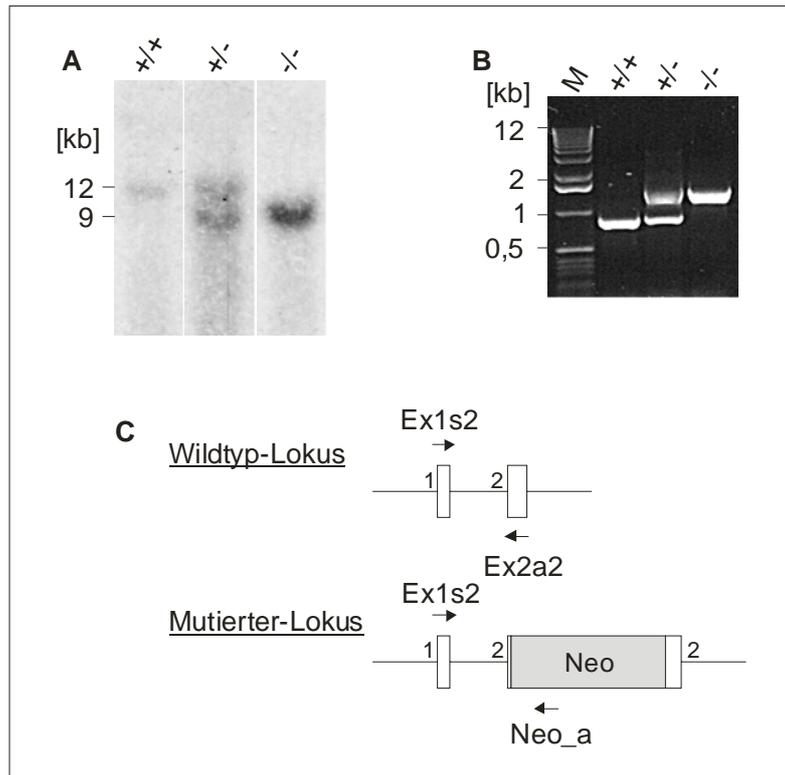


Abb. 3.13: Genotypisierung der Testican-1 defizienten Mäuse anhand von Schwanzspitzen-Biopsien

A: Restriktionsspaltung der genomischen DNA mit EcoRI und anschließende Southern Blot Analyse mit Probe 1

B: Analyse mittels PCR

C: Schematische Darstellung des genomischen Wildtyp- bzw. mutierten Testican-1 Locus mit der Position der verwendeten Primerpaare, die zu den entsprechenden PCR-Produkten in B führen

Die Southern Blot Analyse ist hier beispielhaft für die Testican-1 defiziente Linie Tes15, die Genotypisierung mittels PCR ist anhand der Linie Tes369 gezeigt. M: 12 kb-Leiter; Neo: Neomycin-Selektionskassette.

3.3 Analyse der Testican-1 defizienten Mauslinien

Die Abwesenheit von Testican-1 wurde in beiden unabhängig voneinander generierten Linien (Tes15 und Tes369) auf DNA- (siehe Abb. 3.13), RNA- und Protein-Ebene überprüft. Außerdem wurde die Lebensdauer von Tieren beider Linien ermittelt. Die

übrigen in dieser Arbeit gezeigten Untersuchungen wurden mit der Linie Tes369 durchgeführt. Wenn nicht ausdrücklich darauf hingewiesen wird, waren alle verwendeten Wildtyp Kontrolltiere stets Geschwister, aus demselben Wurf wie homozygote Testican-1 $-/-$ Mäuse ($T1^{(-/-)}$).

3.3.1 Phänotyp der Testican-1 defizienten Mäuse

Die Testican-1 defizienten Mäuse waren lebensfähig, fertil und zeigten keine erkennbaren Abnormalitäten gegenüber Wildtyp-Tieren. Ebenso erreichten acht untersuchte homozygote Mäuse die zu erwartende Lebensdauer einer Wildtyp Maus von 1,5 Jahren (persönliche Mitteilung von Herrn Dr. Oswald). Adulte $T1^{(-/-)}$ Mäuse (2♂ und 2♀) zeigten gegenüber ihren gleichgeschlechtlichen Geschwistertieren keine Unterschiede in Körpergröße und -form (siehe Abb. 3.14). $T1^{(-/-)}$ Tiere waren ebenso wie die Kontrolltiere in der Lage zu sehen und zu hören und zeigten keine motorischen Auffälligkeiten. So waren sie fähig zu schwimmen und zeigten mit Vorder- und Hinterläufen einen Greifreflex.

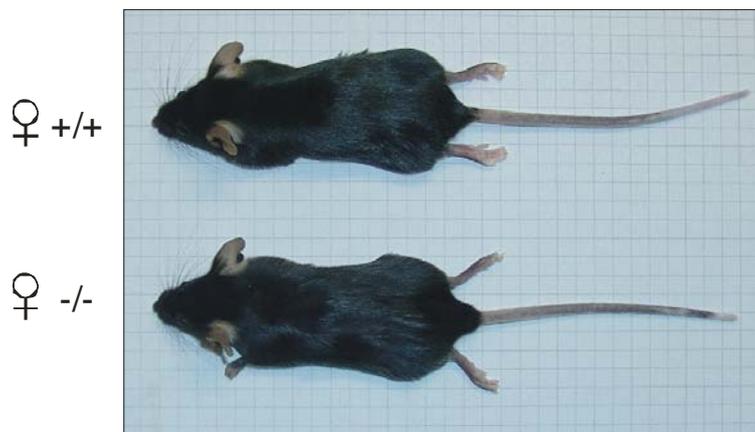


Abb. 3.14: Äußeres Erscheinungsbild einer Wildtyp und einer $T1^{(-/-)}$ Maus
Gezeigt sind zwei 9 Wochen alte weibliche Geschwistertiere.

3.3.2 Testican mRNA Expression

Die Transkription des Testican-1 Wildtyp- und des mutierten Gens wurde sowohl durch RT-PCR als auch durch Northern Blot Analyse untersucht.

3.3.2.1 RT-PCR

Für die Präparation von Gesamt-RNA aus Gehirn und die anschließende reverse Transkription wurde je eine $T1^{(-/-)}$ Maus aus beiden Testican-1 defizienten Linien und eine beliebige C57Bl/6 Maus verwendet. Da die Neomycin-Selektionskassette am 3' Ende ein Polyadenylierungssignal enthält, war davon ausgegangen worden, dass die mRNA der $T1^{(-/-)}$ Mäuse das nicht codierende Exon 1, die ersten 32 bp des zweiten Exons (codierende Sequenz) und das Neomycin-Resistenz-Gen enthält. Somit sollte sich mit den Testican-1 spezifischen Primerpaaren Ex1s2/Ex3a bzw. Ex1s2/Ex4a bei einem mutierten Locus kein PCR Produkt ergeben. Bei einem Wildtyp-Locus sollte das PCR Produkt je nach Primerpaar 367 bp oder 485 bp groß sein. Wie jedoch in Abbildung 3.15A zu sehen ist, gibt es in beiden Testican-1 defizienten Linien ein Transkript, das allerdings im Vergleich zu dem Wildtyp-Produkt um 186 bp kleiner ist. Diese 186 bp entsprechen exakt der Länge des zweiten Exons. Das würde bedeuten, dass nach dem Einfügen der Mutation nun Exon 1 an Exon 3 gespleißt wird, was durch Sequenzanalyse der PCR-Produkte bestätigt werden konnte. Da jedoch Exon 2 das Startcodon (ATG) enthält, ist der Beginn der Translation an dieser Stelle der mRNA ausgeschlossen. Das nächste innerhalb des offenen Leserasters liegende Startcodon befindet sich in Exon 6, so dass höchstens ein trunkiertes Protein entstehen könnte. Dies konnte aber durch Western-Blot Analyse vollständig ausgeschlossen werden (siehe Kapitel 3.3.3). In Abbildung 3.15B ist schematisch ein Ausschnitt der Testican-1 cDNA und die Position der verwendeten Primer dargestellt. Zur Kontrolle der reversen Transkription wurde je eine PCR mit Tubulin spezifischen Primern (Tub) durchgeführt (Abb. 3.15A).

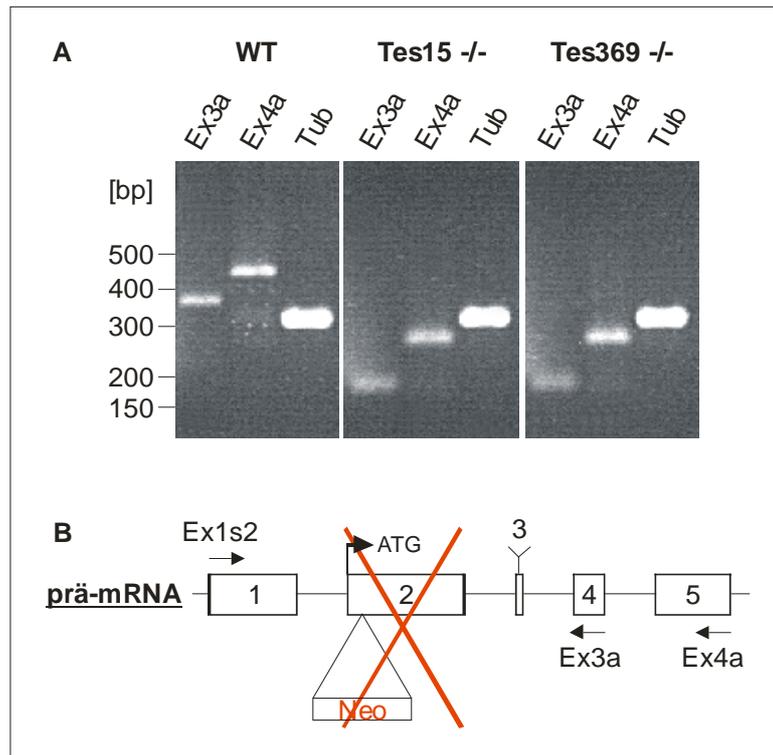


Abb. 3.15: Alternatives Spleißen des mutierten Testican-1 Transkripts

A: RT-PCR auf Gesamt-RNA aus Gehirn

B: Schematische Darstellung eines Ausschnittes des mutierten Transkripts

RT-PCR Analyse des Wildtyp und mutierten Testican-1 Transkripts mit den Primerpaaren Ex1s2/Ex3a und Ex1s2/Ex4a. Nachdem die Neomycin-Selektionskassette in Exon 2 integriert wurde, wird Exon 1 an Exon 3 gespleißt. Dabei wird jedoch das Startcodon (ATG) entfernt. Die nummerierten Kästchen stellen Exons, die Linien dazwischen Introns des Testican-1 Gens dar. WT: Wildtyp; Tes15/Tes369: Bezeichnung für die beiden Testican-1 defizienten Mauslinien; Neo: Neomycin-Selektionskassette; Tub: Kontrolle der RT-PCR mit Tubulin spezifischen Primern.

3.3.2.2 Northern Blot Analyse

Für die Analyse der Testican-1 Expression wurden 5 µg Poly(A)⁺ RNA aus Gehirn je einer adulten Maus beider T1^(-/-) Linien und der entsprechenden Wildtyp Geschwistertiere verwendet. Nach Hybridisierung des Northern Blots mit einer Testican-1 cDNA-Sonde sind in beiden Wildtyp Kontrollen zwei Transkripte von ca. 5,2 und 2,3 kb zu erkennen [Bonnet, 1996], die auf zwei verschiedene Polyadenylierungssignale im 3' nicht codierenden Bereich zurückzuführen sind. In beiden T1^(-/-) Linien ist in der Northern Blot Analyse im Gegensatz zu den RT-PCR Daten kein Transkript zu erkennen. Dies lässt auf eine starke Verringerung der Expression des veränderten Transkripts schließen. Zur Kontrolle gleicher mRNA Mengen wurde der Blot anschließend mit einer GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) Sonde hybridisiert.

Durch Hybridisierung desselben Northern Blots mit einer Testican-2 und -3 cDNA Sonde wurde untersucht, ob die Mutation die Transkription der beiden anderen Testicane auf RNA Ebene beeinflusst. Die Intensität der Banden von Testican-2 und -3 ändert sich durch die An- oder Abwesenheit von Testican-1 nicht (siehe Abb. 3.16). Durch das Fehlen von Testican-1 wird somit die Transkriptionsrate von Testican-2 und -3 nicht beeinflusst.

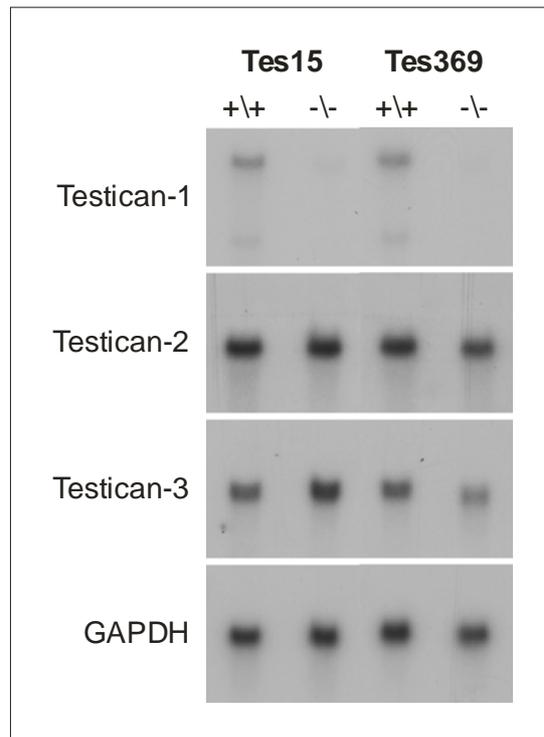


Abb. 3.16: Northern Blot

Analyse von 5 µg mRNA aus Gehirngewebe der beiden Testican-1 defizienten Linien und der entsprechenden Wildtyp Geschwistertiere. Derselbe Blot wurde nacheinander mit einer Testican-1, -2 -3 und GAPDH cDNA Sonde hybridisiert. GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; Tes15/Tes369: Bezeichnung der beiden Testican-1 defizienten Mauslinien.

3.3.3 Untersuchungen zur Protein Expression

3.3.3.1 Nachweis der Abwesenheit von Testican-1

Vorversuche (Western Blot Analyse) zeigten eine geringe Expression von Testican-1 im Wildtyp Gewebe (vgl. Kapitel 3.1.3.2). Daher wurde das Fehlen von Testican-1 in beiden $T1^{(-/-)}$ Linien im Vergleich zum Wildtyp mittels Immunpräzipitation gezeigt. Aus Proteinextrakt von Wildtyp Gehirn (kein Geschwistertier) konnte Testican-1, wie in Abbildung 3.17 zu sehen ist, eindeutig präzipitiert werden, wo hingegen das Protein in den Gehirn-Extrakten der beiden $T1^{(-/-)}$ Linien nicht zu finden ist. Falls nun, durch das Fehlen

des zweiten Exons und damit des Startcodons, alternativ das nächste im Leseraster liegende ATG in Exon 6 als Translationsstart verwendet werden würde, würde das trunkierte Protein aus einem Teil der FS-, der EC, der TY-Domäne und der Domäne V bestehen (siehe Abb. 1.1). Um auszuschließen, dass es ein trunkiertes Testican-1 Protein gibt, welches von den für die Immunpräzipitation und die Western Blot Analyse verwendeten Antikörpern (rb-T1 und ck-T1) nicht erkannt würde, wurde ein rekombinantes Proteinfragment, bestehend aus den beiden N-terminal gelegenen Protein-Domänen (TY-Domäne und Domäne V), vor der Präzipitation einem Teil des Extrakts zugesetzt. Diese beiden Domänen werden von Exon 10, 11 und 12 codiert. Da beide Antikörper in der Lage sind, ein trunkiertes Testican-1 Protein, bestehend aus der TY-Domäne und der Domäne V, zu erkennen (Abb. 3.17 Spur 5; Bande bei 29 kDa), ist der Beweis erbracht, dass in beiden Testican-1 defizienten Linien kein Protein vorhanden ist und es sich tatsächlich um *knock-out* Mäuse handelt. Als Negativkontrolle wurde Wildtyp Leberextrakt verwendet, da Testican-1 in der adulten Maus nicht in der Leber exprimiert wird. Als Positivkontrolle wurde rekombinantes Testican-1 Protein verwendet, das einem Teil des Extraktes zugesetzt und anschließend immunpräzipitiert wurde.

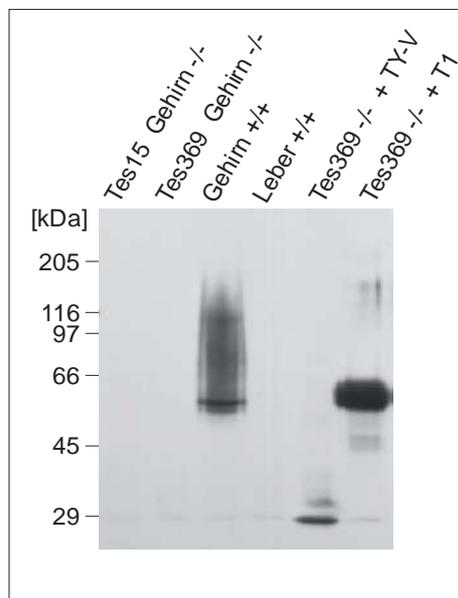


Abb. 3.17: Immunpräzipitation von Testican-1

Aus Gehirnextrakten von adulten Wildtyp und Testican-1 defizienten Mäusen beider Linien (Tes15 und Tes369) erfolgte eine Immunpräzipitation mit dem rb-T1 Antikörper. Als Negativkontrolle wurde Wildtyp Leberextrakt verwendet, da Testican-1 in der Leber der adulten Wildtyp Maus nicht exprimiert wird. Um zu zeigen, dass ein möglicherweise entstandenes, trunkiertes Testican-1 Protein mit dieser Methode auch nachzuweisen ist, wurden die rekombinant hergestellten letzten beiden Domänen des Testican-1 Proteins (TY-V), einem Aliquot eines Testican-1 defizienten Gehirnextrakts zugesetzt. Als Positivkontrolle wurde rekombinantes Testican-1 einem Aliquot eines Testican-1 defizienten Gehirnextrakts zugesetzt. TY: Thyroglobulin-Domäne; V: Domäne V.

3.3.3.2 Expressionsanalyse von BM-40 Familienmitgliedern

Nachdem nun die Defizienz von Testican-1 gezeigt werden konnte, wurden im Anschluss Auswirkungen der Nullmutation auf die Expressionsrate der Testican-2 und -3 Proteine als Mitglieder der Testican Familie untersucht. Zusätzlich wurde die Expression von SC1 analysiert, da es sich bei SC1 um das prominenteste Protein der BM-40 Familie im Gehirn handelt.

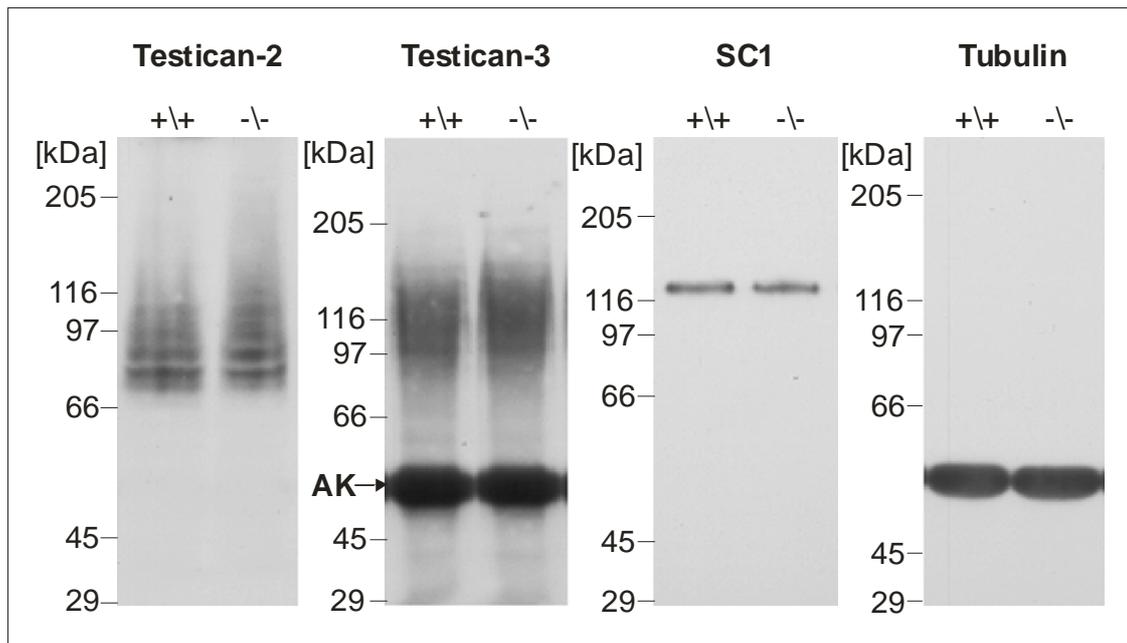


Abb. 3.18: Expression von Testican-2, -3 und SC1

Gehirnextrakte einer Wildtyp und einer Testican-1 defizienten Maus wurden durch Western Blot Analyse auf Unterschiede in der Expressionsrate untersucht. Im Fall von Testican-3 wurde aufgrund der geringen Expressionsrate eine Immunpräzipitation durchgeführt. Da für die anschließende Western Blot Analyse derselbe Antikörper verwendet wurde handelt es sich bei der 50 kDa Bande des Testican-3 Blots um die schweren Ketten des Antikörpers (gekennzeichnet durch AK). Die Ladung gleicher Proteinmengen wird anhand der Tubulin Kontrolle gezeigt.

Für die Analyse wurden Proteinextrakte aus Gehirn einer adulten $T1^{(-/-)}$ Maus (Linie Tes369) und der entsprechenden Kontrolle hergestellt. Identische Mengen des Extrakts wurden einer SDS-PAGE bzw. einer Westen Blot Analyse unterzogen und mit dem entsprechenden Antikörper detektiert. Dabei stellte sich heraus, dass Testican-3 für eine Western Blot Analyse nicht in ausreichenden Mengen exprimiert wird. Aus diesem Grund wurde für die Analyse von Testican-3 eine Immunpräzipitation mit demselben Proteinextrakt durchgeführt (siehe Abb. 3.18). Für die Präzipitation und die anschließende Detektion von Testican-3 in der Western Blot Analyse stand jedoch nur ein Antikörper zu

Verfügung. Da die zur Präzipitation verwendeten Antikörper in dem SDS-Gel ebenfalls aufgetrennt werden, werden diese in der anschließenden Western Blot Analyse auch durch den Sekundärantikörper detektiert. Daher handelt es sich bei der 50 kDa Bande um die schweren Ketten des Testican-3 Antikörpers (in Abb. 3.18 durch AK gekennzeichnet). Aufgrund der Glycosylierung erscheinen Testican-2 und -3 in der Western Blot Analyse bzw. der Immunpräzipitation als polydisperse Bande.

Die in Abbildung 3.18 dargestellten Daten zeigen, dass sich die Nullmutation von Testican-1 weder auf die Expression von Testican-2, -3 noch von SC1 auswirkt. Die Ladung gleicher Proteinmengen wurde durch eine Western Blot Analyse mit einem Tubulin spezifischen Antikörper kontrolliert.

3.3.4 Morphologie des Gehirns

Da Testican-1 in der adulten Maus Gehirn spezifisch exprimiert wird [Bonnet, 1996], wurde untersucht, ob sich das Fehlen von Testican-1 auf die Morphologie des Gehirns auswirkt. Dazu wurden Gehirne aus fünf adulten $T1^{(-/-)}$ Mäusen und der entsprechenden Kontrolltiere präpariert und auf Millimeterpapier fotografiert. Das Vermessen der Gehirne ergab: Alle Gehirne waren 1,5 cm lang (gemessen vom Bulbus olfactorius bis zum Cerebellum – jeweils einschließlich) und 1 cm breit. Die Fissuren der Gehirne wiesen keine auffälligen Unterschiede auf. In Abbildung 3.19 ist exemplarisch je ein Gehirn einer Wildtyp und einer $T1^{(-/-)}$ Maus gezeigt.

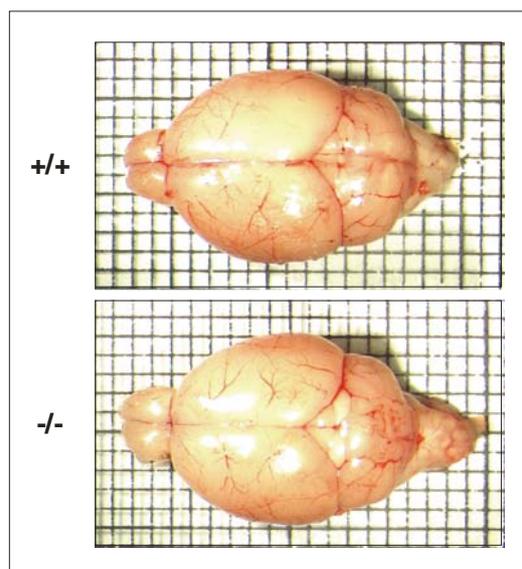


Abb. 3.19: Morphologie des Gehirns

Photographie je eines Gehirns einer adulten Wildtyp bzw. Testican-1 defizienten Maus auf Millimeterpapier.

3.3.5 Histologische und Immunhistologische Untersuchungen

3.3.5.1 Histologische Untersuchung des Gehirns

Nachdem die äußere Form des Gehirns untersucht worden war, erfolgte anschließend die histologische Analyse anhand von Gefrier- und Paraffinschnitten (es wurden fünf T1^(-/-) Gehirne und die entsprechenden Kontrollen analysiert). Durch Kresylechtviolett-Färbung können histologische Veränderungen des Gehirns sichtbar gemacht werden.

Da sich Testican-1 spezifische Signale sowohl in den Neuronen des Thalamus und der Medulla, als auch im akzessorischen Bulbus olfactorius zeigten (siehe nachfolgendes Kapitel) wurden diese Gehirnbereiche besonders betrachtet. Die Gewebebegutachtung gibt jedoch keinen Anhaltspunkt für histologische Veränderungen der adulten T1^(-/-) Mäuse. In Abbildung 3.20 sind Bereiche je eines sagittalen Gefrierschnitts eines Wildtyp und eines T1^(-/-) Gehirns, gefärbt mit Kresylechtviolett, gezeigt. Die Rechtecke markieren die Areale, die in der nachfolgenden Abbildungen 3.21-3.23 in Form von immunhistologischen Untersuchungen mit Antikörpern vergrößert dargestellt sind.

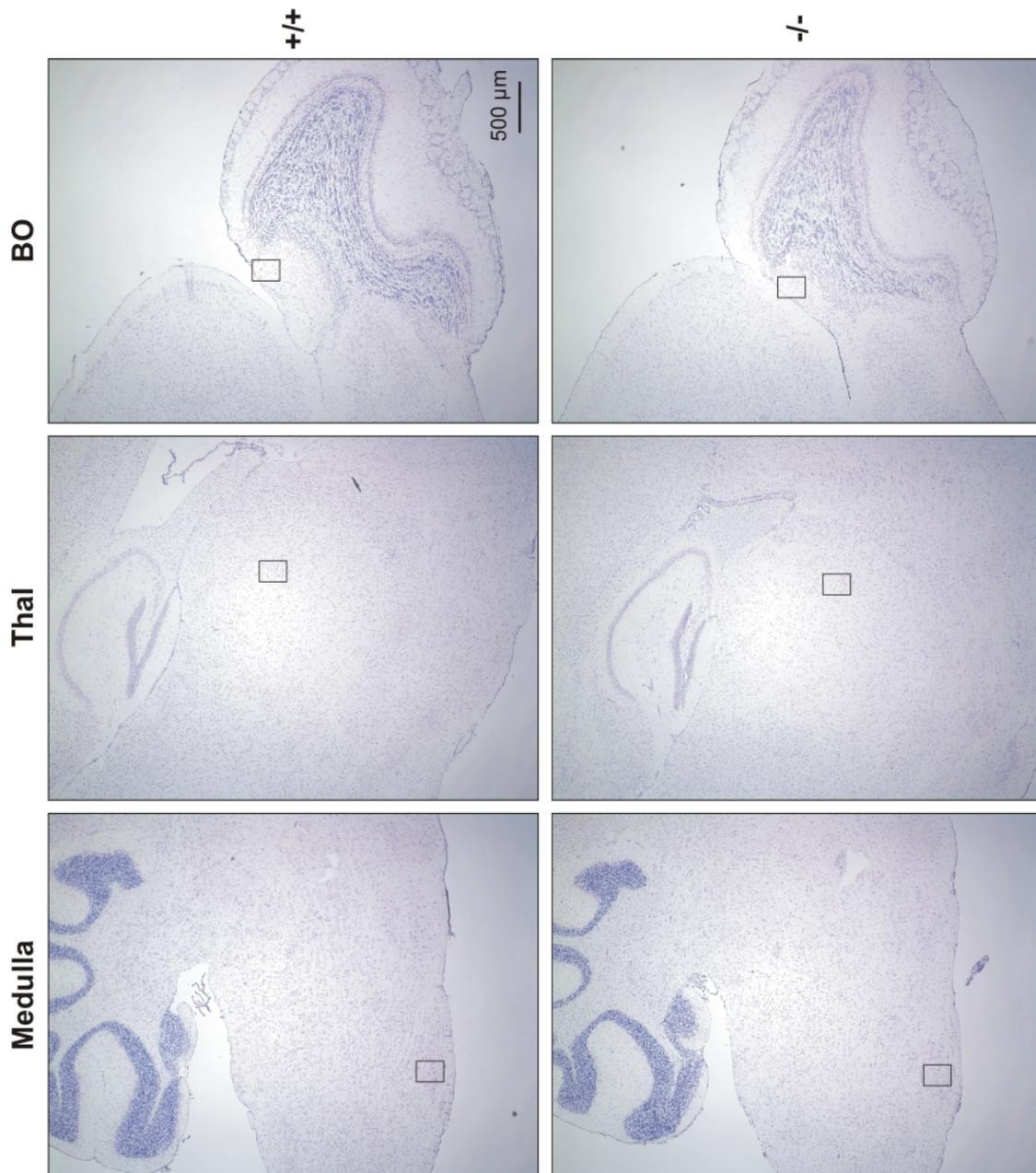


Abb. 3.20: Kresylechtviolett Färbung von Gefrierschnitten

Histologische Analyse von Sagittalschnitten einer adulten Wildtyp und Testican-1 defizienten Maus. Die Rechtecke markieren Bereiche aus dem akzessorischen Bulbus olfactorius, aus dem Thalamus und der Medulla, die in den nachfolgenden Abbildungen 3.21-3.23 dargestellt sind, dabei jedoch immunhistologische Untersuchungen mit Antikörpern zeigen. BO: Bulbus olfactorius; Thal: Thalamus.

3.3.5.2 Immunhistologie

Die Testican-1 Expression konnte durch immunhistologische Analyse von Gehirnschnitten den schon erwähnten Bereichen Medulla, Thalamus und Bulbus olfactorius (akzessorischer Teil) zugeordnet werden (siehe Abb.3.21), da sich bei einem Vergleich der drei genannten

Gehirnbereiche von Wildtyp und T1^(-/-) Gewebeschnitten eindeutig Unterschiede in der Testican-1 Färbung erkennen lassen. Die Hintergrundfärbung (schwaches Signal um die Neurone der Medulla) in dem T1^(-/-) Gewebe könnte durch die hier verwendete Färbemethode oder die leichte Kreuzreaktivität des rb-T1 Antikörpers mit SC1 verursacht werden. Eine Kreuzreaktion mit SC1 konnte aber durch eine Färbung mit einem SC1 spezifischen Antikörper ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt), da dieser ein anderes Expressionsmuster zeigt. Daher muss das Hintergrundsignal durch die Färbemethode hervorgerufen werden. Aufgrund der geringen Testican-1 Expression wurde für die immunhistochemische Färbung das *Vectastain Elite ABC* Kit (Vector laboratories) verwendet. Dabei wird das spezifische Signal durch eine Avidin-Biotin Kaskade verstärkt. Durch die immunhistologische Analyse konnte das bereits durch Immunpräzipitation gezeigte Fehlen von Testican-1 in den T1^(-/-) Mäusen nochmals bestätigt werden.

Da bereits gezeigt werden konnte, dass sich durch das Fehlen von Testican-1 die Proteinmengen an Testican-2 und -3 nicht verändern (siehe Abb.: 3.18), wurde nun immunhistochemisch analysiert, ob diese Proteine möglicherweise im Gehirn umverteilt werden. Das Expressionsmuster von Testican-2 und -3 bleibt jedoch unverändert. Dies ist beispielhaft an einer Thalamus Färbung von Testican-2 und -3 in Abbildung 3.22 gezeigt. Die Testican-2 und -3 Färbungen wurden analog zu Testican-1 durchgeführt. Für die immunhistochemische Analyse von Testican-1, -2 und -3 wurden zu den oben gezeigten Kresylechtviolett Färbungen parallele Gefrierschnitte verwendet (Abb. 3.20).

Zusätzlich wurden durch Immunfluoreszenz noch Neurofilamente (2H3), Synapsen (SV2, *synaptic vesicle protein 2*), Neurone (NSE, *neuron specific enolase*) und Gliazellen (GFAP, *glial fibrillary acidic protein*) auf mögliche Veränderungen hin untersucht. In Abbildung 3.23 ist ebenfalls ein Ausschnitt aus dem Bereich des Thalamus gezeigt. Es konnten jedoch keine Veränderungen der Anzahl an Synapsen, Neurone oder Gliazellen ausfindig gemacht werden. Die Morphologie von Nervensträngen ist durch das Fehlen von Testican-1 ebenfalls nicht beeinflusst. Einschränkend sei darauf hingewiesen, dass all diese immunhistologischen Färbungen lediglich eine Übersicht der Morphologie zeigen. Wenn nur einige wenige Zellen oder Synapsen fehlen oder z.B. die Struktur der Synapsen verändert wäre, würde dies nicht zu erkennen sein. Um eine bessere Erhaltung der Morphologie des gesamten Gehirns zu gewährleisten, wurden für diese vier Färbungen

Paraffinschnitte verwendet. Dies war aus technischen Gründen für die Färbungen mit den Testican spezifischen Antikörpern nicht möglich.

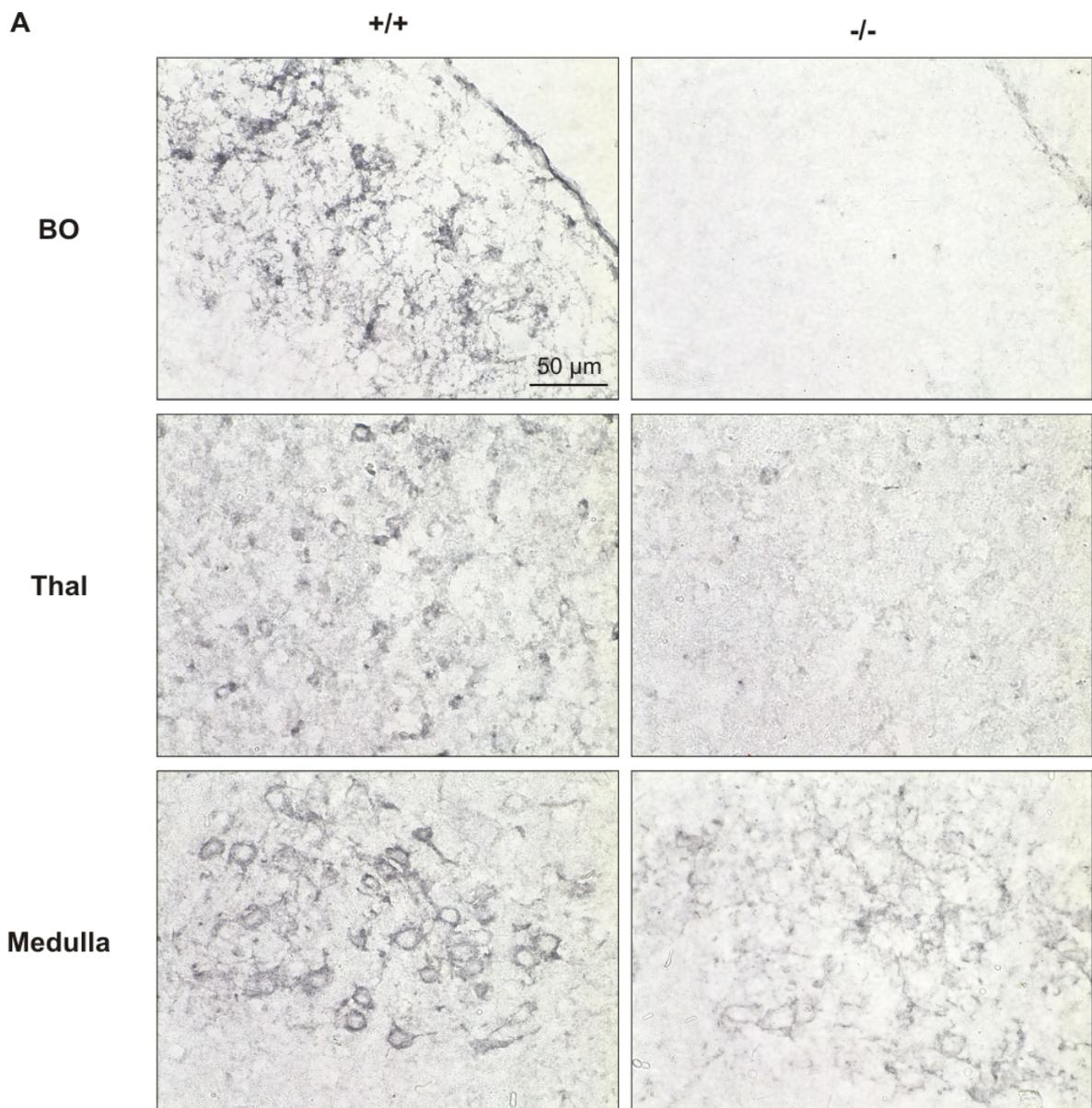


Abb.3.21: Lokalisation von Testican-1 im Gehirn

Immunhistochemische Färbung von sagittaler Gehirnschnitte (Gefrierschnitte) Wildtyp und Testican-1 defizienter Mäuse mit dem rb-T1 Antikörper (1:500). Dargestellt sind Ausschnitte aus dem Bulbus olfactorius (BO), dem Thalamus (Thal) und der Medulla. Die Testican-1 Antikörper wurden mit einem biotinylierten Sekundärantikörper nachgewiesen, das Signal durch eine Avidin-Biotin Kaskade (*Vectastain Elite ABC Kit*) verstärkt und durch Diaminobenzidin (DAB) sichtbar gemacht.

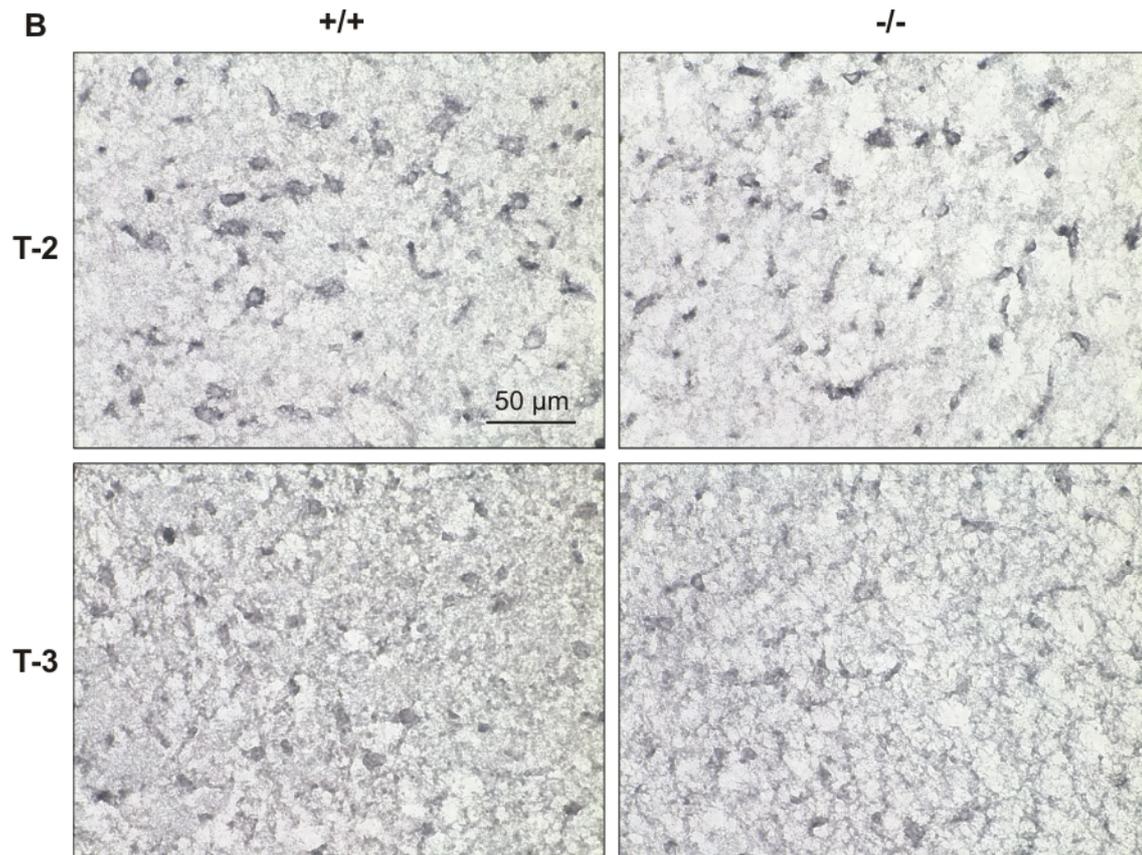


Abb. 3.22: Testican-2 und -3 spezifische Färbung des Thalamus

Gefrierschnitte von Wildtyp und Testican-1 defizienten Gehirnen wurden mit Testican-2 und -3 spezifischen Antikörpern markiert und mit dem *Vectastain Elite ABC Kit* nachgewiesen. Die Signale wurden durch eine Diaminobenzidin (DAB)-Färbung sichtbar gemacht. Beide Primärantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:500 verwendet. Bei den hier gefärbten Präparaten handelt es sich um Parallelschnitte zu den in Abb. 3.21 gezeigten Färbungen.

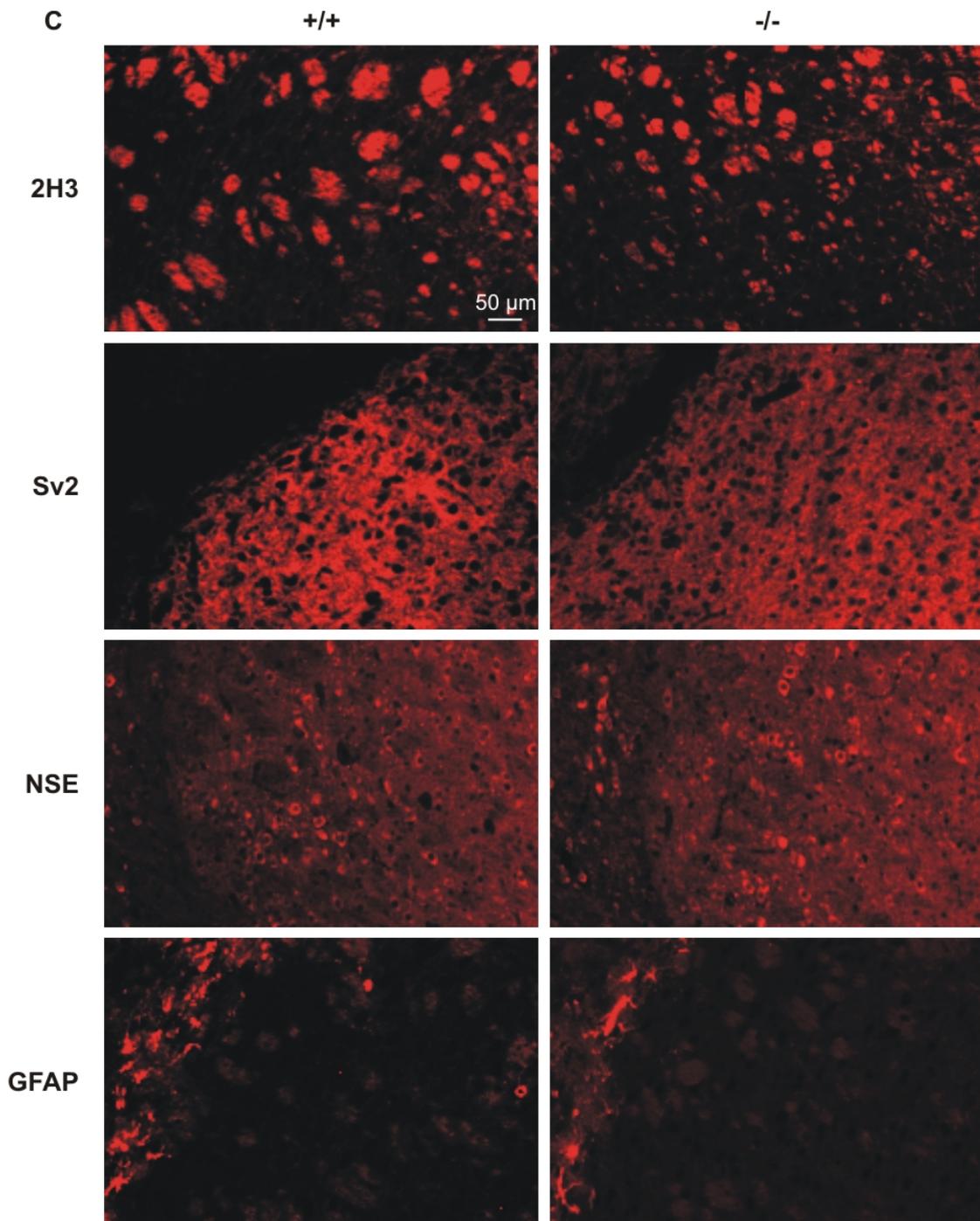


Abb. 3.23: Immunhistologische Analyse sagittaler Gehirnschnitte einer Wildtyp und einer T1^(-/-) Maus
Gezeigt sind Ausschnitte von Paraffinschnitten aus dem Thalamus gefärbt mit Antikörpern gegen Neurofilament (2H3), Synapsen (SV2), Neurone (NSE) und Gliazellen (GFAP). Das Signal wurde hier durch einen Cy3-fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper sichtbar gemacht. 2H3: Protein-Untereinheit des Neurofilaments; GFAP: *glial fibrillary acidic protein*; NSE: *Neuron Specific Enolase*; SV2: *Synaptic Vesicle Protein 2*.

3.3.6 Untersuchungen zur Interaktion mit MMP-2

Auf der Suche nach Regulatoren für die Prozessierung von Pro-Matrixmetalloproteinase (MMP)-2 durch Membrantyp (MT) 1-MMP wurden Testican-1 und -3 *in vitro* als solche identifiziert [Nakada, 2001]. Testican-1 oder -3 binden an MT1-MMP, wodurch die Aktivierung von pro-MMP-2 zu MMP-2 verhindert wird. Es wurde hier nun durch Gelatine-Zymographie untersucht, ob sich das Fehlen von Testican-1 *in vivo* auf den Aktivierungszustand von MMP-2 auswirkt, also in der Testican-1 defizienten Maus vermehrt die aktive Form von MMP-2 zu finden ist. Dieser Versuch könnte zeigen, ob es sich bei Testican-1 tatsächlich um einen physiologischen Proteaseinhibitor handelt.

Für die Analyse wurden Proteinextrakte aus verschiedenen Gehirnbereichen einer Wildtyp bzw. einer T1^(-/-) Maus verwendet. Jedes Gehirn wurde dazu in Cerebellum, Medulla, Bulbus olfactorius und das verbleibende Gehirn ohne Cortex (in Abbildung 3.24 als Resthirn bezeichnet) unterteilt. Bei den drei zuletzt genannten Bereichen handelt es sich um Testican-1 exprimierende Regionen. Da Testican-1 im Cerebellum nicht exprimiert wird, sollte sich das Fehlen von Testican-1 hier nicht auf den Aktivierungszustand von MMP-2 auswirken.

Die jeweiligen Proteinextrakte wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Dabei können im Extrakt möglicherweise enthaltene Gelatinasen wie MMP-2 (Gelatinase A) und MMP-9 (Gelatinase B) sowie ihre inaktiven pro-Formen entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Während der anschließenden Inkubation des Gels in MMP-Substrat-Puffer können Gelatinasen die Gelatine des Gels hydrolytisch spalten. Nach Anfärben des Gels mit Coomassie erscheinen die Stellen im Gel, an denen sich Gelatinasen befunden haben, als farblose Banden. Die Zuordnung, um welche Gelatinase es sich handelt und ob es sich um die aktive oder die inaktive Form handelt, erfolgt aufgrund der Größe. In dem Zymogramm zeigt sich im Wildtyp und T1^(-/-) Gehirn lediglich eine pro-MMP-2 Bande bei 72 kDa und es lassen sich keine Intensitätsunterschiede der Bande bei den verschiedenen Gehirnregionen erkennen (siehe Abb. 3.24). Das heißt, eine vermehrte Aktivierung von pro-MMP-2 kann aufgrund des Fehlens von Testican-1 hier nicht beobachtet werden. Bei der Positivkontrolle, in der letzten Spur des Zymogramms, wurde konditioniertes Medium von Mausfibroblastenzellen aufgetragen. Diese Zellen sekretieren sowohl MMP-2 (62 kDa), als auch pro-MMP-2 (72 kDa).

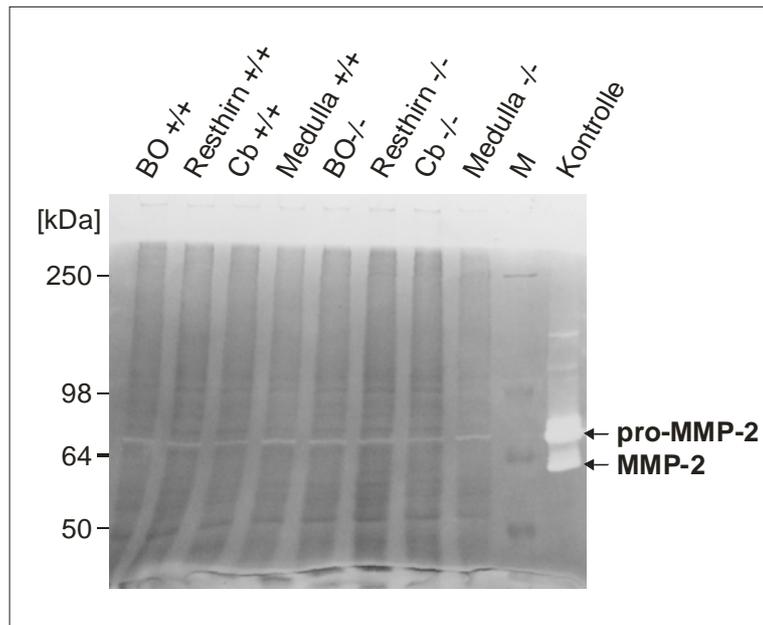


Abb. 3.24: Einfluss von Testican-1 auf die Aktivierung von pro-MMP-2

Aus verschiedenen Gehirnbereichen eines Wildtyp und $T1^{-/-}$ Gehirns wurden Proteinextrakte hergestellt. Je Spur wurden 10 μg Gesamt-Protein eines Extrakts geladen und durch Gelatine-Zymographie analysiert. Das Gehirn war in die Bereiche Bulbus olfactorius (BO), Cerebellum (Cb), Medulla und das restliche Gehirn ohne Cortex (Resthirn), unterteilt worden. Die Kontrolle bestand aus konditioniertem Zellkulturüberstand von Mausfibroblasten-Zellen, die pro-MMP-2 und MMP-2 sekretieren. M: Molekulargewichtsmarker.

3.4 Generierung einer Testican-3 defizienten Mauslinie

Nachdem sich während der Analyse der $T1^{-/-}$ Mäuse kein Phänotyp zeigte, lag die Vermutung einer möglichen Kompensation durch ein anderes Familienmitglied nahe. Da in unserer Arbeitsgruppe bereits ein *Targeting*-Vektor für das Testican-3 Gen vorlag [Müller, 2001], sollte nun eine Testican-3 defiziente Mauslinie ($T3^{-/-}$) analog zu Testican-1 generiert werden. Zusätzlich wird in unserer Arbeitsgruppe auch eine Testican-2 defiziente Mauslinie generiert, so dass nach Fertigstellung aller drei Testican defizienten Mauslinien die Möglichkeit besteht zwei oder alle drei Gene in einer Maus zu inaktivieren. So könnte ein kompensatorischer Mechanismus verhindert werden.

3.4.1 *Targeting-Konstrukt und Herstellung der Sonden*

Das Testican-3 *Targeting*-Konstrukt war nach demselben Prinzip wie schon das Testican-1 Konstrukt hergestellt worden. Ausgangspunkt für die Klonierung war hier ein 7,6 kb großes ApaI/EcoRV Cosmid-DNA Fragment (genomische Sequenz aus dem Mausstamm 129/Ola), welches das erste und zweite Exon des Testican-3 Gens enthält. Analog zu Testican-1 befindet sich auch bei Testican-3 der Transkriptionsstart zu Beginn des zweiten Exons. Daher wurde das Testican-3 Gen ebenfalls in Exon 2 durch das Einfügen der Neomycin-Selektionskassette unterbrochen. Allerdings musste dafür erst ein NotI-Linker (in Abb.3.25 rot markiert) in die SacII-Schnittstelle von Exon 2 kloniert werden. Über die NotI-Schnittstelle innerhalb des Linkers konnte dann die Neo-Selektionskassette eingefügt werden.

Bisher lag noch keine spezifische Sonde (externe Sonde) zur Identifizierung homolog rekombinierter ES-Zell-Klone vor. Außerdem fehlte auch noch eine weitere Sonde (interne Sonde), um eine nicht homologe Integration eines zusätzlichen *Targeting*-Konstrukts ausschließen zu können. Die beiden Sonden wurden nun im Rahmen dieser Arbeit durch PCR auf subklonierten Cosmid-DNA Fragmenten hergestellt. Ist das *Targeting*-Konstrukt homolog in das Genom einer ES-Zelle integriert, kann dies durch Restriktionsspaltung mit EcoRV und anschließende Southern Blot Analyse gezeigt werden. Dabei wird mit der externen Sonde (Probe 1) ein 9,2 kb Fragment bei einem Wildtyp Allel und ein 5,5 kb Fragment bei einem mutierten Allel markiert, da mit der Neomycin-Selektionskassette eine zusätzliche EcoRV-Schnittstelle in das Genom inseriert wird. Die externe Sonde ist 330 bp lang und befindet sich 5' der ApaI-Schnittstelle außerhalb des *Targeting*-Konstrukts. Die interne Sonde (Probe1) ist 260 bp lang und befindet sich zwischen der SacII- und der 3' EcoRV-Schnittstelle. Nach Restriktionsspaltung der ES-Zell-DNA mit XbaI und einer Southern Blot Analyse markiert die interne Sonde ein 7,3 kb Fragment bei einem Wildtyp bzw. ein 5,3 kb Fragment bei einem mutierten Allel. Das kürzere Fragment entsteht durch die ebenfalls in der Neomycin-Selektionskassette enthaltene XbaI-Schnittstelle. Erscheinen zusätzliche Banden oder Banden einer anderen Größe, zeigt dies eine zusätzliche, heterologe Integration eines *Targeting*-Konstrukts an. Die Abbildung 3.25 zeigt schematisch das Testican-3 *Targeting*-Konstrukt, den entsprechenden genomischen Lokus, alle relevanten Restriktionsschnittstellen und die Position der beiden Sonden.

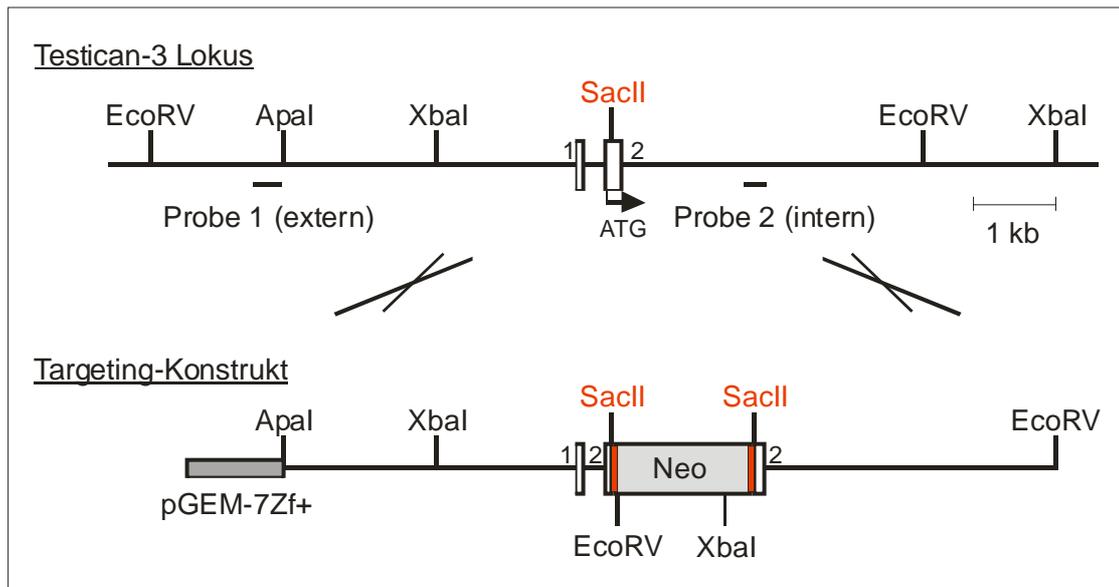


Abb. 3.25: Testican-3 Targeting-Konstrukt

Dargestellt ist das Testican-3 *Targeting*-Konstrukt, der entsprechende genomische Bereich des Testican-3 Gens und alle zur Klonierung und Analyse relevanten Restriktionsschnittstellen. SacII: Klonierung des SacII Linkers, durch dessen Hilfe die Neomycin (Neo)-Selektionskassette inseriert werden konnte; EcoRV: Analyse homolog integrierter ES-Zell-Klone durch Restriktionsspaltung und Southern Blot Analyse mit Hilfe der externen Sonde (Probe 1); XbaI: Ausschließen einer heterologen Integration eines zusätzlichen Konstrukts durch Restriktionsspaltung und anschließende Southern Blot Analyse mit der internen Sonde (Probe 2); Apal/EcoRV: Klonierung des DNA-Fragments, zur Konstruktion des *Targeting*-Vektors. Die weißen Kästchen stellen das erste und zweite Exon des Testican-3 Gens dar; die roten Balken stellen den Linker, der eine NotI-Schnittstelle enthält, über die dann die Neomycin-Selektionskassette kloniert werden konnte. ATG: Startcodon für die Translation; pGEM-7Zf+: Klonierungs-Vektor.

3.4.2 Herstellung rekombinanter ES-Zell-Klone

Die Herstellung rekombinanter ES-Zell-Klone erfolgte analog zu Testican-1 (vg. Kapitel 3.2.2). Es wurde ebenfalls die ES-Zelllinie IB10 verwendet und das *Targeting*-Konstrukt wurde vor der Elektroporation mit dem Enzym KpnI linearisiert. Mit Hilfe der externen Sonde konnten aus ca. 400 isolierten ES-Zell-Klonen acht mit homolog integriertem Testican-3 *Targeting*-Konstrukt identifiziert werden. Einer dieser Klone enthielt jedoch ein zusätzlich integriertes Konstrukt und wurde nicht weiter verwendet werden. Drei der verbleibenden sieben Klone wurden für die Generierung einer Testican-3 defizienten Mauslinie ausgewählt (Klon 241, 262 und 294). Von diesen drei ES-Zell-Klonen ist in Abbildung 3.26 die Southern Blot Analyse mit der externen (Probe 1) und internen Sonde (Probe 2) gezeigt.

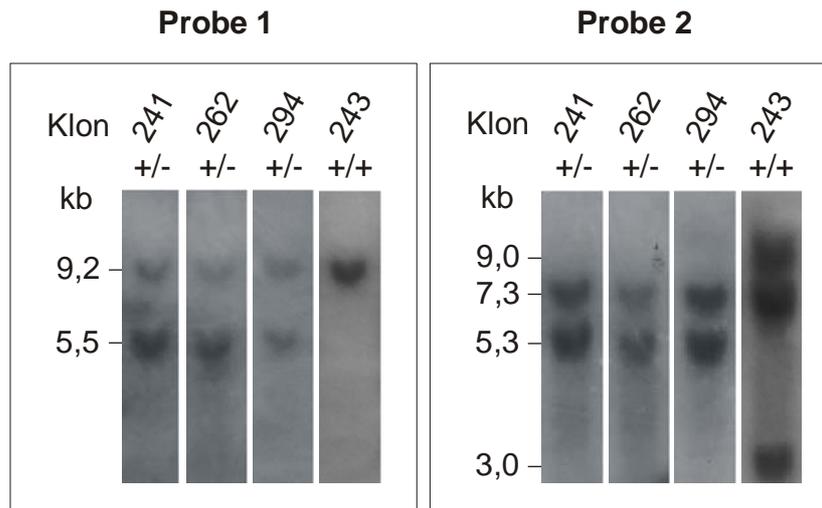


Abb. 3.26: Analyse von ES-Zell-Klonen transfiziert mit dem Testican-3 Targeting-Konstrukt

Restriktionsspaltung von verschiedenen ES-Zell-Klonen, links mit EcoRV und anschließender Southern Blot Analyse mit der externen Sonde (Probe 1), rechts mit XbaI und der anschließenden Southern Blot Analyse mit der internen Sonde (Probe 2). Die Klone 241, 262 und 294 zeigen im Vergleich zu Klon 243 eine homologe Integration des Testican-1 Targeting-Konstrukts, ohne ein zusätzliches Konstrukt im Genom heterolog integriert zu haben.

3.4.3 Etablierung einer Testican-3 defizienten Mauslinie

Die Mikroinjektion der drei ausgewählten ES-Zell-Klone und der Blastocystentransfer wurden ebenfalls durch das ZMMK analog zu Testican-1 durchgeführt. Allerdings entstand bis jetzt nur aus dem ES-Zell-Klon 241 eine Keimbahnchimäre, die heterozygote Nachkommen (F1-Generation) erzeugte. Heterozygote Tiere der F1-Generation wurden zur Etablierung einer Testican-3 defizienten Linie untereinander verpaart. Die Genotypisierung erfolgte zunächst durch EcoRV-Restriktionsspaltung der genomischen DNA aus Schwanzspitzenbiopsien und anschließender Southern Blot Analyse mit Hilfe der externen Sonde. Später wurde die Genotypisierung mittels PCR, nach demselben Prinzip wie schon für Testican-1 (siehe Kapitel 3.2.4), durchgeführt. In der Abbildung 3.27 ist beispielhaft die PCR-Analyse einer Wildtyp, heterozygoten und T3^(-/-) Maus dargestellt. Die verwendeten Testican-3 spezifischen Primer wurden mit T3-Ex1s2 (sense Orientierung) bzw. T3-Ex2a2 (antisense Orientierung) bezeichnet. Der dritte Primer in der Neomycin-Selektionskassette (Neo_a) ist derselbe, wie schon bei Testican-1.

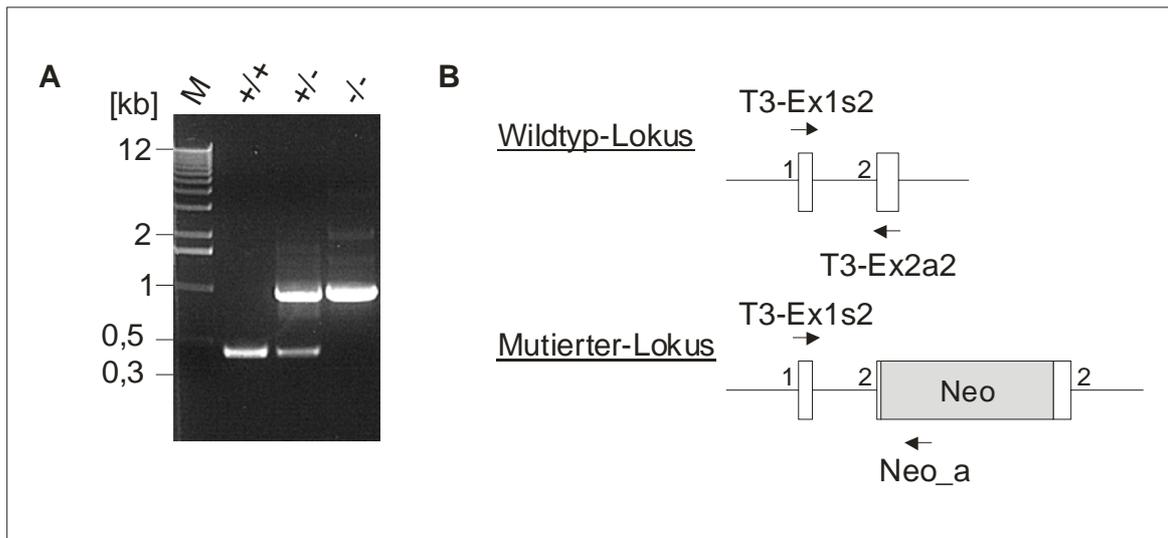


Abb. 3.27: Genotypisierung der Testican-3 defizienten Mäuse der Mauslinie T3-241

A: PCR Analyse

B: Schematische Darstellung des genomischen Wildtyp- bzw. mutierten Testican-3 Locus mit der Position der verwendeten Primerpaare, die zu den entsprechenden PCR-Produkten in A führen

M: 12 kb-Leiter; Neo: Neomycin-Selektionskassette.

3.5 Analyse der Testican-3 defizienten Mauslinie

Testican-3 defiziente Mäuse waren gesund und zeigten keinerlei Unterschiede zu ihren gleichaltrigen Geschwistertieren. Da die Tiere erst zum Ende dieser Arbeit geboren wurden, lässt sich noch keine Aussage darüber treffen, ob das mutierte Testican-3 Gen nach den Mendelschen Regeln vererbt wird.

Das Fehlen des Testican-3 Proteins in der Mauslinie T3-241 wurde mit Hilfe der Immunpräzipitation nachgewiesen. Da die Expression von Testican-3 in der adulten Maus auf das Gehirn beschränkt ist, wurden Proteinextrakte aus Wildtyp und T3^(-/-) Gehirn hergestellt. Anschließend wurde das Protein mit Hilfe des Testican-3 spezifischen Antikörpers aus dem Extrakt präzipitiert. Testican-3 konnte eindeutig in dem Wildtypextrakt nachgewiesen werden und erscheint in der Western Blot Analyse als polydisperse Bande zwischen 97 und 205 kDa (Abb.3.28). In der parallel durchgeführten Präzipitation aus T3^(-/-) Extrakt fehlt Testican-3 völlig. Bei der Bande um 50 kDa im Wildtyp und T3^(-/-) Extrakt handelt es sich um die schwere Kette des Testican-3 Antikörpers, da die Immunpräzipitation mit demselben Antikörper wie die anschließende Western Blot Analyse durchgeführt wurde. In der rechten Spur wurde rekombinantes

Testican-3 Protein aufgetragen. Dabei ist hauptsächlich das Core-Protein von Testican-3 bei 60 kDa zu sehen.

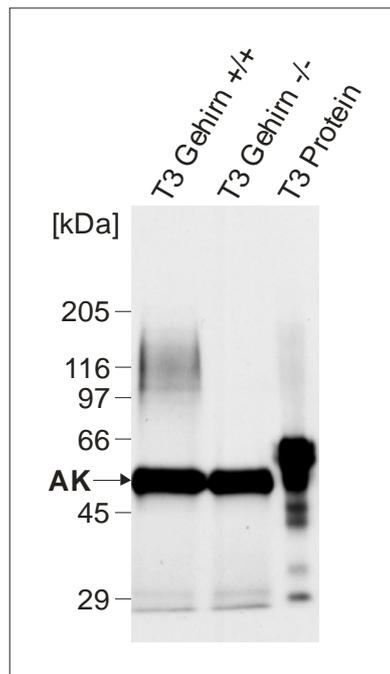


Abb. 3.28: Immunpräzipitation von Testican-3

Aus Wildtypextrakten von adulten Wildtyp und Testican-3 defizienten Mäusen der Linie T3-241 erfolgte mit Hilfe des Testican-3 Antikörpers aus Kaninchen eine Immunpräzipitation. Das Testican-3 Protein liegt im Wildtyp als polydisperse Bande, die im T3^(-/-) Extrakt fehlt. Bei den ca. 50 kDa großen Banden im Wildtyp und T3^(-/-) Extrakt handelt es sich um die schwere Kette des Antikörpers, da die Immunpräzipitation und die anschließende Western Blot Analyse mit demselben Antikörper durchgeführt wurden. In der rechten Spur wurden 50 ng rekombinantes Testican-3 Protein aufgetragen.

4 Diskussion

4.1 Generierung Testican-1 defizienter Mauslinien

Um die Funktion von Testican-1 *in vivo* untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit das Testican-1 Gen in der Maus inaktiviert. Dazu wurde zunächst das entsprechende Gen in embryonalen Stammzellen durch konventionelles *Gene-Targeting* gentechnisch verändert. Aus diesen Stammzellen wurden dann Testican-1 defiziente Mauslinien generiert.

Das Testican-1 *Gene-Targeting* Konstrukt konnte durch homologe Rekombination erfolgreich in das Genom embryonaler Stammzellen integriert werden. Es wurden drei ES-Zell-Klone mit homolog integriertem Konstrukt identifiziert. Durch Mikroinjektion dieser mutierten ES-Zellen in Blastocysten ist es gelungen, aus zwei dieser drei ES-Zell-Klone (Nummer 15 und 369) Chimäre zu erzeugen, die das mutierte Testican-1 Gen in der Keimbahn trugen. Anschließend konnten durch Rückkreuzung der keimbahnchimären Mäuse zwei unabhängige Testican-1 defiziente Mauslinien erzeugt werden. Kommt es zu einem Phänotyp, sollte sich dieser in beiden Mauslinien zeigen. Die Generierung von zwei unabhängigen Mauslinien dient dazu, vollständig ausschließen zu können, dass es bei der Integration des Targeting-Konstrukts in das Genom der ES-Zellen zu nicht zu detektierenden Fehlern gekommen war und ein weiteres Gen mutiert wurde. Beide Linien wurden zusätzlich durch Verpaaren der Chimären mit Mäusen der Stämme C57Bl/6 und 129Sv auf zwei verschiedene genetische Hintergründe gezüchtet, um bei einem möglichen Phänotyp ausschließen zu können, dass dieser nur durch den genetischen Hintergrund und nicht durch die eingeführte Mutation verursacht wird. Es wäre denkbar, dass ein Phänotyp erst bei einem bestimmten genetischen Hintergrund zum Vorschein kommt und in einem anderen Hintergrund zu schwach ausgeprägt ist, um erkannt zu werden. So ist z.B. der Phänotyp nach der Inaktivierung des Egfr (*epidermal growth factor receptor*)-Gens abhängig vom genetischen Hintergrund. Mit einem CF-1 Hintergrund sterben die Embryonen bereits während der Einnistungsphase in den Uterus. Dagegen können mutante Tiere auf einem CD-1 Hintergrund postnatal bis zu drei Wochen alt werden [Threadgill, 1995].

Da verschiedene Inzuchtmausstämme sehr große Unterschiede in ihrem Verhalten zeigen, ist ein reinerbiger genetischer Hintergrund insbesondere für die Durchführung von Verhaltenstests wichtig. Es ist zum Beispiel bekannt, dass Tiere des Stammes 129, aus dem die ES-Zellen gewonnen werden, ein sehr schlechtes räumliches Lernvermögen im Vergleich zu Tieren des Stammes C57Bl/6, zeigen [zur Übersicht siehe Gerlai, 1996]. In Verhaltensstudien wird häufig das Lernvermögen der mutanten Tiere überprüft. Daher werden für diese Studien insbesondere Mäuse mit einem C57Bl/6 Hintergrund verwendet [zur Übersicht siehe Gerlai, 1996]. Zu einem späteren Zeitpunkt sollen mit den hier erzeugten Mauslinien ebenfalls Verhaltensstudien durchgeführt werden. Da es sich bei Testican-1 um ein neuronales Protein handelt, ist es gut vorstellbar, dass es durch das Fehlen von Testican-1 zu einem Verhaltensphänotyp kommt.

Durch die Verpaarung einer Chimäre mit C57Bl/6 Tieren entstehen zunächst Testican-1 defiziente Mäuse mit einem genetisch gemischtem Hintergrund, da die ES-Zellen und damit die Keimzellen der Chimäre, von dem Mausstamm 129/Ola abstammen. Jedes Tier der F1-Generation enthält dadurch je eine Hälfte der Chromosomen aus dem Stamm C57Bl/6 und die andere Hälfte aus dem Stamm 129/Ola. Bei der Gametogenese der F1-Tiere kommt es während der Meiose durch *cross-over* zur Durchmischung der Gene beider genetischer Hintergründe. Durch die Verpaarung heterozygoter Tiere der F1-Generation mit dem Ziel, T1^(-/-) Mäuse zu erhalten, entstehen Tiere der F2-Generation, die durch rekombinante Chromosomen aus beiden genetischen Hintergründen gekennzeichnet sind. Dabei besitzt jedes einzelne Tier der F2-Generation unterschiedliche Gene des einen oder anderen Hintergrundes. Um einen einheitlichen Hintergrund zu erhalten, wurden die Linien Tes15 und Tes369 während dieser Arbeit viermal mit C57Bl/6 Tieren verpaart. Nach einer persönlichen Mitteilung von Herrn Dr. Smyth sollten für Verhaltenstests mindestens sechs Rückkreuzungen durchgeführt worden sein. Um sämtliche Gene des 129 Hintergrundes zu entfernen, wäre es nötig 12 Rückkreuzungen vorzunehmen [zur Übersicht siehe Gerlai, 1996].

4.2 Nachweis der Testican-1 Defizienz

Zunächst wurde überprüft, ob es sich bei den hier generierten T1^(-/-) Mäusen tatsächlich um Testican-1 defiziente Tiere handelt. Dazu wurde die Testican-1 mRNA aus Gehirnen von T1^(-/-) Mäusen mittels RT-PCR analysiert. Dabei entstand aus der mRNA von T1^(-/-)

Mäusen wider Erwarten ein PCR-Produkt (siehe Abb. 3.15). Ein Größenvergleich und die Sequenzanalyse der PCR-Produkte von Wildtyp und T1^(-/-) Mäusen ergab, dass nach der Insertion der Neo-Kassette in Exon 2 das erste Exon an Exon 3 gespleißt wird und somit Exon 2, welches das Startcodon für die Transkription enthält, zusammen mit der Selektionskassette aus dem Transkript entfernt wird. Eine weitere Überprüfung der mRNA durch eine Northern Blot Analyse zeigte, dass die mutierte Testican-1 mRNA in signifikant geringerer Konzentration vorliegen muss, da hier nur im Wildtyp ein Signal zu detektieren war (siehe Abb. 3.16). Durch das Entfernen des Startcodons ATG aus der ohnehin stark verringerten Anzahl von Transkripten ist die Translation eines vollständigen Proteins nicht möglich. Das nächste, im gleichen Leseraster liegende ATG befindet sich in Exon 6 und ist in ein der Kozak-Sequenz sehr ähnliches Sequenz-Motiv eingebettet (sieben von zehn Positionen sind konserviert). Würde das in Exon 6 liegende ATG als Startcodon verwendet, würde das Signalpeptid, die Domäne I und ein Teil der Follistatin-ähnlichen Domäne in dem trunkierten Testican-1 Protein fehlen. Ohne Signalpeptid aber könnte das trunkierte Protein seinen eigentlichen Bestimmungsort, die ECM, nicht erreichen.

Anschließend wurde auf Proteinebene untersucht, ob es sich bei den hier generierten T1^(-/-) Mäusen tatsächlich um Testican-1 defiziente Tiere handelt und auch kein trunkiertes Protein gebildet wird. Das Fehlen eines Testican-1 Proteins in T1^(-/-) Mäusen konnte durch eine Immunpräzipitation mit dem Testican-1 Antikörper aus Kaninchen (rb-T1) und anschließender Western Blot Analyse mit einem weiteren Testican-1 spezifischen Antikörper aus Huhn (ck-T1) bewiesen werden (siehe Abb. 3.17). Testican-1 konnte ausschließlich in Proteinextrakten aus Wildtyp Gehirn und nicht in T1^(-/-) Gewebe nachgewiesen werden. Beide Testican-1 Antikörper waren außerdem in einem Kontrollversuch in der Lage, ein trunkiertes rekombinantes Testican-1 Protein, bestehend aus den beiden C-terminalen Domänen (TY und V) des Proteins, nachzuweisen. So konnte auch ausgeschlossen werden, dass ein mögliches trunkiertes Protein existiert und nicht detektiert würde. Somit handelt es sich bei den in dieser Arbeit generierten T1^(-/-) Mäusen um Nullmutanten bezüglich des Testican-1 Proteins.

Zusätzlich wurde das Fehlen des Testican-1 Proteins durch immunhistologische Färbungen von Wildtyp und T1^(-/-) Gehirnschnitten überprüft. Ein Vergleich der Färbungen (Abb. 3.21) zeigte eindeutig das Fehlen des Testican-1 Signals im Bulbus olfactorius des T1^(-/-) Gehirnschnitts. Im Thalamus und der Medulla unterscheiden sich die Färbungen von

Wildtyp und T1^(-/-) Gewebe signifikant. Allerdings ist bei der Färbung des T1^(-/-) Gewebes noch ein schwaches Signal zu erkennen, z.B. um die Neurone der Medulla. Es wäre nun möglich, dass der verwendete Antikörper (rb-T1) unspezifisch ist und so die schwachen Signale zu erklären sind. Dies ist aber eher unwahrscheinlich, da zwar das Rohserum unspezifisch, der für die Färbungen verwendete rb-T1 Antikörper aber aufwendig affinitätsgereinigt war. Nach der Reinigung zeigte der Antikörper zwar noch eine Kreuzreaktivität zu Testican-2 und SC1; die Kreuzreaktivität zu Testican-2 konnte aber durch Präinkubation des rb-T1 Antikörpers mit rekombinantem Testican-2 Protein inhibiert werden. Eine Kreuzreaktion mit SC1 konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, da eine Färbung mit einem SC1 Antikörper ein unterschiedliches Expressionsmuster zeigte (Daten nicht gezeigt). Da sich in Vorversuchen einer immunhistologischen Analyse von Wildtyp Gehirnen andeutete, dass das Testican-1 Signal zu gering war, um es gut dokumentieren zu können, wurde hier eine Methode zur Signalverstärkung angewandt. Die Tatsache, dass Testican-1 generell nur in sehr geringen Mengen im Gehirn exprimiert wird, zeigte sich bereits dadurch, dass eine Western Blot Analyse von Gehirnextrakten zur Detektion von Testican-1 nicht sensitiv genug war und das Protein in den Wildtyp Gehirnextrakten nur durch eine Immunpräzipitation nachgewiesen werden konnte. Daher wurde für die hier gezeigten immunhistologischen Färbungen von Wildtyp und Testican-1 defizientem Gewebe (Abb. 3.21) ein Verstärkersystem (Vectastain Elite ABC Kit) verwendet. Vermutlich verstärkt dies nicht nur das spezifische Signal, sondern in einigen Bereichen des Gehirns auch den Hintergrund. Daher wird angenommen, dass das schwache Signal im Thalamus und der Medulla des T1^(-/-) Gewebes auf die hier verwendete Färbemethode zurückzuführen ist.

4.3 Lokalisation von Testican-1

Durch den Vergleich der immunhistologischen Färbungen von Wildtyp und T1^(-/-) Gehirnschnitten konnte Testican-1 eindeutig im Bulbus olfactorius, Thalamus und der Medulla lokalisiert werden. Dabei stellt sich die Frage, welche Zellen Testican-1 exprimieren. Größe und Form der in Abbildung 3.21 dargestellten Zellen, insbesondere in der Medulla, lassen darauf schließen, dass Testican-1 von Neuronen exprimiert wird. Um dies zu beweisen, müssten Doppelfärbungen mit einem Neuronen-Marker durchgeführt werden. Dies war nicht möglich, da als Voraussetzung für eine Doppelfärbung zwei

Primärantikörper aus unterschiedlichen Spezies nötig sind. Der einzig käuflich zu erwerbende und funktionierende Antikörper für die Markierung von Neuronen ist ein Antikörper gegen NSE (NSE, *neuron specific enolase*). Dieser ist aber ebenso wie der Testican-1 Antikörper (rb-T1) in Kaninchen generiert worden. Der zweite in dieser Arbeit hergestellte Testican-1 Antikörper aus Huhn konnte aufgrund seiner zu geringen Konzentration nicht für die Immunhistologie verwendet werden. Daher konnte keine Kolokalisation von Testican-1 mit Neuronen gezeigt werden.

Derzeit besteht eine Diskrepanz zwischen der hier gezeigten Lokalisation von Testican-1 und den Daten aus der Literatur. Von einer französischen Arbeitsgruppe wurden Testican-1 Transkripte durch *in situ* Hybridisierung an den Pyramidal-Neuronen der CA3 Region des Hippocampus lokalisiert. Anschließende elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten Testican-1 Proteine an der postsynaptischen Membran dieser Neurone [Bonnet, 1996]. Eigene immunhistochemische Färbungen ließen bei lichtmikroskopischer Betrachtung keine Testican-1 spezifischen Signale im Hippocampus erkennen. Dies könnte durch die Verwendung verschiedener Testican-1 Antikörper bedingt sein. Der von Bonnet und Mitarbeitern verwendete Antikörper wurde gegen ein humanes Testican-1 Antigen generiert. Außerdem war dieses humane Protein in einem bakteriellen Expressionssystem hergestellt worden. Der in dieser Arbeit verwendete Antikörper wurde gegen murines Testican-1 Protein generiert, welches in einem eukaryotischen System (EBNA-Zellen) exprimiert worden war. Der Vorteil eines solchen Expressionssystems liegt darin, dass eukaryotische Zellen posttranslationale Modifikationen (wie das Anheften von GAG-Ketten an das Core-Protein) durchführen. Außerdem sind sie im Gegensatz zu bakteriellen Zellen in der Lage, Disulfid-Brücken in ausreichendem Umfang zu knüpfen. Dies ist für die korrekte Faltung des rekombinanten Proteins wichtig. Da Testican-1 mehrere Cysteine in der Aminosäuresequenz enthält, wird davon ausgegangen, dass es zwischen den Cystein-Seitengruppen zur Ausbildung von Disulfid-Brücken kommt. In einem eukaryotischen Expressionssystem kann ein rekombinantes Protein entstehen, das dem nativen Protein ähnlicher ist als ein bakteriell hergestelltes Protein. Je genauer das zur Antikörperproduktion verwendete Antigen dem endogen vorkommenden Protein entspricht, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit, einen spezifischen Antikörper zu erzeugen. Trotz der Verwendung eines eukaryotischen Systems zur Produktion des Antigens und der Affinitätsreinigung zeigten sich im Falle des hier verwendeten rb-T1 Antikörpers zu Beginn dieser Arbeit erhebliche Probleme durch Kreuzreaktionen des

Antikörpers. Eine Überprüfung der Kreuzreaktion des rb-T1 Antikörpers zu Proteinen der BM-40 Familie war nur möglich, da in unserem Arbeitskreis all diese Proteine rekombinant vorliegen. Da nicht bekannt ist, ob der von der französischen Arbeitsgruppe verwendete Antikörper auf Kreuzreaktivitäten hin überprüft wurde, könnte es sich bei dem Signal im Hippocampus möglicherweise um eine Kreuzreaktion mit Testican-2 oder -3 handeln. Sowohl Testican-2 als auch Testican-3 konnten von unserer Arbeitsgruppe im Hippocampus nachgewiesen werden [Schnepf, 2004; Hechler, 2003]. Dies kann jedoch nicht die durch *in situ* Hybridisierung erhaltenen Daten der französischen Gruppe erklären, die Testican-1 Signale in der CA3 Region des Hippocampus zeigen. Möglicherweise waren die Bedingungen der *in situ* Hybridisierung nicht spezifisch genug. So könnte die Sonde unspezifisch gebunden vorliegen, wenn die Präparate nach der Hybridisierung der Sonde nicht stringent genug gewaschen wurden.

Die jüngste Veröffentlichung einer weiteren Arbeitsgruppe bestätigt die eigenen Daten. Sie beschreibt eine Testican-1 Lokalisation im Thalamus [Edgell, 2004].

4.4 Analyse der Glykosaminoglykan-Ketten von Testican-1

Das errechnete Molekulargewicht von Testican-1 liegt bei 47,5 kDa, wie aber in Abbildung 3.8 und 3.9 zu sehen ist, erscheint Testican-1 in der Western Blot Analyse als eine für Proteoglykane typische polydisperse Bande. Da auch die Aminosäure-Sequenz zwei potentielle Anheftungsstellen für GAG-Ketten aufweist, handelt es sich bei Testican-1 aller Wahrscheinlichkeit nach um ein Proteoglykan. Um zu analysieren, welche GAG-Ketten an das Core-Protein angeheftet werden, wurde versucht die GAG-Ketten mit verschiedenen Enzymen abzuspalten. Da die Natur der GAG-Ketten in Abhängigkeit von der Zell- oder Gewebe-spezifischen Expression einiger für die Glykosylierung notwendigen Enzyme variieren kann [siehe Kapitel 1.3 und zur Übersicht Bandtlow und Zimmermann, 2000], wurde endogenes Testican-1 aus C2F3 Zellen und dem adulten Mausgehirn sowie rekombinantes Testican-1 aus EBNA-Zellen bezüglich der GAG-Ketten analysiert (siehe Abb. 3.9). Testican-1 aus diesen drei Quellen zeigte sowohl nach Behandlung mit Heparinase I und III (spaltet Heparansulfat (HS)-Ketten) als auch nach

Chondroitinase ABC Behandlung (spaltet Chondroitinsulfat (CS)- und Dermatan-sulfat (DS)-Ketten) in der Western Blot Analyse eine Verschiebung des Molekulargewichts zu geringeren Größen. Dies bedeutet, dass es sich bei Testican-1 um ein HS- und CS- oder DS Proteoglycan handelt. Zusätzlich erscheint bei Testican-1 aus Gehirn und rekombinantem Protein nach der Behandlung mit Heparinase und/oder Chondroitinase auch noch eine höher molekulare Form (über 116 kDa) von Testican-1 im Vergleich zu unbehandeltem Protein. Wären an das Core-Protein ausschließlich HS oder CS/DS-Ketten gebunden, sollte bei vollständiger Abspaltung aller GAG-Ketten in der Western Blot Analyse lediglich das Core-Protein bei 47,5 kDa zu sehen sein. Dies ist aber weder bei endogenem Testican-1 aus C2F3 Zellen und Gehirn noch bei dem rekombinanten Protein der Fall. Da die Enzyme im Überschuss eingesetzt wurden, ist eine unvollständige Abspaltung von HS und CS/DS unwahrscheinlich. Vermutlich liegt zusätzlich Keratansulfat (KS) vor, welches an das Core-Protein gebunden ist. Um dies zu überprüfen hätte Testican-1 einer Keratanase Behandlung unterzogen werden müssen. Dies war aus zeitlichen Gründen nicht möglich.

4.5 Charakterisierung der Testican-1 defizienten Mäuse

Der Anteil homozygoter $T1^{(-/-)}$ Nachkommen aus Verpaarungen heterozygoter Mäuse entsprach mit ca. 25 % den Mendelschen Regeln. Dies bedeutet, dass sich das Fehlen von Testican-1 nicht auf die Embryonalentwicklung auswirkt. $T1^{(-/-)}$ Tiere zeigten keine offensichtlichen Defekte im Vergleich zu Wildtyp Mäusen. Sie waren fertil und gesund, soweit dies an der Beschaffenheit des Fells und dem Verhalten der Tiere zu beurteilen war. Die Tiere konnten sehen und hören und zeigten keine motorischen Auffälligkeiten. Sie waren in der Lage zu schwimmen und zeigten mit Vorder- und Hinterläufen einen Greifreflex. Ebenso konnten Testican-1 defiziente Tiere das durchschnittliche Lebensalter von Mäusen erreichen; d.h. das Fehlen von Testican-1 wirkt sich auch nicht auf die postnatale Entwicklung der $T1^{(-/-)}$ Tiere aus.

Da Testican-1 in der adulten Maus ausschließlich im Gehirn exprimiert wird, wurde bei der Analyse Testican-1 defizienter Mäuse insbesondere das Gehirn untersucht.

Zunächst wurde analysiert, ob durch das Fehlen von Testican-1 die Größe oder Form des Gehirns beeinflusst wird. Dazu wurden die Gehirne von Testican-1 defizienten Tieren und ihren Wildtyp Geschwistern präpariert und zu Dokumentationszwecken fotografiert (siehe Abb. 3.19). Größe, Form und Fissuren Testican-1 defizienter Gehirne waren im Vergleich zu Wildtyp Gehirnen unverändert. Alle Gehirnbereiche, wie z.B. der Bulbus olfactorius oder das Cerebellum waren vorhanden und es zeigten sich keine gravierenden morphologischen Veränderungen wie beispielsweise ein Hydrocephalus.

Zur genaueren Analyse der Morphologie Testican-1 defizienter Gehirne wurden Kresylechtviolett Färbungen von Gehirnschnitten angefertigt und analysiert (siehe Abb. 3.20). Mit dieser histologischen Färbung konnten keine Unterschiede zwischen Wildtyp und T1^(-/-) Gewebe festgestellt werden.

Um die Struktur des Gehirns noch detaillierter untersuchen zu können, wurden die Gehirne von Wildtyp und Testican-1 defizienten Tieren immunhistologisch untersucht (siehe Abb. 3.23). Durch Färbung von Neuronen und Gliazellen sollte analysiert werden, ob durch die Testican-1 Defizienz die Morphologie des Gehirns beeinflusst wird und beispielsweise Gruppen von Neuronen oder Gliazellen fehlen oder die Position dieser Zellen im Gehirn verändert ist. So hatte z.B. das Fehlen von allen NCAM (neural cell adhesion molecule) Isoformen zur Folge, dass Interneurone des Bulbus olfactorius, welche als Vorläufer in der Subventricularzone des Vorderhirns entstehen, nicht in den Bulbus olfactorius einwandern konnten. Durch immunhistologische Färbungen konnte gezeigt werden, dass sich die Vorläuferzellen an der Strecke, die sie für ihre Wanderung verwenden, akkumulieren [Chazal, 2000].

Da Bonnet et al. zeigten, dass Testican-1 in postsynaptischen Bereichen von Pyramidalneuronen lokalisiert ist [Bonnet, 1996], wurden hier auch Synapsen immunhistologisch analysiert. Weder durch die Färbung von Synapsen noch von Neuronen und Gliazellen konnten Unterschiede zwischen Wildtyp und Testican-1 defizientem Gewebe festgestellt werden. Da Proteoglykane eine Rolle bei der Wegfindung von Neuriten zugesprochen wird [Bovolenta, 2000], wurden zusätzlich Axone immunhistologisch untersucht. Um die Axone sichtbar zu machen, wurden Neurofilamente angefärbt. Es wurde dabei analysiert, ob sich das Fehlen von Testican-1 z.B. auf die Faszikulierung von Axonen auswirkt oder ob axonale Trakte fehlen. Einen solchen Phänotyp zeigen beispielsweise defiziente Mäuse aller Isoformen von NCAM. Durch das

Fehlen ist im Hippocampus das Auswachsen von Axonen und deren Faszikulierung stark beeinträchtigt [Cremer, 1997]. Es konnten aber auch hier bezüglich der axonalen Fasern keine Unterschiede zwischen Wildtyp und T1^(-/-) Gewebe festgestellt werden.

Einschränkend sei darauf hingewiesen, dass all diese immunhistologischen Färbungen lediglich eine Übersicht der Morphologie zeigen. Wenn nur einige wenige Zellen oder Synapsen fehlen oder z.B. die Struktur der Synapsen verändert wäre, würde dies nicht zu erkennen sein. Um die Gehirne genauer analysieren zu können, sind daher langfristig elektronenmikroskopische Untersuchungen geplant.

4.6 Wird das Fehlen von Testican-1 kompensiert?

Zeigt die Inaktivierung eines Gens, wie hier des Testican-1 Gens, keine Konsequenzen, gibt es dafür zwei Erklärungsmöglichkeiten: Entweder das Protein hat im Organismus keine Funktion, oder das Fehlen kann von einem anderen Protein kompensiert werden. Da ein Testican Ortholog bereits in Invertebraten (u.a. *C. elegans*) gefunden werden kann und es eher unwahrscheinlich ist, dass ein Protein ohne Funktion im Laufe der Evolution konserviert bleibt [Cooke, 1997], erscheint bei dem fehlenden Phänotyp von Testican-1 ein kompensatorischer Mechanismus wahrscheinlicher. Für eine Kompensation kommen in erster Linie verwandte Proteine in Frage. Diese könnten z.B. durch Überexpression die Funktion des fehlenden Proteins übernehmen. Im Fall von Testican-1 kommen hierfür Testican-2 und -3 in Frage, da beide ebenso wie Testican-1 im Gehirn vorkommen, wie es bereits durch Northern Blot Daten gezeigt ist [Bonnet, 1996; Vannahme, 1999; Hechler, 2003]. Um die Expressionsraten von Testican-2 und -3 in der Testican-1 defizienten Maus zu überprüfen, wurde eine Western Blot Analyse bzw. Immunpräzipitation von Proteinextrakten aus dem Gehirn einer Wildtyp und T1^(-/-) Maus durchgeführt (siehe Abb. 3.18). Zusätzlich wurde auch die Expression von SC1 untersucht, da es sich bei SC1 um das am stärksten exprimierte Mitglied der BM-40 Familie im Gehirn handelt. Es konnte weder von Testican-3 noch von Testican-2 oder SC1 eine Veränderung in der Expressionsrate festgestellt werden.

Durch immunhistochemische Färbungen von Gehirnschnitten mit Testican-2 und -3 spezifischen Antikörpern wurde untersucht, ob es eventuell statt zu einer verstärkten Expression zu einer Umverteilung der beiden anderen Testicane innerhalb des Gehirns

kommt, um so das Fehlen von Testican-1 auszugleichen. So ein Mechanismus wurde für die Nidogene gezeigt. Im Skelettmuskel von Nidogen-1 defizienten Mäusen konnte in Northern und Western Blot Analysen keine verstärkte Expression von Nidogen-2 detektiert werden. Die anschließende immunhistologische Untersuchung zeigte eine Umverteilung von Nidogen-2 in Nidogen-1 defizientem Muskelgewebe. Basalmembranen, die im Muskel sonst nur Nidogen-1 aufweisen, zeigten ein Nidogen-2 Signal, so dass angenommen werden kann, dass ein Mangel an Nidogen-1 durch die Umverteilung von Nidogen-2 kompensiert werden kann [Murshed, 2000]. Ein unterschiedliches Expressionsmuster von Testican-2 und -3 konnte im Vergleich von Testican-1 Wildtyp und defizientem Gehirn nicht beobachtet werden. Dies ist am Beispiel der Thalamus Färbung in Abbildung 3.22 gezeigt.

Weder die hier durchgeführte Western Blot Analyse noch die Untersuchung einer Umverteilung von verwandten Proteinen ließen Anzeichen für eine Kompensation von Testican-1 in $T1^{(-/-)}$ Mäusen erkennen.

Der fehlende Phänotyp könnte auch durch Redundanz erklärt werden; haben mehrere Proteine dieselbe Funktion in einem Organismus, würde sich das Fehlen eines einzigen Proteins mit dieser Funktion nicht auswirken. Dafür kämen alle anderen Familienmitglieder der BM-40 Familie in Frage, da sie strukturell aus übereinstimmenden Proteindomänen aufgebaut sind und den einzelnen Proteindomänen bestimmte Funktionen zugeschrieben werden. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass der *platelet-derived growth factor* (PDGF) an die EC-Domäne von BM-40 bindet [Gohring, 1998]. Da alle Mitglieder der BM-40 Familie eine EC-Domäne besitzen, könnten sie eventuell alle in der Lage sein, diesen Wachstumsfaktor zu binden.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Testican-1 seine Funktion nicht durch das Core-Protein sondern durch seine Zuckerketten ausübt. In diesem Fall könnten alle HS- oder CS-Ketten tragenden Proteoglykane die Funktion von Testican-1 kompensieren.

Abschließend lässt sich sagen, dass bei der bisher durchgeführten Analyse weder ein Phänotyp noch Hinweise auf eine Kompensation der Testican-1 Defizienz festgestellt werden konnten. Möglicherweise wurde ein Phänotyp bisher aber auch nicht gefunden, da in dieser Arbeit nur adulte Mäuse betrachtet wurden und sich ein Phänotyp vielleicht nur zu einem bestimmten Zeitpunkt der Mausentwicklung ausprägt. Charbonnier et al. zeigten, dass die Expression von Testican-1 während der Entwicklung der Maus mit Phasen der Proliferation und Migration von Neuronen korreliert ebenso wie mit dem Auswachsen von

Neuriten und der Ausbildung synaptischer Zellkontakte [Charbonnier, 2000]. Defizite während der Entwicklung der Maus könnten im Laufe der Zeit wieder ausgeglichen werden und bei der Betrachtung der adulten Maus nicht mehr festzustellen sein.

Es könnte sich aber auch um einen sehr subtilen Phänotyp handeln wie z.B. ein schlechteres Lernvermögen oder ein verändertes Sozialverhalten. Um dies zu überprüfen, müssten Verhaltenstests durchgeführt werden. Dazu sollten die Tiere aber einen einheitlichen genetischen Hintergrund aufweisen. Da bekannt ist, dass Wildtyp Tiere des Inzuchtstamms 129 Lerndefizite aufweisen und zur Generierung Testican-1 defizienter Mäuse ES-Zellen aus dem Mausstamm 129/Ola verwendet wurden, sollten Testican-1 defiziente Tiere vor der Durchführung von Verhaltenstests auf einen anderen genetischen Hintergrund (C57Bl/6) rückgekreuzt werden. Mit der Rückkreuzung der Tiere wurde bereits begonnen.

4.7 Interaktion von Testican-1 mit MMPs

Neue Daten bringen die Testicane in Verbindung mit der Aktivierung von MMPs. Sie zeigen, dass Testican-1 und -3 *in vitro* an MT-1 MMP binden und so die Aktivierung von MMP-2 inhibieren können [Nakada, 2001].

Eine veränderte Expression der MMPs wird mit der Invasivität und Metastasierung von Tumoren in Verbindung gebracht, weil dafür der Umbau der ECM nötig ist. Bei humanen Gliomen korreliert die erhöhte Menge an MMPs, darunter MMP-2, -9 und MT-MMPs mit der Invasivität der Tumorzellen [Nakada, 2003]. Im adulten ZNS werden MMPs allgemein nur in sehr geringen Mengen exprimiert [Yong, 2001]. Es gibt hier aber auch einige Ausnahmen; dazu zählen MT1-MMP und MMP-2 [Vecil, 2000; Clements, 1997]. Exprimierte MMPs liegen im Gewebe hauptsächlich als inaktive Vorstufen vor. Die Aktivierung der MMPs stellt einen sehr bedeutenden Regulationsmechanismus dieser Proteasen dar [Murphy, 1999]. So werden MT-MMPs vermutlich durch Plasmin auf der Oberfläche von Zellen aktiviert und aktives MT1- oder MT3-MMP kann wiederum die Aktivierung von MMP-2 vermitteln [Okumura, 1997; Nagase, 1997].

Eine Bindung von Testican-1 und -3 an MT1-MMP wurde von Nakada et al. allerdings nur indirekt durch Co-Expression von Testican-1, MT1-MMP und MMP-2 und anschließende Gelatine-Zymographie der transfizierten Zellkulturüberstände gezeigt.

In nachfolgenden Untersuchungen konnten Nakada und Mitarbeiter eine signifikante Verringerung der Expression aller Testicane in Glioblastomgewebe zeigen, wobei die Expressionsrate mit steigendem Tumorgrad abnahm [Nakada, 2003], was bedeuten könnte, dass ein Fehlen der MMP-Inhibitoren Testican-1 und -3 mit einer erhöhten Invasivität des Tumors einhergeht. Die Überlegung war nun, dass das Fehlen von Testican-1 in der T1^(-/-) Maus zu einer verstärkten Aktivierung von MMP-2 führen könnte. Dies wurde durch eine Gelatine-Zymographie überprüft (Abb. 3.24). Sie zeigt keine verstärkte Aktivierung von MMP-2 und sowohl in Wildtyp- als auch in T1^(-/-) Gehirnextrakten ist lediglich die inaktive Form von MMP-2 zu sehen. Pro-MMP-2 ist in dem Zymogramm aber nur als eine dünne Bande zu sehen. Wenn MMP-2 nur in geringen Mengen aktiviert wird, könnte eine möglicherweise vorhandene aktive Form von MMP-2 unter die Nachweisgrenze fallen und nicht detektiert werden. Es ist aber auch möglich, dass eine verstärkte Aktivierung von MMP-2 nur zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Entwicklung der Maus zu sehen wäre. Da hier nur die adulte Maus analysiert wurde, wäre dies nicht zu erkennen. Eine andere Möglichkeit wäre, dass sich eine Verstärkung der MMP-2 Aktivierung nur in kleinen Bereichen des Gehirns abspielt. Durch die Erstellung von Proteinextrakten aus relativ großen Gehirnarealen (Medulla, Cerebellum, Bulbus olfactorius und das restliche Gehirn ohne Cortex) könnte die MMP-2 Menge zu sehr verdünnt worden sein, so dass diese Menge in dem Zymogramm nicht mehr zu detektieren wäre. Da auch Testican-3 die Aktivierung von MMP-2 *in vitro* inhibiert, könnte auch das in der T1^(-/-) Maus vorhandene Testican-3 die Aktivierung von MMP-2 unterbinden. Somit wäre ebenfalls nur die inaktive Form von MMP-2 in dem Zymogramm zu sehen. Zusammenfassend konnte mit dieser Methode keine Aktivierung von MMP-2 gezeigt werden.

Um zu überprüfen, ob die Bindung von Testican-1 an MT1-MMP einen Einfluss auf die Metastasierung von Gliomzellen *in vivo* hat, könnten invasive Gliomzellen (z.B. SNB19) in Gehirne von Wildtyp und T1^(-/-) Mäusen injiziert werden. Dabei könnte untersucht werden, ob die Metastasierung der Gliomzellen in Wildtyp und Testican-1 defizienten Mäusen unterschiedlich verläuft. Möglicherweise kann so eine Funktion von Testican-1 geklärt werden.

4.8 Etablierung einer Testican-3 defizienten Mauslinie

Da während der Analyse der Testican-1 defizienten Mäuse schnell deutlich wurde, dass diese Tiere keine offensichtlichen Defizite zeigen, wurde mit der Generierung einer Testican-3 defizienten Mauslinie begonnen. Dies geschah vor dem Hintergrund, später eine Mauslinie mit zwei inaktiven Genen züchten zu können. Bei Testican-3 handelt es sich um ein HS-Proteoglykan, dessen Funktion ebenfalls noch nicht geklärt ist.

Die Generierung der Testican-3 defizienten Mauslinie erfolgte analog zu Testican-1 durch homologe Integration des Testican-3 *Targeting*-Konstrukts in ES-Zellen. Insgesamt konnten sieben verschiedene ES-Zell-Klone mit homolog integriertem *Targeting*-Konstrukt identifiziert werden. Drei dieser Klone (241, 261, 294) wurden in Blastocysten injiziert. Die daraus entstandenen Chimären wurden mit C57Bl/6 Tieren rückgekreuzt. Allerdings trug nur eine einzige Chimäre die Mutation in der Keimbahn. Somit konnte für Testican-3 nur eine defiziente Mauslinie etabliert werden, die aus dem ES-Zell-Klon 241 hervorgegangen ist.

Homozygote Testican-3 defiziente Tiere ($T3^{(-/-)}$) wurden erst gegen Ende dieser Arbeit geboren. Diese drei geborenen $T3^{(-/-)}$ Tiere sind lebensfähig und gesund und zeigen in einem ersten Vergleich zu ihren Geschwistern keine Auffälligkeiten. Die Tiere wurden mit Hilfe der PCR genotypisiert. Durch Immunpräzipitation konnte das Fehlen des Testican-3 Proteins nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.28). Die genaue Charakterisierung der Testican-3 defizienten Maus steht noch aus.

Da in unserer Arbeitsgruppe auch eine Testican-2 defiziente Mauslinie hergestellt wird, besteht die Möglichkeit zwei der drei Testicane oder gleichzeitig alle drei Gene in einer Mauslinie zu inaktivieren. Durch die Inaktivierung von mehreren Genen einer Proteinfamilie könnte eine Redundanz beseitigt werden, was wiederum zu einem Phänotyp führen könnte. Möglicherweise gelingt es so die Funktion der Testicane zu klären.

Ein entsprechendes Beispiel stellen die Nidogene dar. In Säugetieren gibt es zwei Nidogene (Nidogen-1 und -2), die in fast allen Basalmembranen gefunden werden. Nach dem Modell von Yurchenco und Schittny verbinden Nidogene Laminin und Kollagen IV Netzwerke und stabilisieren so die Basalmembran [Yurchenco, 1990]. Die Inaktivierung von Nidogen-1 oder -2 hatte keinen Effekt auf die Ausbildung und die Erhaltung von Basalmembranen [Murshed, 2000; Schymeinsky, 2002]; erst durch die Inaktivierung

beider Gene zeigen sich Veränderungen von Basalmembranen, die in Abhängigkeit vom Organ eine veränderte Morphologie zeigten und zum Teil unterbrochen waren (Dr. Smyth, persönliche Mitteilung).

4.9 Vor- und Nachteile von *in vitro* und *in vivo* Studien

Meist dienen *in vitro* Studien dazu, erste Hinweise auf die Funktion eines neu entdeckten Proteins zu erhalten. Sie bieten den Vorteil, dass sie z.B. im Unterschied zur Erstellung von Mausmodellen sehr viel schneller durchzuführen sind. So dauert es ca. ein Jahr, um eine *knock-out* Mauslinie zu generieren und noch sehr viel länger, diese Linie vollständig zu analysieren. Dagegen dauert es nur Tage oder Wochen, um beispielsweise Bindungsstudien mit einem neu entdeckten Protein durchzuführen. Häufig dient die Identifizierung eines Bindungspartners dazu, erste Anhaltspunkte zur Funktion eines Proteins zu erhalten. Ist von dem Bindungspartner beispielsweise bekannt, dass er an einem bestimmten Signalweg beteiligt ist, so kann vermutet werden, dass das Protein mit noch unbekannter Funktion ebenfalls eine Rolle dabei spielt. Ein *in vitro* System beinhaltet aber nur eine limitierte Anzahl an beeinflussenden Parametern und spiegelt nicht die Bedingungen eines Gesamtorganismus wider. Daher wird häufig zusätzlich ein *in vivo* System gewählt, um die Funktion eines Proteins zu analysieren. Die Generierung und Analyse z.B. einer *knock-out* Maus bietet den großen Vorteil, die Funktion eines Proteins im Gesamtorganismus untersuchen zu können. Allerdings kann sich die Analyse einer solchen *knock-out* Maus schwierig gestalten. In vielen Fällen decken sich die aufgrund von *in vitro* Studien erhaltenen Erwartungen nicht mit den *in vivo* erhaltenen Phänotypen, wie z.B. bei den hier generierten Testican-1 defizienten Mauslinien. Hier waren beispielsweise sichtbare Veränderungen des Gehirns erwartet worden. Die Ursache für einen fehlenden Phänotyp liegt wohl in der Komplexität eines Gesamtorganismus. So kann es sein, dass mehrere Proteine dieselbe Funktion ausüben oder das Fehlen des Proteins im *Knock-out* kompensiert wird. Liegt ein kompensatorischer Mechanismus vor, könnte die Inaktivierung eines weiteren Proteins derselben Proteinfamilie helfen, die Kompensation bzw. Redundanz aufzuheben und die Funktion dieser Proteine *in vivo* zu klären. Es könnten aber auch subtile Phänotypen entstehen, die nicht oder erst nach langwierigen Tests entdeckt werden. Untersuchungen z.B. von Protein-Protein-Wechselwirkungen und die Analyse der genauen Lokalisation eines Proteins in einem Organismus bilden meist die

Grundlage für *in vivo* Untersuchungen. Sie geben Hinweise, welche Organe oder Entwicklungsstadien z.B. einer *knock-out* Maus eines bestimmten Proteins zu untersuchen sind oder auf welche anderen Proteine sich das Fehlen des einen Proteins auswirken könnte.

Die Kombination aus *in vitro* und *in vivo* Studien bietet wohl die beste Möglichkeit, um die Funktion eines Proteins aufzuklären.

4.10 Fazit und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Testican-1 und -3 defiziente Mauslinien generiert, um die Funktion dieser Proteoglycane *in vivo* analysieren zu können. Da Testican-3 defiziente Tiere erst gegen Ende dieser Arbeit geboren wurden, konnten hier nur Testican-1 defiziente Tiere näher charakterisiert werden. Für Tiere mit inaktivem Testican-3 Gen konnte lediglich das Fehlen des Proteins gezeigt werden. Eine genaue Analyse dieser Tiere steht noch aus.

Da es sich bei Testican-1 um ein Protein des zentralen Nervensystems handelt, wurde insbesondere das Gehirn Testican-1 defizienter Tiere untersucht. Mit immunhistologischen Färbungen wurde überprüft, ob sich das Fehlen von Testican-1 auf die Morphologie des Gehirns auswirkt; Unterschiede zu Wildtyp Tieren konnten jedoch nicht festgestellt werden. Da mit dieser Methode lediglich die grobe Struktur des Gehirns gezeigt werden kann, sollten elektronenmikroskopische Aufnahmen des Gehirns gemacht werden. Möglicherweise lassen sich erst bei einer starken Vergrößerung morphologische Unterschiede zwischen Wildtyp und Testican-1 defizientem Gewebe erkennen.

Außerdem könnten mit den hier generierten Tieren Verhaltenstests durchgeführt werden, da bei der Defizienz eines neuronalen Proteins nicht auszuschließen ist, dass sich das Fehlen des Proteins z.B. in Lern- oder Gedächtnisstörungen äußert. Solche Tests wurden bisher nicht durchgeführt, da der genetische Hintergrund dieser Tiere noch nicht einheitlich ist. Um dies zu erreichen, sollten Testican-1 defiziente Tiere weiter mit C57Bl/6 Tieren rückgekreuzt werden.

Des Weiteren könnten Daten aus *in vitro* Studien, die eine Bindung von Testican-1 an MT1-MMP und dadurch verursacht eine Inhibition der MMP-2 Aktivierung zeigen, *in vivo* überprüft werden. Da MMP-2 mit der Invasivität von Gliazell-Tumoren in Zusammenhang

gebracht wird, könnten invasive Gliomzellen in Gehirne von Wildtyp und T1^(-/-) Mäusen injiziert werden. Dabei könnte untersucht werden, ob die Metastasierung der Gliomzellen in Wildtyp und Testican-1 defizienten Mäusen unterschiedlich verläuft. Möglicherweise kann so eine Funktion von Testican-1 geklärt werden. Soweit Testican-1 defiziente Tiere bisher charakterisiert wurden, konnten keine Unterschiede zwischen Wildtyp und T1^(-/-) Tieren beobachtet werden. Da während dieser Arbeit Testican-1 und -3 defiziente Mauslinien generiert wurden und in unserer Arbeitsgruppe auch eine Testican-2 defiziente Mauslinie hergestellt wird, besteht nun die Möglichkeit zur Inaktivierung von zwei oder allen drei Testicanen in der Maus. Möglicherweise könnte so eine Redundanz umgangen und somit die Funktion der Testican-Familie geklärt werden.

5 Zusammenfassung

Um die Funktion von Testican-1 und -3 *in vivo* zu klären wurden im Rahmen dieser Arbeit durch konventionelles *Gene-Targeting* unabhängig voneinander zwei Testican-1 und eine Testican-3 defiziente Mauslinien hergestellt. Beide Testican-1 defizienten Linien wurden zusätzlich in zwei genetisch unterschiedlichen Hintergründen gezüchtet.

Testican-1 defiziente Mäuse sind fertil und gesund und zeigen keine Auffälligkeiten gegenüber Wildtyp Tieren. Durch den Vergleich immunhistochemischer Färbungen mit einem Testican-1 spezifischen Antikörper von Wildtyp und Testican-1 defizienten Gehirnschnitten konnte die Expression von Testican-1 im Bulbus olfactorius, Thalamus und der Medulla lokalisiert werden. Die Analyse Testican-1 defizienter Tiere ergab, dass das zweite Exon, welches das Startcodon für die Translation und die Selektions-Kassette zur Inaktivierung des Gens enthält, durch alternatives Spleißen entfernt wird und somit ein mutiertes Testican-1 Transkript entstanden ist. Durch eine anschließende Immunpräzipitation konnte eindeutig das Fehlen des Testican-1 Proteins gezeigt werden. Da die Mäuse keinen offensichtlichen Phänotyp zeigten, wurde vermutet, dass das Fehlen von Testican-1 kompensiert werden kann. Es konnte jedoch keine verstärkte Expression oder eine Umverteilung von Testican-2 oder -3 in der T1^(-/-) Maus festgestellt werden. Die Anzahl der Synapsen, Neuronen, Gliazellen und die Morphologie des Gehirns scheint durch das Fehlen von Testican-1 zumindest nicht wesentlich beeinflusst zu sein. Die Gelatine-Zymographie zeigte keine Anhaltspunkte dafür, dass sich das Fehlen von Testican-1 auf die Aktivierung von MMP-2 auswirkt. Dies konnte vermutet werden, da laut Literaturdaten Testican-1 die Aktivität von MT1-MMP inhibiert.

Testican-3 defiziente Mäuse sind ebenfalls gesund und zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp. Durch Immunpräzipitation konnte das Fehlen des Proteins in der T3^(-/-) Maus gezeigt werden.

Durch die hier generierten Testican-1 bzw. -3 defizienten Mauslinien konnte die Frage nach der Funktion dieser beiden Proteoglykane bisher nicht beantwortet werden. Allerdings besteht nun die Möglichkeit, zwei oder alle drei Testicane in der Maus zu inaktivieren. Die Inaktivierung von mehr als einem Gen einer Proteinfamilie könnte eine mögliche Redundanz beseitigen und zu einem Phänotyp führen. Dies könnte helfen, die Frage nach Funktion der Testicane zu beantworten.

6 Abstract

Two separate testican-1 deficient mouse lines as well as a testican-3 deficient line were established via conventional gene targeting to examine the function of testican-1 and -3 *in vivo*. Additionally, the testican-1 deficient mouse lines were bred in two genetically different backgrounds.

Testican-1 deficient mice are fertile and show no abnormalities when compared to the wild type. The expression of testican-1 was localized to the *bulbus olfactorius*, the *thalamus* and the *medulla* by comparing cryosections of wild type and testican-1 deficient brains that were stained with a testican-1 specific antibody. Through analysis of the testican-1 deficient animals it could be shown that exon II, which contains the start codon for translation and the selection cassette for the inactivation of the gene, is removed by alternative splicing and a mutated testican-1 transcript is generated. The lack of testican-1 protein was definitively confirmed by immunoprecipitation. The absence of an obvious phenotype suggests that the lack of testican-1 can be compensated. However, neither an enhanced expression nor a redistribution of testican-2 or -3 in the T1^(-/-) mice could be detected. The number of synapses, neurons and glia cells as well as the morphology of the brain does not seem to be significantly affected by the lack of testican-1. Gelatine zymography did not show any effect on MMP-2 activation due to the lack of testican-1, an effect that could have been expected as testican-1 has been reported to inhibit the activity of MT1-MMP.

Testican-3 deficient mice are also healthy and do not show any obvious phenotype. The lack of testican-3 protein in the T3^(-/-) mice was confirmed via immunoprecipitation. The generation of mouse lines deficient in either testican-1 or -3 could not answer the question of the function of these two proteoglycans. However, it is now possible to generate mutant mice deficient in two or all three testicans. The inactivation of more than one gene of a protein family may abolish the redundancy and lead to a phenotype shedding light on the question of testican function.

7 Literaturverzeichnis

Alliel, P. M., Perin, J. P., Jolles, P. und Bonnet, F. J. (1993). Testican, a multidomain testicular proteoglycan resembling modulators of cell social behaviour. *Eur J Biochem* **214**, 347-50.

Bandtlow, C. E. und Zimmermann, D. R. (2000). Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev* **80**, 1267-90.

BaSalamah, M. A., Marr, H. S., Duncan, A. W. und Edgell, C. J. (2001). Testican in human blood. *Biochem Biophys Res Commun* **283**, 1083-90.

Bonnet, F., Perin, J. P., Charbonnier, F., Camuzat, A., Roussel, G., Nussbaum, J. L. und Alliel, P. M. (1996). Structure and cellular distribution of mouse brain testican. Association with the postsynaptic area of hippocampus pyramidal cells. *J Biol Chem* **271**, 4373-80.

Bonnet, F., Perin, J. P., Maillet, P., Jolles, P. und Alliel, P. M. (1992). Characterization of a human seminal plasma glycosaminoglycan-bearing polypeptide. *Biochem J* **288** (2), 565-9.

Bovolenta, P. und Feraud-Espinosa, I. (2000). Nervous system proteoglycans as modulators of neurite outgrowth. *Prog Neurobiol* **61**, 113-32.

Brakebusch, C., Seidenbecher, C. I., Asztely, F., Rauch, U., Matthies, H., Meyer, H., Krug, M., Bockers, T. M., Zhou, X., Kreutz, M. R. et al. (2002). Brevican-deficient mice display impaired hippocampal CA1 long-term potentiation but show no obvious deficits in learning and memory. *Mol Cell Biol* **22**, 7417-27.

Butler, G. S., Butler, M. J., Atkinson, S. J., Will, H., Tamura, T., van Westrum, S. S., Crabbe, T., Clements, J., d'Ortho, M. P. und Murphy, G. (1998). The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. *J Biol Chem* **273**, 871-80.

Charbonnier, F., Chanoine, C., Cifuentes-Diaz, C., Gallien, C. L., Rieger, F., Alliel, P. M. und Perin, J. P. (2000). Expression of the proteoglycan SPOCK during mouse embryo development. *Mech Dev* **90**, 317-21.

Charbonnier, F., Perin, 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**, 377-80.

Chazal, G., Durbec, P., Jankovski, A., Rougon, G. und Cremer, H. (2000). Consequences of neural cell adhesion molecule deficiency on cell migration in the rostral migratory stream of the mouse. *J Neurosci* **20**, 1446-57.

- Chin, J. R. und Werb, Z.** (1997). Matrix metalloproteinases regulate morphogenesis, migration and remodeling of epithelium, tongue skeletal muscle and cartilage in the mandibular arch. *Development* **124**, 1519-30.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-9.
- Cifuentes-Diaz, C., Alliel, P. M., Charbonnier, F., de la Porte, S., Molgo, J., Goudou, D., Rieger, F. und Perin, J. P.** (2000). Regulated expression of the proteoglycan SPOCK in the neuromuscular system. *Mech Dev* **94**, 277-82.
- Clements, J. M., Cossins, J. A., Wells, G. M., Corkill, D. J., Helfrich, K., Wood, L. M., Pigott, R., Stabler, G., Ward, G. A., Gearing, A. J. et al.** (1997). Matrix metalloproteinase expression during experimental autoimmune encephalomyelitis and effects of a combined matrix metalloproteinase and tumour necrosis factor-alpha inhibitor. *J Neuroimmunol* **74**, 85-94.
- Cooke, J., Nowak, M. A., Boerlijst, M. und Maynard-Smith, J.** (1997). Evolutionary origins and maintenance of redundant gene expression during metazoan development. *Trends Genet* **13**, 360-4.
- Copeland, N. G., Jenkins, N. A. und Court, D. L.** (2001). Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat Rev Genet* **2**, 769-79.
- Cremer, H., Chazal, G., Goridis, C. und Represa, A.** (1997). NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci* **8**, 323-35.
- Dityatev, A. und Schachner, M.** (2003). Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* **4**, 456-68.
- Douglas, S. P. und Kadler, K. E.** (1998). Specific glycanforms of type IX collagen accumulate in embryonic chick sterna after 17 days of development. *Glycobiology* **8**, 1013-9.
- Dours-Zimmermann, M. T. und Zimmermann, D. R.** (1994). A novel glycosaminoglycan attachment domain identified in two alternative splice variants of human versican. *J Biol Chem* **269**, 32992-8.
- Edgell, C. J., BaSalamah, M. A. und Marr, H. S.** (2004). Testican-1: a differentially expressed proteoglycan with protease inhibiting activities. *Int Rev Cytol* **236**, 101-22.
- Floss, T., Arnold, H. H. und Braun, T.** (1996). Myf-5(m1)/Myf-6(m1) compound heterozygous mouse mutants down-regulate Myf-5 expression and exert rib defects: evidence for long-range cis effects on Myf-5 transcription. *Dev Biol* **174**, 140-7.

- Forsyth, P. A., Wong, H., Laing, T. D., Rewcastle, N. B., Morris, D. G., Muzik, H., Leco, K. J., Johnston, R. N., Brasher, P. M., Sutherland, G. et al.** (1999). Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. *Br J Cancer* **79**, 1828-35.
- Garwood, J., Schnadelbach, O., Clement, A., Schutte, 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**, 3888-99.
- Gerlai, R.** (1996). Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype? *Trends Neurosci* **19**, 177-81.
- Gohring, 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* **255**, 60-6.
- Gordon, J. W. und Ruddle, F. H.** (1983). Gene transfer into mouse embryos: production of transgenic mice by pronuclear injection. *Methods Enzymol* **101**, 411-33.
- Gustafsson, E. und Fassler, R.** (2000). Insights into extracellular matrix functions from mutant mouse models. *Exp Cell Res* **261**, 52-68.
- Hambrock, H. O., Kaufmann, B., Muller, S., Hanisch, F. G., Nose, K., Paulsson, M., Maurer, P. und Hartmann, U.** (2004). Structural characterization of TSC-36/Flik: analysis of two charge isoforms. *J Biol Chem* **279**, 11727-35.
- Hartmann, U. und Maurer, P.** (2001). Proteoglycans in the nervous system--the quest for functional roles in vivo. *Matrix Biol* **20**, 23-35.
- Hatten, M. E.** (1993). The role of migration in central nervous system neuronal development. *Curr Opin Neurobiol* **3**, 38-44.
- Hechler.** (2003). Diplomarbeit: Lokalisation von Testican-3 in Maus und Untersuchungen von alternativen Splicevarianten. Universität zu Köln.
- Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S. und Monk, M.** (1987). HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* **326**, 292-5.
- Kaczmarek, L., Lapinska-Dzwonek, J. und Szymczak, S.** (2002). Matrix metalloproteinases in the adult brain physiology: a link between c-Fos, AP-1 and remodeling of neuronal connections? *Embo J* **21**, 6643-8.
- Kjellen, L. und Lindahl, U.** (1991). Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem* **60**, 443-75.

- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Laird, P. W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M. A., Jaenisch, R. und Berns, A.** (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res* **19**, 4293.
- Lander, E. S. Linton, L. M. Birren, B. Nusbaum, C. Zody, M. C. Baldwin, J. Devon, K. Dewar, K. Doyle, M. FitzHugh, W. et al.** (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.
- Lark, M. W., Bayne, E. K., Flanagan, J., Harper, C. F., Hoerrner, L. A., Hutchinson, N. I., Singer, II, Donatelli, S. A., Weidner, J. R., Williams, H. R. et al.** (1997). Aggrecan degradation in human cartilage. Evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic, and rheumatoid joints. *J Clin Invest* **100**, 93-106.
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J. M. und Boedtke, H.** (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* **16**, 4743-51.
- Lindgren.** (1999). Diplomarbeit: Effects of the Proteoglycan Testican-2 on cell adhesion and axonal outgrowth in vitro. Universität zu Köln.
- Liotta, L. A., Steeg, P. S. und Stetler-Stevenson, W. G.** (1991). Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* **64**, 327-36.
- Malakoff, D.** (2000). The rise of the mouse, biomedicine's model mammal. *Science* **288**, 248-53.
- Marr, H. S., Basalamah, M. A. und Edgell, C. J.** (1997). Endothelial cell expression of testican mRNA. *Endothelium* **5**, 209-19.
- Marr, H. S. und Edgell, C. J.** (2003). Testican-1 inhibits attachment of Neuro-2a cells. *Matrix Biol* **22**, 259-66.
- McCarthy, L. C., Terrett, J., Davis, M. E., Knights, C. J., Smith, A. L., Critcher, R., Schmitt, K., Hudson, J., Spurr, N. K. und Goodfellow, P. N.** (1997). A first-generation whole genome-radiation hybrid map spanning the mouse genome. *Genome Res* **7**, 1153-61.
- Mignatti, P. und Rifkin, D. B.** (1996). Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein* **49**, 117-37.
- Milev, P., Friedlander, D. R., Sakurai, T., Karthikeyan, L., Flad, M., Margolis, R. K., Grumet, M. und Margolis, R. U.** (1994). Interactions of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol* **127**, 1703-15.

- Müller.** (2001). Diplomarbeit: Konstruktion eines *targeting*-Vektors zur Inaktivierung des Testican-3-Gens in der Maus, (ed.: Universität zu Köln).
- Murphy, G., Stanton, H., Cowell, S., Butler, G., Knauper, V., Atkinson, S. und Gavrilovic, J.** (1999). Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *Apmis* **107**, 38-44.
- Murshed, M., Smyth, N., Miosge, N., Karolat, J., Krieg, T., Paulsson, M. und Nischt, R.** (2000). The absence of nidogen 1 does not affect murine basement membrane formation. *Mol Cell Biol* **20**, 7007-12.
- Nagase, H.** (1997). Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* **378**, 151-60.
- Nagase, H.** (1998). Cell surface activation of progelatinase A (proMMP-2) and cell migration. *Cell Res* **8**, 179-86.
- Nagayoshi, T., Sanborn, D., Hickok, N. J., Olsen, D. R., Fazio, M. J., Chu, M. L., Knowlton, R., Mann, K., Deutzmann, R., Timpl, R. et al.** (1989). Human nidogen: complete amino acid sequence and structural domains deduced from cDNAs, and evidence for polymorphism of the gene. *DNA* **8**, 581-94.
- Nakada, M., Miyamori, H., Yamashita, J. und Sato, H.** (2003). Testican 2 abrogates inhibition of membrane-type matrix metalloproteinases by other testican family proteins. *Cancer Res* **63**, 3364-9.
- Nakada, M., Okada, Y. und Yamashita, J.** (2003). The role of matrix metalloproteinases in glioma invasion. *Front Biosci* **8**, e261-9.
- Nakada, M., Yamada, A., Takino, T., Miyamori, H., Takahashi, T., Yamashita, J. und Sato, H.** (2001). Suppression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MMP)-mediated MMP-2 activation and tumor invasion by testican 3 and its splicing variant gene product, N-Tes. *Cancer Res* **61**, 8896-902.
- Niederost, B. P., Zimmermann, D. R., Schwab, M. E. und Bandtlow, C. E.** (1999). Bovine CNS myelin contains neurite growth-inhibitory activity associated with chondroitin sulfate proteoglycans. *J Neurosci* **19**, 8979-89.
- Novak, U. und Kaye, A. H.** (2000). Extracellular matrix and the brain: components and function. *J Clin Neurosci* **7**, 280-90.
- Okada, A., Tomasetto, C., Lutz, Y., Bellocq, J. P., Rio, M. C. und Basset, P.** (1997). Expression of matrix metalloproteinases during rat skin wound healing: evidence that membrane type-1 matrix metalloproteinase is a stromal activator of pro-gelatinase A. *J Cell Biol* **137**, 67-77.

- Okumura, Y., Sato, H., Seiki, M. und Kido, H.** (1997). Proteolytic activation of the precursor of membrane type 1 matrix metalloproteinase by human plasmin. A possible cell surface activator. *FEBS Lett* **402**, 181-4.
- Palmiter, R. D. und Brinster, R. L.** (1985). Transgenic mice. *Cell* **41**, 343-5.
- Pearlman, A. L. und Sheppard, A. M.** (1996). Extracellular matrix in early cortical development. *Prog Brain Res* **108**, 117-34.
- Prydz, K. und Dalen, K. T.** (2000). Synthesis and sorting of proteoglycans. *J Cell Sci* **113** (2), 193-205.
- Röll.** (2000). Diplomarbeit: Konstruktion eines "Targeting-Vektors" zur gezielten Inaktivierung des Testican-1 Gens in der Maus. Universität zu Köln.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-91.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schnepp.** (2004). Doktorarbeit: Testican-2 Studien zu Expression und Funktion eines neuen Proteoglycans. Universität zu Köln.
- Schymeinsky, J., Nedbal, S., Miosge, N., Poschl, E., Rao, C., Beier, D. R., Skarnes, W. C., Timpl, R. und Bader, B. L.** (2002). Gene structure and functional analysis of the mouse nidogen-2 gene: nidogen-2 is not essential for basement membrane formation in mice. *Mol Cell Biol* **22**, 6820-30.
- Shimasaki, S., Gao, L., Shimonaka, M. und Ling, N.** (1991). Isolation and molecular cloning of insulin-like growth factor-binding protein-6. *Mol Endocrinol* **5**, 938-48.
- 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**, 151-60.
- Soriano, P.** (1995). Gene targeting in ES cells. *Annu Rev Neurosci* **18**, 1-18.
- Southern, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-17.
- Stark, M., Danielsson, O., Griffiths, W. J., Jornvall, H. und Johansson, J.** (2001). Peptide repertoire of human cerebrospinal fluid: novel proteolytic fragments of neuroendocrine proteins. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **754**, 357-67.

- Threadgill, D. W., Dlugosz, A. A., Hansen, L. A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., LaMantia, C., Mourton, T., Herrup, K., Harris, R. C. et al.** (1995). Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* **269**, 230-4.
- Tisay, K. T. und Key, B.** (1999). The extracellular matrix modulates olfactory neurite outgrowth on ensheathing cells. *J Neurosci* **19**, 9890-9.
- Vannahme, C., Schubel, S., Herud, M., Gosling, S., Hulsmann, 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.
- Vecil, G. G., Larsen, P. H., Corley, S. M., Herx, L. M., Besson, A., Goodyer, C. G. und Yong, V. W.** (2000). Interleukin-1 is a key regulator of matrix metalloproteinase-9 expression in human neurons in culture and following mouse brain trauma in vivo. *J Neurosci Res* **61**, 212-24.
- Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P. et al.** (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**, 520-62.
- Weeks, J. G., Halme, J. und Woessner, J. F., Jr.** (1976). Extraction of collagenase from the involuting rat uterus. *Biochim Biophys Acta* **445**, 205-14.
- Woessner, J. F. und Nagase, H.** (2000). Matrix metalloproteinases and TIMPs. Oxford: Oxford University Press.
- Yamaguchi, Y.** (2000). Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* **57**, 276-89.
- Yong, V. W., Krekoski, C. A., Forsyth, P. A., Bell, R. und Edwards, D. R.** (1998). Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends Neurosci* **21**, 75-80.
- Yong, V. W., Power, C., Forsyth, P. und Edwards, D. R.** (2001). Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* **2**, 502-11.
- Yurchenco, P. D. und Schittny, J. C.** (1990). Molecular architecture of basement membranes. *Faseb J* **4**, 1577-90.
- Zhou, X. H., Brakebusch, C., Matthies, H., Oohashi, T., Hirsch, E., Moser, M., Krug, M., Seidenbecher, C. I., Boeckers, T. M., Rauch, U. et al.** (2001). Neurocan is dispensable for brain development. *Mol Cell Biol* **21**, 5970-8.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
bp	Basenpaare
BM	Basalmembran
BM-40	Basalmembranprotein mit einer molaren Masse von 40
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
cDNA	<i>copy</i> DNA (revers von mRNA transkribierte DNA)
cM	centi Morgan. Ein cM ist die Distanz zwischen zwei Genen, die einer Rekombinationswahrscheinlichkeit von einem Prozent pro Meiose entspricht.
CNBr	Cyan-Bromid
CS	Chondroitinsulfat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang DNA
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DS	Dermatansulfat
DTT	Dithiothreitol
E(n)	Embryonaltag (n)
EC	extrazellulär calciumbindend
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FS	Follistatin-ähnlich
G418	Geneticin
GAG	Glycosaminoglycan
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
h	Stunde
2H3	Untereinheit des Neurofilament Proteins
HS	Heparansulfat
kb	Kilo Basen

kDa	Kilo Dalton
KS	Keratansulfat
min	Minuten
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA (Boten-RNA)
NCR	<i>non coding region</i>
Neo	Neomycin Phosphotransferase
NGS	<i>Normal Goat Serum</i>
NSE	<i>neuron specific enolase</i>
OD	Optische Dichte
P(n)	Postnataltag (n)
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Natriumchloridlösung
p.c.	post coitum
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGK	3-Phosphoglyceratkinase Promotor
RH	<i>Radiation Hybrid</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SV2	<i>synaptic vesicle protein 2</i>
TBS	Tris-Kochsalz-Puffer (<i>Tris buffered saline</i>)
TE	Tris-EDTA Lösung
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
TY	Thyroglobulin
U	Unit(s) Einheit der Enzymaktivität
üN	über Nacht
UV	Ultraviolettes Licht
WT	Wildtyp
ZMMK	Zentrum für Molekulare Medizin Köln

Danksagung

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

Frau Dr. Ursula Hartmann danke ich für die fachliche Betreuung und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Siegfried Roth und Herrn Prof. Dr. Helmut W. Klein danke ich für die freundliche Bereitschaft das Koreferat bzw. den Prüfungsvorsitz zu übernehmen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Neil Smyth für die vielen fachlichen Ratschläge und die praktischen Tipps bei der Generierung der Mauslinien. Herrn Kryzack möchte ich ganz herzlich für die Herstellung der chimären Mäuse und die für die zahlreichen Tipps im Umgang mit den Tieren danken.

Frau Dr. Zigrino danke ich für ihre Diskussionsbereitschaft bezüglich der MMPs und die freundliche und schnelle Unterstützung bei der Anfertigung des Zymogramms.

Meiner Arbeitsgruppe und allen Mitarbeitern unseres Institutes möchte ich an dieser Stelle ganz herzlich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft danken. Ihr seid super! Ganz lieben Dank an Susan, Silke, Ines und Beeker die mich vor allem in der stressigen Phase des Zusammenschreibens unterstützt haben und ein Danke an Andreas für seine Hilfe bei Computerproblemen!

Allen Freunden, die nicht direkt an meiner Arbeit beteiligt waren, danke ich für ihr Interesse und den Ausgleich, den sie zum Laboralltag geschaffen haben.

Zuletzt möchte ich an dieser Stelle meiner Mutter und meiner Oma einen ganz lieben Dank aussprechen dafür, dass sie immer für mich da waren und mir diese Arbeit ermöglicht haben. Ohne Euch hätte ich es nicht geschafft!!!

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit, die anderen Werken in Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass die Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität vorgelegt und noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Ablauf des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der geltenden Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Mats Paulsson betreut worden.

Köln, 30. September 2004

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Sandra Röhl
Anschrift	Vorgebirgstr.1a, 50677 Köln
Geburtsdatum/-ort	17.12.1974 in Brüssel
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1981-1985	Private Volksschule des Kath. Familienwerkes e.V., Pullach
1985-1988	Pater-Rupert-Mayer Gymnasium, Pullach
1988-1992	Feodor-Lynen Gymnasium, Planegg
1992-1995	Berthold-Brecht Gymnasium, München

Hochschulbildung

12.10.1995-31.03.1998	Grundstudium Biologie, Universität Regensburg
07.04.1998-16.12.1999	Hauptstudium Biologie, Universität zu Köln
01.02.2000-31.10.2000	Diplomarbeit am Institut für Biochemie II der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln bei Prof. Dr. Mats Paulsson, Thema: Konstruktion eines „Targeting-Vektors“ zur gezielten Inaktivierung des Testican-1 Gens in der Maus.

Doktorarbeit

01.11.2000-dato	Promotion an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln im Fach Physiologische Chemie am Institut für Biochemie II der Medizinischen Fakultät bei Prof. Dr. Mats Paulsson, Thema: Untersuchungen zur Funktion von Testicanen - Generierung von Testican-1 und -3 defizienten Mauslinien.
-----------------	---

Köln, 30. September 2004