

Aus dem Bereich Anatomie
Anatomisches Institut
Theoretische Medizin der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Univ.-Prof. Dr. med. vet. Gabriela Krasteva-Christ

**Untersuchungen zur Ausprägung
von *MXRA5* im Meerschweinchen**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2023

vorgelegt von:

Frederick Schweizer
geb. am: 25.03.1996 in Homburg

Tag der Promotion: 12.10.2023

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Gabriela Krasteva-Christ

Univ.-Prof. Dr. Frank Kirchhoff

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1 Warum wird die klinische Relevanz am Meerschweinchen untersucht?	4
2.2 Die pseudoautosomale Region.....	5
2.3 Heterogene Faktenlage bisheriger Forschungsergebnisse zu MXRA5.....	7
2.4 MXRA5 als Teil der Familie der MXRA-Proteine	10
2.5 Was bisher über den Aufbau des Gens bekannt ist.....	12
2.6 Die extrazelluläre Matrix	13
3. Material und Methoden	15
3.1 Material	15
3.1.1 Geräte	15
3.1.2 Kits	16
3.1.3 Verbrauchbare Gegenstände:.....	16
3.1.4 Chemikalien:	16
3.2 Methoden	20
3.2.1 Aufreinigung von Nukleinsäuren	20
3.2.2 RNA/DNA-Quantifizierung	21
3.2.3 Polymerasekettenreaktion	21
3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese	22
3.2.5 RT-qPCR-Analyse	23
3.2.6 Klonierung (Manipulation von DNA).....	24
3.2.7 Zellkultur	26
3.2.8 Western-Blot	28
3.2.9 Histologische Färbungen von Paraffinschnitten.....	30
3.2.10 Immunhistochemie/Immunfluoreszenz	31
4. Resultate	34
4.1 Sequenzierung.....	34
4.2 Erstellen einer RNA-Bank der vorhandenen Meerschweinchen-Gewebe	38
4.3 Herstellung der Epitope in der Zellkultur zur Validierung des Antikörpers.....	41
4.4 Fluoreszenzmikroskopie	44

4.4.1	Etablierung des MXRA5-Antikörpers für die Histologie	44
4.4.2	Erste Lokalisationsbeobachtungen in verschiedenen Geweben	45
4.4.3	Optimierung der Antikörper-Färbungen	47
4.4.4	Validierungskontrolle durch Hinzunahme eines weiteren Fluoreszenz-Kanals .	54
4.4.5	Spezielle Lokalisationen des Proteins MXRA5	55
5.	Diskussion.....	60
5.1	Validierung eines kommerziellen Antikörpers gegen MXRA5.....	60
5.2	Bessere Zugänglichkeit durch Demaskierung?	61
5.3	Allgemeine Überlegungen.....	62
5.4	Zukünftige tierexperimentelle Untersuchungen	64
5.5	Diskussion bisheriger Literatur.....	66
5.6	Struktur des Proteins	68
5.7	Vergleich von Homo sapiens, Cavia porcellus und Cavia tschudii hinsichtlich des Gens MXRA5	70
6.	Literaturverzeichnis.....	72
7.	Anhang	77
7.1	Posterbeitrag für 115 th Annual Meeting Innsbruck (2021)	77
7.2	Final ermittelte Nukleotidsequenz von MXRA5 (Cavia porcellus).....	80
7.3	Vergleich der Aminosäuresequenzen	82
7.4	Verwendete Primer	85
7.5	Verwendete Antikörper	87
	Danksagung	88
	Lebenslauf.....	89

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
A. bidest	Aqua bidest
bp	Basenpaar
ca.	circa
°C	Grad Celsius
C. porcellus	Cavia porcellus
C. tschudii	Cavia tschudii
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
E. coli	Escherischia coli
Eppi	Eppendorf Mikroreaktionsgefäß
evtl.	eventuell
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunden
HEK	Human Embryonic Kidney
IgG	Immunglobulin-G
kb	Kilobase
l	Liter
M	Mol
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	messenger-RNA
nm	Nanometer
PAR	pseudoautosomale Region
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT-qPCR	PCR mit Reverser Transkription
sek.	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat

s.o.	siehe oben
Stk.	Stück
™	Trade Mark
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
μl	Mikroliter
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 2-1: Gene des terminalen X-Chromosoms und der pseudoautosomalen Region
- Abbildung 2-2: Aufteilung des humanen MXRA5 in seine sieben Exons
- Abbildung 4-1: Schematischer Aufbau der Gene von Mensch, *Cavia tschudii* und *Cavia porcellus*
- Abbildung 4-2: Gelelektrophorese des Exone 5, 6 und 7
- Abbildung 4-3: Darstellung des humanen MXRA5 mit den Primern für die jeweiligen Exone
- Abbildung 4-4.1: Die RNA-Transkriptmenge von MXRA5 im relativen Verhältnis zu der von ACTB
- Abbildung 4-4.2: Die RNA-Transkriptmenge in neuronalen Geweben
- Abbildung 4-5: Immunoblot der Fragmente aus der HEK-Zellkultur
- Abbildung 4-6: Immunfluoreszenz der ausgestrichenen HEK-Zellen
- Abbildung 4-7: Erste Lokalisationsbeobachtungen des MXRA5-Antikörpers in verschiedenen Meerschweinchengeweben
- Abbildung 4-8.1: Antikörperfärbung der Harnblase des Meerschweinchens ohne zusätzlich Bearbeitung („unbehandelt“)
- Abbildung 4-8.2: Antikörperfärbung der Harnblase des Meerschweinchens inklusive der Inkubation mittels VektorTrueVIEW[®]-Kit
- Abbildung 4-8.3: Antikörperfärbung der Harnblase des Meerschweinchens nach thermischer Demaskierung bei pH=9, inklusive der Inkubation mittels Vektor[®]TrueVIEW[®]-Kit
- Abbildung 4-8.4: Antikörperfärbung der Harnblase des Meerschweinchens nach thermischer Demaskierung bei pH=6, inklusive der Inkubation mittels Vektor TrueVIEW[®]-Kit
- Abbildung 4-8.5: Antikörperfärbung der Harnblase des Meerschweinchens nach thermischer Demaskierung bei pH=3, inklusive der Inkubation mittels Vektor TrueVIEW[®]-Kit
- Abbildung 4-9: Thermische Demaskierung und pH-Anpassung in der Meerschweinchenniere
- Abbildung 4-10: Kontrolle des MXRA5-Antikörpers mit zusätzlichem Kanal in der Immunfluoreszenz an der Meerschweinchenniere
- Abbildung 4-11: Immunfluoreszenz des MXRA5-Antikörpers an Gefäßen in der Region des Duodenums
- Abbildung 4-12: Immunfluoreszenz von Haut (Dermis) und Zunge des Meerschweinchens mit optimierter Färbestrategie

- Abbildung 4-13: Immunfluoreszenz von Hoden und Niere des Meerschweinchens mit optimierter Färbestrategie
- Abbildung 5-1: Mögliche Änderungen des Proteins MXRA5 während der Kontraktion und Relaxation von Epithelzellen
- Abbildung 5-2: Räumliche Struktur des Proteins MXRA5
- Abbildung 5-3: Schematischer Vergleich der kodierenden Regionen von MXRA5 bei Mensch und *Cavia porcellus*

1. Zusammenfassung

Die Gene des Menschen benötigen zur genaueren Erforschung ein geeignetes Modell, mit welchem dies reproduzierbar gelingt. Da die meisten humanen Gene auch in den übrigen Säugetieren exprimiert werden, hat sich hierfür in den letzten Jahrzehnten vor allem die Maus als Modelltier manifestiert (Wilson et al., 2005). Partiiell wird auch noch die Ratte als enger Verwandter der Maus herangezogen. Allerdings hat sich gezeigt, dass gewisse Regionen im humanen Genom existieren, die so in Maus und Ratte bisher nicht identifiziert wurden (Maxeiner et al., 2020). In der phylogenetischen Entwicklung der einzelnen Säugetiere sind folglich manche Gene verändert worden oder sogar verloren gegangen. Da diese im Menschen dennoch eine Funktion ausüben und somit auch von klinischer Relevanz sein können, muss in diesem Fall ein adäquater Ersatz gefunden werden.

Eines dieser Gene ist *MXRA5*. Dieses befindet sich auf einem Chromosomenabschnitt nahe der pseudoautosomalen Region (Maxeiner et al., 2021). Es kodiert für ein Protein, welches in der bisherigen Literatur als Extrazellulärmatrix-Protein eingestuft wird.

In einem anderen Zweig der Nagetiere konnte dieser Genombereich allerdings in ähnlicher Art und Weise wie im humanen Genom identifiziert werden, und zwar in der Gattung der Meerschweinchen (Maxeiner et al., 2021). Im gewöhnlichen Hausmeerschweinchen, *Cavia porcellus*, war dieses Gen in Bezug auf die Gensequenz jedoch noch nicht beschrieben. Mithilfe geeigneter Primer, welche von der Nachbarspezies *Cavia tschudii* abgeleitet wurden, ist es gelungen, aus genomischer DNA die Gensequenz zu bestimmen, und somit die Vergleichbarkeit mit dem humanen Gen herzustellen. Außerdem konnten durch quantitative RT-PCR die Transkriptlevel dieses Gens in verschiedenen Organen von *Cavia porcellus* bestimmt werden, um erste Einblicke zu erhalten, in welchen Geweben es von Bedeutung sein könnte. Besonders prominent war die Transkription in der Niere.

Des Weiteren war es möglich einen Antikörper, welcher sich eigentlich gegen das humane Protein *MXRA5* richtet, als wirksamen Antikörper in der Forschung mit Geweben von *Cavia porcellus* zu etablieren, und auch seine Wirksamkeit zu überprüfen. Hiermit bestand die Möglichkeit, erste Eindrücke bezüglich der Lokalisation und der daraus vermuteten Funktion zu gewinnen, welche bisher unbekannt waren. Es hat sich gezeigt, dass es sich um ein epithelassoziertes Protein handelt, welches in druckbelasteten Geweben im Bindegewebe und den oberen Epithelschichten zu finden ist. Dies lässt die mögliche Schlussfolgerung zu, dass *MXRA5* an der Dehnung und Stabilität der Gewebe und gegebenenfalls zusätzlich an der Signalweiterleitung über Dehnungszustände beteiligt sein könnte. In dieser Arbeit konnte durch Untersuchung von *MXRA5* auf DNA-, RNA- und Protein-Ebene erstmals am Beispiel des Meerschweinchens ein Tiermodell identifiziert werden, das somit für zukünftige Forschungen hinsichtlich der Bedeutung dieses Proteins zur Verfügung steht.

1. Abstract

Human genes require for a more precise research a suitable animal test object which can reliably deliver right and accurate results. As most human genes are expressed in other mammalian species, mice have manifested themselves over the past centuries as an ideal test object (Wilson et al., 2005). In some case, rats are also used in testing as both are related species. However, research has shown that certain regions in the human genome don't exist in mice and rats (Maxeiner et al, 2020). Due to the phylogeny of individual mammals over time, some of the genes in humans have been altered or even lost in other species. Nevertheless, since these genes exist and have a function in humans they could be of clinical relevance, and therefore, require an alternative adequate test/research object to be tested on.

One of these human genes is *MXRA5*. It is located on a chromosomal segment near the pseudoautosomal region (Maxeiner et al., 2021). It codes for a protein that is classified as an extracellular matrix protein, based on current scientific literature.

This specific genomic region was identified in another species category of rodents as well, namely the commonly known domestic guinea pig, *Cavia porcellus* (Maxeiner et al., 2021). The sequence in this species, however, wasn't fully annotated and demanded further sequencing. With the help of suitable primers, which were derived from the *Cavia porcellus* related species *Cavia tschudii*, it was possible to determine the gene sequence from genomic DNA of *Cavia porcellus*, and, thus, it was possible to compare it with the human gene. In addition, quantitative RT-PCR was used to determine the transcript levels of the gene in different organs of *Cavia porcellus* in order to gain first insights into the tissues in which it could be of relevance, prominent transcript levels were determined, for instance, in the kidney.

Furthermore, it was possible to determine the specificity of a commercially available antibody directed against human *MXRA5*, in guinea pig tissues, and also to test for its effectiveness. This presented the opportunity to gain first insights into the gene's localization and its presumed function, which remained previously unconvincing. *MXRA5* protein emerges as an epithelial-associated protein that can be found in pressure/tension-exposed tissues in the connective tissue and the upper epithelial layers. This leads to the possible assumption that *MXRA5* may be playing a role in tissue elongation and stability, and possibly in signal transduction via elongation states as well. In this dissertation, by investigating *MXRA5* at DNA, RNA and protein level in *Cavia porcellus*, this specific animal could be identified as a new research model for further studies on the relevance and significance of *MXRA5* protein.

2. Einleitung

Um Gene des Menschen funktionell zu untersuchen, kommen sehr häufig bestimmte Tiermodelle zur Anwendung. Dabei geht man davon aus, dass die meisten humanen Gene auch weitestgehend in allen Säugetieren existieren; naturgemäß bestehen in der Ausprägung mancher Gene jedoch auch Unterschiede, die für den späteren Phänotyp verantwortlich sind. Deshalb werden Tiere als Modell verwendet, deren Genom dem des Menschen besonders ähnlich ist. Dies ist beispielsweise bei Primaten als nächste Verwandte des Menschen der Fall, welche aber wegen der geringen Reproduktion, der hohen Tierschutzanforderungen und Haltungskosten nicht als praktikable Versuchstiere geeignet sind. Über die Zeit hinweg hat sich die Klasse der Nagetiere, hierbei besonders Mäuse und Ratten, welche in ihrem genetischen Material sehr nah mit den Primaten verwandt sind, als klassisches Tiermodell etabliert (Wilson et al., 2005). In ihrer Entwicklung sind allerdings auch vereinzelte Gene verändert worden oder sogar verloren gegangen. Daher erfordert es in manchen Fällen Alternativen, wenn ein zu erforschendes Gen kein Pendant in den Versuchstieren Maus oder Ratte hat.

Das Problem besteht nicht nur darin, dass diese Gene bei bestimmten Spezies verloren gehen, sondern auch, dass sie im Menschen häufig von wissenschaftlichem Interesse sind, da sie bei Veränderungen mit zahlreichen Krankheiten assoziiert sein können. Einen solchen „Problembereich“ stellt beispielsweise die pseudoautosomale Region (PAR) und deren Grenzregion auf den Geschlechtschromosomen des Menschen dar. In dieser Region liegen viele Gene, die auch klinische Relevanz aufweisen, wie etwa *SHOX* oder *ANOS1* (Maxeiner et al., 2021). Bei Maus und Ratte ist bekannt, dass die meisten Gene auf dieser Region in der Entwicklung verloren gegangen sind, sodass eine Erforschung mit diesen Modelltieren wegfällt (Maxeiner et al., 2020).

Ein Beispiel dafür ist auch *MXRA5*, Matrix-remodelling-associated protein 5. Aufgrund des Aufbaus und der Größe wird vermutet, dass es sich um ein Protein aus der extrazellulären Matrix handelt, das aufgrund des fehlenden Modelltiers bis heute kaum erforscht ist (<50 Publikationen, PubMed Stand November 2022). Eine mögliche Fragestellung für die Forschung wäre daher, ob es gut zugängliche Versuchstiere gäbe, die als Modell für diese Region, die PAR, und insbesondere *MXRA5* dienen können.

Es hat sich gezeigt, dass das Meerschweinchen (*Cavia porcellus*) einem anderen Zweig der Nagetiere entstammt, bei welchem die meisten dieser Gene nach wie vor existieren und somit als Modell zum menschlichen Genom herangezogen werden könnte (Maxeiner et al., 2021).

2.1 Warum wird die klinische Relevanz am Meerschweinchen untersucht?

Grundlagen dieses Ansatzes sind Arbeiten zur genetischen Zusammensetzung der pseudoautosomalen Region (PAR) in Nagetieren (Dr. Stephan Maxeiner). Dabei ist aufgefallen, dass gerade in diesem Bereich bei den Labortieren Ratte und Maus verschiedene Gene verloren gegangen sind. Bei genauerer Untersuchung dieses Genombereiches in verschiedenen Säugetierklassen wurde diese Region ausführlicher analysiert, um zu vergleichen und möglicherweise Zusammenhänge zu finden, und um letztlich ein mögliches „Ersatztier“ für die biomedizinische Forschung zu identifizieren.

Wie Abb. 2-1 (Maxeiner et al., 2021) zeigt, hat sich herausgestellt, dass größere Säugetiere wie Elefant, Hund, Katze und Delfin und natürlich die Primaten einen sehr ähnlichen Genomaufbau wie der Mensch besitzen. Selbstverständlich stehen diese jedoch nicht als Routine-Versuchstier zur Verfügung. Bei den Nagetieren, die aufgrund ihrer nahen Verwandtschaft meist als Tiermodell verwendet werden, wie Maus, Ratte, aber auch Hamster, waren im Vergleich viele dieser Gene nicht vorhanden. Eine weitere Nagetierart, die sich in der Entwicklung früher von dieser Klasse abgespalten hat, grenzte sich von den „klassischen Nagern“ ab und zeigte einen ähnlichen Genomaufbau wie der Mensch. Hierbei handelt es sich um die Art *Cavia porcellus*, das Hausmeerschweinchen. Obwohl große Teile des Genoms des Meerschweinchens schon vor Jahren einmal zusammengesetzt und annotiert worden sind (GenBank, NCBI, 2008), existieren einige Stellen, die noch unbeschrieben sind, da sie noch unvollständig sequenziert vorliegen. Davon betroffen sind u.a. einige Gene der pseudoautosomalen Region, u.a. *MXRA5*.

Bei einem nahen Verwandten, dem Bergmeerschweinchen, *Cavia tschudii*, decken die bisherigen Sequenzierungsergebnisse die Vollständigkeit besser ab, als es bei *Cavia porcellus* der Fall ist. Dieses Genom liegt zwar sequenziert, jedoch noch nicht formal annotiert vor, daher ist es bisher nur indirekt über die Sequenzsuche der BlastN-Suite (NCBI) zugänglich. Es wurden hier auch viele der Gene gefunden, welche sich in der pseudoautosomalen Region befinden, sodass davon auszugehen ist, dass diese auch bei *Cavia porcellus* vorliegen (St. Maxeiner, persönliche Mitteilung). Dieses wäre aufgrund des möglichen kommerziellen Erwerbs besser für die Forschung im Labor geeignet, als beispielsweise Eichhörnchen, für die die gleiche Beobachtung zutrifft.

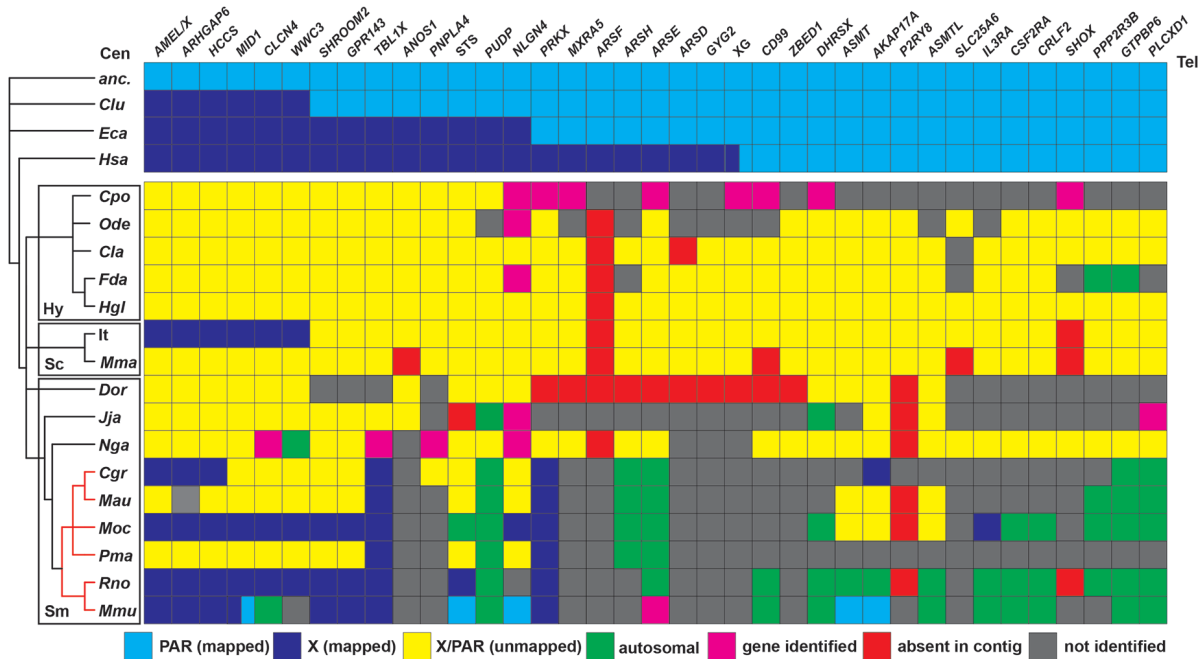


Abbildung 2-3: Gene des terminalen X-Chromosoms und der pseudoautosomalen Region.

Diese schematische Übersicht basiert auf einer früheren Zusammenstellung, die die zurückliegenden Änderungen in manchen Nagetier-Linien aufzeigt (Maxeiner et al., 2020). Die oberen Reihen stellen drei Spezies dar, in welchen die Grenzen der PAR bereits bestimmt wurden; blau, PAR-Gene; indigo, angrenzende X-spezifische Region; *Hund*, *Clu*, *Canis lupus*; *Pferd*, *Eca*, *Equus caballus*; *Hsa*, *Homo sapiens*. Im Folgenden sind 16 Nagetier-Genome aufgelistet, welche teilweise unvollständig beschrieben sind: Unterordnung *Hystricomorpha*, *Hy* (*Cpo*, *Cavia porcellus*; *Ode*, *Octodon degus*; *Clu*, *Chinchilla lanigera*; *Fda*, *Fukomys damarensis*; *Hgl*, *Heterocephalus glaber*); Unterordnung *Sciuromorpha*, *Sc* (*It*, *Ictidomys tridecemlineatus*; *Mma*, *Marmota marmota*), Unterordnung *Supramyomorpha*, *Sm* (*Cgr*, *Cricetulus griseus*; *Dor*, *Dipodomys ordii*; *Jja*, *Jaculus jaculus*; *Mau*, *Mesocricetus auratus*; *Mmu*, *Mus musculus*; *Moc*, *Microtus ochrogaster*; *Nga*, *Nannospalax galili*; *Pma*, *Peromyscus maniculatus*; *Rno*, *Rattus norvegicus*). Die Balken an der linken Seite zeigen evolutionäre Verwandtschaften der Nagetierklassen auf. Mit den roten Balken ist die Klade *eumuroida* der Unterklasse *myomorpha* hervorgehoben. PAR mapped, diese Gene wurden mittels genomischem Abgleich oder in der Literatur in der PAR nachgewiesen; X/PAR unmapped, diese Gene befinden sich auf Contigs, eine autosomale Translokation ist jedoch nicht nachgewiesen (Übersetzung angelehnt an Maxeiner et al., 2021).

2.2 Die pseudoautosomale Region

Als pseudoautosomale Region (PAR) wird ein bestimmter Chromosomenabschnitt auf den Geschlechtschromosomen von Säugern bezeichnet. Es handelt sich um eine subtelomere Region, welche in den meisten Säugetieren zu finden ist, auf beiden Geschlechtschromosomen liegt und sich aus verschiedenen Genen zusammensetzt. Diese Gene bilden homologe DNA-Sequenzen, sodass die PAR in beiden Geschlechtern als identische Sequenzabschnitte vorliegt, also wie auf Autosomen, wodurch die Bezeichnung als „pseudoautosomal“ zustande kommt. Die genaue Grenze zwischen den spezifischen Sequenzen der Geschlechtschromosomen ist in vielen Säugetierklassen noch nicht vollständig bestimmt. Meist liegen auch nur Sequenzinformationen diesbezüglich für weibliche Organismen vor, wohingegen sie für die männlich spezifische Region auf dem Y-Chromosom noch fehlen.

Die PAR stellt einen kleinen DNA-Strang dar, welcher gerade im männlichen Organismus von Bedeutung ist. Sie ermöglicht an den Telomerenenden der Geschlechtschromosomen, dass es nach Erosion des proto-X-Chromosoms in das Y-Chromosom weiterhin zu einem Cross-Over und Rekombinationen kommen kann (Bougoyner 1982; Flaquer et al., 2008). Sie gewährleistet also während der Meiose von X- und Y-Chromosom in der Spermatogenese die Paarung der Geschlechtschromosomen. Als ein Ort der Rekombination und des Cross-Over dient sie dazu, dass DNA-Sequenzen zweier homologer Chromosomenpaare ausgetauscht werden können.

Evolutionär gehörten etwa 30 Gene zu der PAR, was sich allerdings mit der Zeit verändert hat. Die Region bleibt zwar in den meisten Säugetieren erhalten, jedoch hat sich die Grenze, im Englischen als pseudoautosomal boundary (PAB) bezeichnet, unterschiedlich verschoben. Während der Entwicklung der Säugetiere scheint diese Grenze zwischen PAR und geschlechtschromosom-spezifischer Region immer weiter in Richtung der Telomere zu wandern (Raudsepp and Chowdhary, 2015). Um die PAR zu erhalten, war es erforderlich, dass sich Gene von Autosomen an die Telomere anhaften (Graves, 2016). In Abb. 2-1 ist dieser Grenzbereich mit den dazugehörigen Genen in unterschiedlichen Säugetieren ausführlicher dargestellt. Bei Hunden liegt diese Grenze z.B. zwischen dem X-spezifischen *WWC3* und dem pseudoautosomalen *SHROOM2*; bei Pferden stromabwärts von *NLGN4X*. Im Menschen ist die PAR auf 14 Gene reduziert, wobei sich die Grenze im *XG*-Gen befindet (Weller et al., 1995). Somit liegt das in dieser Arbeit erforschte *MXRA5* auch auf der geschlechtschromosom-spezifischen Seite beim Menschen.

Dieser Prozess an der PAB ist allerdings nicht bei allen Säugern gleich verlaufen. Beispielsweise hat sich in der Nagetier-Unterklasse *Myomorpha*, und genauer in der Klade *Eumuroida*, ergeben, dass eine Ansammlung an Genen in dieser Region verloren gegangen ist, auf Autosomen transloziert oder auf X-spezifische Regionen rekombiniert wurde, weshalb in diesen Tieren keine genauere Forschung zur PAR möglich ist (Maxeiner et al., 2020). Zu dieser Tiergruppe zählen auch Maus und Ratte als gängige Labortiere.

Im humanen Genom existieren zwei pseudoautosomale Regionen. Die größere PAR1, die auch Thema dieser Arbeit ist, befindet sich auf dem kurzen p-Arm, bei dieser kommt es bei männlichen Individuen zu einem obligatorischen Crossing-over. Die kürzere PAR2 ist am langen q-Arm lokalisiert und in der Regel nicht an Rekombinationen beteiligt (Graves et al., 1998). Außerdem liegt die PAR2 bei Nagetieren nicht vor.

Wie bereits erwähnt, ist die PAR1 häufig von Rekombinationen betroffen (Filatov, 2004), was dadurch begründet ist, dass weiter vom Centromer entfernte Regionen häufiger rekombiniert werden. Bei häufiger Rekombination kann es natürlich vereinfacht zu Mutationen im Genom kommen; dies ist jedoch bei der PAR entgegen der Vermutung eher seltener der Fall (Huang et al., 2005). Die Rekombinationshäufigkeit beim Menschen am Übergang zu den restlichen

Gen-Abschnitten führt dazu, dass in diesem Bereich eine auffallend GC-reiche Sequenz entsteht (Chen et al., 2006).

Neben dem Verlust vieler Gene in dieser Region, hat sich herausgestellt, dass diese Sequenz und auch die hohe Rekombinationszahl bei Mäusen, nicht in dieser Form vorhanden ist, wodurch es zusätzlich schwieriger wird, die Genregion an der Maus als klassisches Tiermodell zu erforschen (Galtier, 2004).

Von den Genen, welche sich in der PAR befinden, sind auch einige mit Krankheiten assoziiert. Eines dieser Gene ist *ANOS1*, bei dessen Mutation es zum sogenannten Kallmann-Syndrom (Nie et al., 2017) mit einer Entwicklungsstörung der Gonaden und einer Anosmie kommen kann. Des Weiteren befindet sich das Gen *CD99* in der PAR (Lee et al., 2012), das für ein Oberflächenprotein kodiert, welches ein Tumorsuppressor von Osteosarkomen darstellt und in der histopathologischen Diagnostik von Bedeutung ist. Eines der bekannteren Gene ist das *SHOX*-Gen, das in Verbindung zum Turner-Syndrom steht (Schneider et al., 2005).

Aufgrund dieser Tatsache ist die besagte Region von besonderem Interesse, und es wird auch vermutet, dass andere Gene wie beispielsweise *MXRA5*, eine Assoziation zu gewissen Pathologien aufweisen. Das Meerschweinchen wird daher in dieser Arbeit als Modelltier herangezogen, weil es für Versuche in dieser Genregion das einzige, kommerziell zugängliche Labortier ist.

2.3 Heterogene Faktenlage bisheriger Forschungsergebnisse zu *MXRA5*

Bei *MXRA5* handelt es sich um ein Gen, das für ein Extrazellulärmatrix-Protein (EZM) kodiert, worüber aus der bisher veröffentlichten Literatur wenig bekannt ist. Bei den bisherigen Untersuchungen wurde meist auf das menschliche Gen/Protein zurückgegriffen, da *MXRA5* in den üblichen Labor-Nagetieren, wie Maus und Ratte, nicht nachweisbar ist; im Menschen weist es hingegen vor allem in der Niere eine erstaunlich hohe Expression auf (Poveda et al., 2016). Die Funktion von *MXRA5* ist bisher unbekannt; es wird allerdings mit diversen pathologischen Veränderungen im Organismus in Verbindung gebracht. Einer der auffälligsten Aspekte in der Literatur ist in diesem Zusammenhang die immer wiederkehrende Assoziation mit der Entstehung von Karzinomen und der Metastasierung.

Man vermutet, dass *MXRA5*, welches auch unter dem Namen *Adlican* bekannt ist, für ein Adhäsions-Proteoglykan kodiert und womöglich als Tumorsuppressorgen agieren könnte (Xiong et al., 2013). In dieser Studie wurden Menschen mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (non-small-cell lung cancer, NSCLC) auf Veränderungen von *MXRA5* untersucht, da bereits in verschiedenen Tumoren somatische Mutationen dieses Gens anhand der ‚COSMIC Database‘ identifiziert worden waren. Diese Mutationen könnten in ähnlicher Weise wie loss-of-function Mutationen anderer Gene über den EZM Remodeling Pathway zur

Tumormigration und Metastasierung beitragen. Ähnliche Mutationen sind auch im Liposarkom gefunden worden, bei denen *MXRA5*, assoziiert mit Zell-Adhäsion und Zytoskelett-Organisation, zu den essenziellen mutierten Genen zählt, die im Gewebe signifikant angereichert sind (Kanojia et al., 2015).

Weitere Untersuchungen ergaben auch eine schlechtere Prognose für Patienten mit NSCLC bei einem hohen Expressionslevel von *MXRA5* (Weng et al., 2016). Die EZM- und Zelloberflächenproteine wurden hier auf ihre Rolle in der Progression von Lungenkrebs untersucht, wobei aufgefallen ist, dass ein hohes Expressionslevel mit einer signifikant schlechteren Überlebensrate bei pulmonalem Adenokarzinom assoziiert war. Es stellte sich die Frage, ob das Gen wegen der Überexpression eventuell eine signifikante onkogene Funktion aufweist und somit als Angriffspunkt in der zukünftigen Krebsdiagnostik und -behandlung dienen könnte.

Auch in der Untersuchung des Kolorektalen Karzinoms (CRC) stellten sich Verbindungen zu *MXRA5* heraus. Da es in histologischen Schnitten besonders zu einer Anfärbung von *MXRA5* im Zytoplasma von CRC-Zellen gekommen ist, ist vermutet worden, dass die CRC-Zellen für die Überexpression verantwortlich sind, sodass *MXRA5* als möglicher neuer Biomarker für Kolorektales Karzinom dienen könnte (Wang et al., 2013). Es stellten sich signifikante Unterschiede der *MXRA5*-Expression in CRC-Gewebe und Adenomgewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe heraus. Außerdem korreliert es wohl mit bestimmten pathologischen Merkmalen von CRC, einschließlich der Läsionsseite, den Tumorstadien und der Fernmetastasierung. Die Autoren zeigten übereinstimmend, dass *MXRA5* in nahezu allen gesunden Kolongeweben abwesend war, was natürlich den möglichen Wert als Biomarker für die Früherkennung von Kolorektalem Karzinom und omentaler Metastasierung verstärken würde (Yu et al., 2014). Letztgenannte Studie, die die Assoziation der Sitzgewohnheiten mit dem Expressionslevel verschiedener Biomarker bei CRC-Patienten untersuchte, stellte heraus, dass die mRNA-Level der Biomarker, einschließlich *MXRA5*, in fortgeschrittenen Tumorstadien am höchsten waren. Diese Ergebnisse könnten auf den Zusammenhang mit der Entwicklung von Kolorektalem Karzinom hinweisen.

Eine neuere Arbeit zu ähnlicher Thematik erkannte *MXRA5* als Biomarker in Gliomgeweben, welcher bei höheren Expressionslevels mit einer schlechteren Prognose assoziiert war (Sun et al., 2021). Hier wird bezüglich des Proteins selbst auch beschrieben, dass es sich um ein sezerniertes Glykoprotein aus der *MXRA*-Familie handelt.

Die wiederkehrenden Beobachtungen, dass in verschiedenen Tumorgeweben eine Mutation und Überexpression von *MXRA5* vorliegt, machen das Gen für weitere klinische Forschung attraktiv. Dies lässt schlussfolgern, dass *MXRA5* oder das daraus entstehende Protein, einen möglichen Wert in der diagnostischen Früherkennung einiger Krebserkrankungen besitzen

oder sogar als Target-Molekül für die Pharmakologie in der Behandlung dieser Erkrankungen dienen könnte.

Bei neueren Untersuchungen hat man unabhängig von dem Bezug zum Karzinomgeschehen festgestellt, dass *MXRA5* in Prostatabiopsien mit Benignem Prostata-Hyperplasiesyndrom (BPH) hochreguliert vorlag (Xiao et al., Mai 2020), wobei es sich vor allem im Prostatastroma nachweisen ließ. Mit dieser Überexpression ging eine verstärkte epitheliale Zellproliferation einher. Die immunhistologische Darstellung zeigte die Anfärbung von *MXRA5* allerdings vor allem in den Stromazellen der Prostata und weniger in den Epithelzellen. Darüber hinaus konnte bei *MXRA5*-Knockdown-Zellen gezeigt werden, dass dies einen Zellzyklusarrest bewirkt und nicht die Apoptose der Zelle hemmt, was man aus dem Signalweg vermuten könnte.

Andere Studien präsentierten *MXRA5* als ein Gen, das mit Autism Spectrum Disorder (ASD) assoziiert ist (Al-Mubarak et al., 2017). Es stellten sich Mutationen des Gens in drei unverwandten ASD-Familien heraus, weshalb man auch auf eine Bedeutung in der neuronalen Funktion und Entwicklung schließen könnte. Als Proteoglykan, das eine Rolle in EZM-Restrukturierung und Zell-Zell-Verbindungen spielt, wären diese Aufgaben im neuronalen System natürlich sehr interessant für die weitere Forschung. In den Untersuchungen zeigten sich jedoch abgesehen vom Autismus keine Beziehungen zu weiteren neurologischen Erkrankungen.

Neueste Untersuchungen erforschten die extrazelluläre Matrix von Aortenklappen, sowohl im funktionsfähigen als auch im kalzifiziert, stenosierten Zustand (Bouchareb et al., 2021). Hierbei stellt sich heraus, dass *MXRA5* als möglicher Biomarker für kalzifizierte Aortenklappenstenosen Anwendung finden könnte, da eine stärkere Expression im Vergleich zum gesunden Gewebe beobachtet werden kann.

Die genannten klinischen Aspekte, welche in Tabelle 2-1 nochmal zusammengefasst sind, machen dieses Gen für weitere biomedizinische Untersuchungen interessant. Die unterschiedlichen Herangehensweisen und Ergebnisse erfordern auch eine grundlegende Erforschung, um möglicherweise ein geeignetes Tiermodell, abgesehen von Maus und Ratte, zu etablieren.

Gewebe	Pathologie	Veröffentlicht
Lunge	NSCLC	Xiong et al. (2013) Weng et al. (2016)
Fettgewebe/Adipozyten	Liposarkom	Kanojia et al. (2015)
Colon	CRC	Wang et al. (2013) Yu et al. (2014)
ZNS	ASD	Al-Mubarak et al. (2017)
Prostata	BPH	Xiao et al. (2020)
Aortenklappe	kalzifizierte Aortenklappenstenose	Bouchareb et al (2021)

Tabelle 2-1: Auflistung der in der Literatur erwähnten, mit MXRA5 assoziierten Gewebe und Pathologien, inklusive Erstautor und Veröffentlichungsdatum

NSCLS=non-small-cell lung cancer; CRC=colorectal carcinoma; ZNS=zentrales Nervensystem; ASD=Autism spectrum disorder; BPH=benignes Prostatahyperplasiesyndrom

2.4 MXRA5 als Teil der Familie der MXRA-Proteine

Der Name MXRA5 lässt auf weitere Familienmitglieder in der Gruppe der matrix-remodelling associated Proteine schließen. Beim Studieren der bisher vorhandenen Literatur fällt auf, dass zum jetzigen Zeitpunkt lediglich Untersuchungen zu MXRA7 und MXRA8 durchgeführt wurden. Es wird schnell klar, dass es sich hierbei um eine sehr heterogene Gruppe an Genen handelt, d.h. eher eine „künstliche Familie“, welche nicht verwandte Gene beinhaltet. Diese sind bezüglich ihrer Struktur oder Sequenz nicht homolog; außerdem fehlt ein eindeutiges Klassifizierungsprinzip in bekannten üblichen Publikationen.

Zu MXRA7, von welchem erstmals im Jahre 2002 berichtet wurde, gibt es aktuell ähnlich wie im Fall des MXRA5 eher wenige Informationen zur Funktion des Gens und des daraus kodierten Proteins. In einer Studie wird diesem Protein eine mögliche Rolle in der Pathologie der Psoriasis vulgaris zugeschrieben. Immunhistochemisch konnte das Protein in der gesunden Haut mit der höchsten Expression in der Basalschicht nachgewiesen werden, während in Hautproben von Psoriasis-Patienten eine Abwesenheit in den basalen Stammzellen zu erkennen war (Ning et al., 2018). Es könnte auch in Funktionen von mesenchymalen Knochenmark-Stammzellen bezogen auf die Knochenformation involviert sein. Es zeigte sich nämlich eine retardierte Osteogenese bei MXRA7-defizienten Mäusen, was vermuten lässt, dass MXRA7 gegebenenfalls die Balance zwischen Osteogenese und Adipogenese im Knochenmark regulieren könnte (Zhon et al., 2019).

Weitere Nachforschungen unter anderem in Datenbanken wie BioGPS, Expression Omnibus und EuroExpress zeigten hohe Expressionslevel von *MXRA7* mRNA im murinen Augengewebe wie der Retina, der Cornea oder der Linse. Hierbei wurden auch bestimmte Veränderungen wie etwa ein unterexprimiertes Muster in Proben mit Cornea-Erkrankungen beobachtet. Es könnte somit von Bedeutung für pathologische Prozesse wie Verletzungen, inflammatorischen Neovaskularisierungen oder die Wundheilung sein (Jia et al., 2017).

Ein weiteres, nur teilweise erforschtes Gen aus dieser Familie ist *MXRA8*. Dieses kodiert für einen Oberflächenrezeptor, welcher als „Andockstation“ für verschiedene arthritogene Alphaviren dient, wie beispielsweise Chikungunya Virus (CHIKV), Ross-River-, Mayaro- und O'nyong-nyong-Viren (Zhang et al., 2019). Das Protein wird nicht wie *MXRA5* als extrazelluläres Matrixprotein sezerniert, sondern sitzt als Zelladhäsionsmolekül für obengenannte Viren der jeweiligen Zelle auf. Ein weiterer Unterschied ist, dass *MXRA8* (genau wie auch *MXRA7*) im murinen Genom vorhanden und somit im Gegensatz zu *MXRA5* eine Untersuchung im Nagertiermodell möglich ist. Diesbezüglich sind bereits Mäuse mit mutierten Allelen im *MXRA8*-Gen erzeugt worden. Hierbei zeigten sich geringere Infektionen der muskuloskelettalen Gewebe der Mäuse durch die zuvor genannten Viren (Zhang et al., 2019). Bei den mit CHIKV infizierten Mäusen zeigten sich weniger Schwellungen der Pfoten, was mit dem Schweregrad der Infektion korreliert.

Eine weitere Untersuchung stellte heraus, dass *MXRA8* zu einer Gruppe von solchen Genen zählt, welche von Bedeutung in der Pathologie des klarzelligigen Nierenzellkarzinoms sein könnten. Es konnte festgestellt werden, dass eine erhöhte Genexpression eine schlechtere Überlebensrate der Patienten bedingt und im Gegensatz dazu eine Mutation des Gens signifikant mit krankheitsfreiem Überleben assoziiert ist (Li und Xu, 2019). *MXRA8* wird somit neben *MXRA5* eine mögliche Funktion als Tumormarker zugeschrieben (Kiflemariam et al, 2015). Die beiden letztgenannten Untersuchungsergebnisse kennzeichnen eine gewisse Ähnlichkeit hinsichtlich der Funktion von *MXRA5* und *MXRA8*.

Zusammenfassend scheint es sich bei dieser „Genfamilie“ um eine heterogene Gruppe zu handeln, die zwar in ihrer Namensgebung ähnlich ist, hinsichtlich ihrer Funktionen und Lokalisationen im Körper jedoch weniger gemeinsam hat. (Diskussion)

2.5 Was bisher über den Aufbau des Gens bekannt ist

Ein Ergebnis des Human Genome Project (HGP) war u.a., dass sich das menschliche Genom aus ca. 23000 Genen zusammensetzt, die für rund 40000 Proteine kodieren (National Human Genome Research Institute (NHGRI)). Die höhere Anzahl an Proteinen lässt sich auf alternative Spleißvorgänge zurückführen. Um nun eines dieser Gene, in diesem Fall *MXRA5*, und das daraus resultierende Protein zu untersuchen, kann man auf die in Datenbanken gespeicherte Genzusammensetzung zurückgreifen, mit deren Hilfe beispielsweise Primer für die PCR bestimmt werden können.

Über das humane *MXRA5* hat man bereits herausgefunden, dass es sich aus insgesamt sieben Exons unterschiedlicher Größe (Abb. 2-2) zusammensetzt (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/25878>, NCBI Gene Bank). Diese Exons bestehen zusammen aus ca. 7000 Basenpaaren, womit es sich um ein sehr großes Gen handelt, das für ein Protein aus 2828 Aminosäuren kodiert. Zum Aufbau des Proteins ist bisher bekannt, dass es ähnlich wie Perlecan (Noonan et al., 1991) sieben Leucine-rich-repeat Domänen und zwölf Immunglobulin-like C2-type Domänen enthält (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov/gene).

Als Leucine-rich-repeat Region werden Abschnitte im Proteinaufbau bezeichnet, die sich, wie durch den Name bereits beschrieben wird, aus auffällig vielen Leucinen zusammensetzen und strukturell zu einer α/β -Hufeisen-Faltung des Proteins beitragen (Enkhbayar et al., 2004). Sie beeinflussen die Tertiärstruktur, also die räumliche Proteinkonformation, was auch die Funktion des Proteins beeinflussen kann. In dem Protein befinden sie sich vorrangig auf dem ersten Drittel n-terminal.

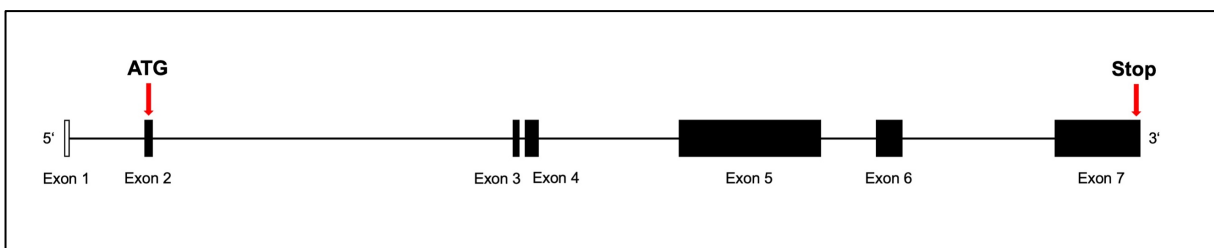


Abbildung 2-4: Aufteilung des humanen *MXRA5* in seine sieben Exons

Dargestellt ist der Aufbau des humanen *MXRA5*-Gens, welches aus insgesamt sieben Exonen aufgebaut ist. Das Startcodon liegt auf Exon 2, somit kodieren nur sechs der sieben Exonen das funktionelle Protein. Das Stop-Codon befindet sich auf Exon 7. Die Darstellung zeigt die Exonen relativ ihrer Größe.

Die zwölf IgG-Domänen liegen eher auf dem zweiten und dritten Drittel des Proteins und dienen möglicherweise als Rezeptor für weitere Strukturen oder andere Proteine im Gewebe. Somit können sie auch, analog zu ihren Namensgebern im Immunsystem, wichtig für die Interaktionen mit anderen Proteinen sein.

Wie der Name ‚Matrix-remodelling-associated 5‘ schon vermuten lässt, handelt es sich um ein Protein, das sich in der extrazellulären Matrix befindet. Auch die Beschreibung als Adhäsions-Proteoglykan zwischen einzelnen Zellen (Xiong et al., 2013) bestärkt diese Vermutung und suggeriert, dass es, wie viele andere Extrazellulärmatrixproteine, am ehesten im Bereich der Basalmembran oder im Bindegewebe lokalisiert ist. In den zuvor angesprochenen Studien wird allerdings auch von Anfärbungen des Proteins im Zytoplasma von CRC-Zellen oder in Stromazellen der Prostata berichtet (Wang et al., 2013; Xiao et al., 2020).

Da diese Angaben eher uneinheitlich sind, muss mit einer sinnvollen Strategie versucht werden, die Lokalisation des Proteins im Gewebe herauszufinden. Es kann von Nutzen sein, wie auch in einzelnen Studien ähnlich durchgeführt, zunächst zu untersuchen, in welchen Geweben *MXRA5* anzutreffen ist. Hierfür wird mittels RT-qPCR die RNA-Transkriptmenge quantifiziert, womit man anhand der Expressionslevel schon mögliche Rückschlüsse auf die Lokalisation ziehen kann. Ein Ziel hierbei ist auch die Transkriptmenge mit der Proteinmenge zu korrelieren.

Um dies allerdings genauer definieren zu können, ist es sinnvoller, einen geeigneten Antikörper zu finden, mit dessen Hilfe man unter dem Fluoreszenzmikroskop die Lokalisation präziser herausfinden kann. Ist diese Antikörper-Färbung erfolgreich, können auch Vermutungen über bestimmte Grundmuster in den Geweben hinsichtlich der Funktion des Proteins gestellt werden.

2.6 Die extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix ist ein hoch spezialisiertes und dynamisches Gerüst, in das die Zellen in den unterschiedlichen Geweben eingebettet sind.

Sie setzt sich aus vielen verschiedenen Komponenten zusammen. Einerseits aus den fibrillären, zu denen Kollagen, Fibronectin und Elastin gehören, aber auch aus nicht-fibrillären wie Proteoglykanen, Hyaluron und Glykoproteinen einschließlich den „matrixzellulären“ Proteinen. All diese Komponenten bilden zusammen komplexe Netzwerke, über welche sie mit den einzelnen Zellen Verbindungen eingehen und sozusagen ein Kommunikationssystem zwischen den Zellen über Oberflächenrezeptoren o.ä. bilden (Theocharis et al., 2019).

Die EZM übernimmt viele unterschiedliche Aufgaben im Gewebe. Sie dient als Stützgerüst und bietet einen mechanischen Schutz und somit auch Stabilität. Außerdem sorgt sie für eine Gewebemöostase, da sie auch essenziell für die Gewebefunktion und die Zellregulierung ist (Karamanos et al., 2019). Um in den unterschiedlichen Geweben auch verschiedene Funktionen ausüben zu können, unterscheidet sich ihr Aufbau auch von Gewebe zu Gewebe. Sie ist sehr veränderbar - beispielsweise während der Reparatur von Gewebsverletzungen - und damit auch an pathologischen Veränderungen und am Fortschreiten vieler Krankheiten beteiligt.

Ist diese Restrukturierung der EZM gestört, kann es zum Progress bestimmter Pathologien kommen, da hierbei die Zell-Matrix-Interaktion geschädigt sein kann. Es sind auch Mutationen in den Matrix-Molekülen von Bedeutung, da es dadurch zu deutlich erkennbaren Unterschieden zu gesundem Gewebe kommen und somit ihre Aufgaben nicht zuverlässig ausgeführt werden kann. Dies kann als Folge auch zu unterschiedlichen genetischen Störungen führen.

Aufgrund der genannten Funktionen der EZM kann es somit bei einem Verlust der Stabilität und Zellinteraktionen zu Fibrose, Arthrose, genetischen Erkrankungen oder sogar Krebs kommen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Zur Durchführung der Versuche fanden folgende Gerätschaften Verwendung:

accuSpin Micro 17	Fisher Scientific, USA
Micro Centrifuge	Carl Roth®, Deutschland
RS-VA10, Vortex	Phoenix Instrument, Deutschland
Research plus Pipetten	Eppendorf, Deutschland
Transferpette S	Brand, Deutschland
3-18k Kühlzentrifuge	Sigma, Deutschland
CK40, Mikroskop	Olympus
CO ₂ Inkubator MCO-5AC, Zellkultur	Sanyo, Japan
CO ₂ Inkubator MCO-20AIC, Bakterienkultur	Sanyo, Japan
BiowizardGolden Line, Hood für Zellkultur	Kojair, Finnland
Heizblock BTD	Grant
SWB 20, Wasserbad für Zellkultur	Medingen
NanoDrop One	Thermo Scientific, USA
T100™ Thermal Cycler	Bio-Rad, USA
CFX Connect™ Real-Time System	Bio-Rad, USA
Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ with Image Lab™ Software	Bio-Rad, USA
Power Pac™ Basic + HC	Bio-Rad, USA
1202 MP, Waage	Sartorius
Mini-PROTEAN® Tetra System	Bio-Rad, USA
Sub-Cell® GT	Bio-Rad, USA
Axio Imager M2, Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Deutschland
Hera Freeze HFU T Series	Thermo Scientific, USA
CHK, Mikroskop	Olympus
Seven Excellence Multiparameter	Mettler Toledo, USA
Tissue Ruptor, Homogenisator	Qiagen, Deutschland
accu-jet® pro	Brand, Deutschland

3.1.2 Kits

Die folgenden Kits wurden zur Erzielung der Ergebnisse benutzt:

Direct-sol™ RNA Miniprep Plus	Zymo Research, USA
Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit	Zymo Research, USA
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research, USA
Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research, USA
ZymoPURE™ II Plasmid Midiprep Kit	Zymo Research, USA
SuperSignal™ West Pico PLUS, Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, USA
Luna® Universal Probe One-Step, RT-qPCR Kit	New England BioLabs, USA
Quick Ligation™ Kit	New England BioLabs, USA
Prime STAR HS DNA Polymerase; PCR Kit	TaKaRa, Japan

3.1.3 Verbrauchbare Gegenstände:

Reagiergefäße 1,5/2 ml	Sarstedt, Deutschland
Cellstar® Tubes 15/50 ml	Greiner Bio-One
Serological Pipette 5/10/25 ml	Sarstedt, Deutschland
Objektträger + Deckgläser	R. Langenbrinck
Pipettenspitzen	Brand, Deutschland
14 ml Polypropylene Round-Bottom	Falcon
TC-Flasche T25/T75	Sarstedt, Deutschland

3.1.4 Chemikalien:

Färbereagenzien:

Hämalaun nach Mayer	Carl Roth, Deutschland
Hämatoxylin A + B nach Weigert	Carl Roth, Deutschland
Goldner I/II/III	Carl Roth, Deutschland
Eosin, Certistain	Merck, Deutschland
Xylol	VWR Chemicals, USA
DePex	Seva
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH
DPBS, gibco	Thermo Scientific, USA
DMEM, gibco	Thermo Scientific, USA

Trypsin		
2-Mercaptoethanol		Agilent Technologies, USA
IPTG		Zymo Research, USA
X-Gal		Zymo Research, USA
Midori Green		Nippon Genetics Europe GmbH
Tri Reagent®		Zymo Research, USA
Citronensäure		Carl Roth, Deutschland
Orange G		
Q5® High-Fidelity 2x Master Mix		New England BioLabs, USA
Proteinase K		Zymo Research, USA
gBlocks® Gene Fragments		IDT, USA
Quick-Load Purple 2-Log DNA Ladder		New England BioLabs, USA
Linearized pMiniT™ 2.0 Vector		New England BioLabs, USA
Cloning Master Mix 1 + 2		New England BioLabs, USA

Allgemeine Lösungen und Puffer:

Nuclease-free Water		Ambion
10 x PBS	57,5 ml	Lösung A NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O
		0,2 M 31,2 g/l
	192,5 ml	Lösung B Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
		0,2 M 35,6 g/l
	44,8 g	NaCl
	ad 1 l	A. bidest
		pH 7,4 einstellen mit HCl 5% und NaOH 1 mol/l
1 x PBS	100 ml	10 x PBS in 800 ml A. bidest,
		pH 7,4 einstellen
	ad 1 l	A. bidest
Blocklösung	ad 10 ml	PBS 1 x
	0,01 g	BSA
	1 ml	NHS
	0,05 g	Tween 20 (Sigma)
DAPI	1 µl	Stammlösung (10 mg/ml)
	ad 50 ml	A. bidest
Ponceau S Färbelösung	0,5 g	Ponceau S
	3 g	Trichloressigsäure
	ad 100 ml	A. bidest

10% SDS	10 g	SDS ultra pure (Carl Roth)
	ad 100 ml	A. bidest; bei 60°C lösen
SDS-Page Laufpuffer 10 x	30,3 g	Tris
	144 g	Glycin
	10 g	SDS
	ad 1 l	A. bidest
Trenngel (Western Blot) 10%	12,3 ml	A. bidest
	7,5 ml	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
	0,3 ml	10% SDS
	9,9 ml	Acrylamid 30%
	0,15 ml	10% APS
	0,02 ml	TEMED
Sammelgel (Western Blot) 4 Stk.	6,15 ml	A. bidest
	2,5 ml	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
	0,1 ml	10% SDS
	1,34 ml	Acrylamide 30%
	0,05 ml	10% APS
	0,01 ml	TEMED
50 x TAE Laufpuffer	242 g	Trizma Base (Sigma)
	0,37 g	EDTA (Sigma)
	57,1 ml	Essigsäure 96%
	ad 1 l	A. bidest
TBST-Puffer	2,68 g	Tris-HCl (Carl Roth)
	0,4 g	Trizma Base (Sigma)
	5,8 g	NaCl → pH 7,4-7,5 einstellen
	2 ml	Tween 20 (Sigma)
	ad 2 l	A. bidest
10 x Transferpuffer	30,3 g	Trizma Base (Sigma)
	144 g	Glycin
	ad 1 l	A. bidest
1 x Transferpuffer	100 ml	10 x Transferpuffer
	200 ml	Methanol 100% (VWR Chemicals)
	ad 1 l	A. bidest
Citratpuffer (1 M)	19,2 g	Citronensäure
	ad 100 ml	A. bidest
		Einstellen des pH-Werts

Lösungen für die Bakterienkultur:

LB-Medium	10 g	NaCl
	10 g	Trypton
	5 g	Hefe-Extrakt
	ad 1 l	A. bidest; pH 7,4; 20 min autoklavieren
LB-Nährbödem	15 g	Dunkel-Agar
	ad 1 l	LB-Medium; pH 7,4; 20 min autoklavieren
		Antibiotika erst bei < 55°C zusetzen
Ampicillin-Stammlösung	2,5 g	Ampicillin
	ad 50 ml	A. bidest; steril filtrieren; Lagerung -20°C

Restriktionsspaltung: Reagenzien und Enzyme:

NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix	New England BioLabs, USA
NEBuffer 3	New England BioLabs, USA
Purified BSA 100x	New England BioLabs, USA
CutSmart® Buffer	New England BioLabs, USA
<i>Bam</i> HI	New England BioLabs, USA
<i>Bam</i> HI-HF®	New England BioLabs, USA
<i>Eco</i> RI-HF®	New England BioLabs, USA
<i>Hind</i> III-HF®	New England BioLabs, USA
<i>Dpn</i> I	New England BioLabs, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Aufreinigung von Nukleinsäuren

Grundsätzlich soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass zur Spezifizierung der Nukleinsäuren die laborüblichen englischen Bezeichnungen „DNA“ und „RNA“ anstelle der deutschen Bezeichnungen „DNS“ und „RNS“ verwendet werden.

RNA-Isolierung und RNA-Quantifizierung

Ziel dieser Methode ist es, die RNA aus Gewebebiopsien des Meerschweinchens zu isolieren, um diese anschließend für die Quantifizierung mittels qPCR (quantitative Polymerasekettenreaktion) nutzen zu können. Hierfür werden die bereits zuvor entnommenen Organe, welche bei -80°C gelagert wurden, aufgetaut, aus dem Einfrier- und Lagermedium (DNA/RNA Shield, Zymo Research, Freiburg) mit einer Präparierschere grob zerkleinert und mit einem Stabhomogenisator (Tissue Ruptor, Qiagen, Hilden) in einem Gefäß in 6 ml TriReagent (Zymo Research) homogenisiert. Im Anschluss wird die homogenisierte Lösung mit Hilfe des Direct-zol™ RNA Miniprep Plus Kit (Zymo Research), unter Befolgung des beigelegten Protokolls, bearbeitet, um die RNA zu isolieren.

Nach der Aufarbeitung werden die RNA-Konzentrationen der eluierten Lösungen mit einem NanoDrop One (ThermoScientific, Waltham) durch photometrische Absorption gemessen.

Aufreinigung genomischer DNA aus Vollblut

Um beispielsweise Teil-Sequenzen der DNA mittels PCR amplifizieren zu können, ist es zunächst notwendig, diese aus Gewebeproben zu isolieren. Hierzu wird die DNA aus dem (bei der Präparation der Tiere weggefrorenem) Meerschweinchen-Vollblut, nach Anleitung des Quick-DNA™ Miniprep Plus Kits aufgereinigt. Diese Aufreinigung erfolgt durch eine Säulenmatrix, welche eine Affinität für die DNA besitzt und diese somit durch Zentrifugation aus dem Flüssigkeitsgemisch isoliert, um sie später mit H₂O oder einem Elutionspuffer aus der Matrix wieder in Lösung zu bringen.

Die Vollblutprobe wird anfangs mit Proteinase K und in einem geeigneten Puffer für 10 min bei 55°C inkubiert, um die Zellen zu lysieren und somit die DNA freizusetzen. Anschließend erfolgen einzelne Waschschrte mit verschiedenen Puffern, wonach schließlich die Probe mit 70 µl DNA Elution Buffer eluiert wird.

Nach der Aufreinigung wird die Konzentration der DNA mittels Absorptionsspektroskopie in einem NanoDrop One bestimmt.

3.2.2 RNA/DNA-Quantifizierung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA oder RNA in den Reaktionslösungen erfolgt mit Hilfe eines NanoDrop One. Hierbei handelt es sich um ein Spektralphotometer, welches das Spektrum des sichtbaren Lichts in einzelne Bänder zerlegt und anhand des Reflexionsgrades die Konzentration der zu messenden Probe bestimmen kann. Die Messung der Nukleinsäuren erfolgt allerdings grundsätzlich im UV-Bereich bei 230, 260 und 280 nm.

Für diese Quantifizierung werden 1,5 µl der Probe in die dafür vorgesehene Öffnung auf dem Gerät pipettiert. Durch Verschluss mit einem Metallarm, wird im Mess-Modus eine Flüssigkeitssäule erzeugt, in der die Absorption gemessen wird. Neben der Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration kann die Software auch Rückschlüsse auf die Probenqualität und evtl. Verunreinigungen, zum Beispiel durch Proteine oder aromatische Lösungsmittel, zulassen.

3.2.3 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion, PCR, ist ein Verfahren, das von Kary Mullis entwickelt wurde und dazu dient, DNA *in vitro* zu vervielfältigen. Wie der Begriff „Kettenreaktion“ schon beschreibt, handelt es sich hierbei um eine Reaktion, die immer wieder einzelne Reaktionsschritte in aufeinanderfolgenden Zyklen durchläuft.

Die Reaktion erfolgt in einem ThermoCycler T100 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München), und läuft in 20-40 Zyklen ab, welche jeweils aus drei Schritten bestehen. Im ersten Schritt, der Denaturierung, wird die Probe auf eine Temperatur zwischen 94-96°C erhitzt, um die doppelsträngige DNA in zwei Einzelstränge zu trennen, indem die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Basenpaaren durch die hohe Temperatur aufgespalten werden. Als Primerhybridisierung oder „Annealing“ wird der zweite Schritt bezeichnet, bei welchem die Temperatur für 30 s auf einem für die verwendeten Primer optimalen Wert gehalten wird. Dieser ist von der Länge und Sequenz der Primer abhängig und muss im Einzelfall zuvor ermittelt werden. Der Schritt dient dazu, dass die Primer sich an die zu synthetisierende DNA anlagern, um einen Angriffspunkt für die DNA-Polymerase zu schaffen. Diese kommt im dritten Schritt zum Tragen, dem Elongationsschritt, in welchem die DNA-Polymerase an den DNA-Einzelsträngen entlangläuft und die komplementären Stränge mit Nukleotiden auffüllt, um somit wieder eine doppelsträngige DNA zu synthetisieren, welche dann bereit für den nächsten Zyklus ist. Somit wird mit jedem Zyklus die vorhandene DNA verdoppelt.

Die verwendete DNA wird hierfür in einen Mastermix gegeben, welcher sich aus verschiedenen, für die PCR essenziellen Stoffen zusammensetzt und vorher angesetzt wird. Diese Stoffe sind hier vor allem die dNTPs, welche das Substrat darstellen, damit einen komplementären Strang zu bilden, die *Taq*-Polymerase (DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus*), welche zur Synthese der DNA-Polynukleotide dient und zwei Primer, die die zu vervielfältigende Sequenz erkennen und an diese binden, um den Reaktionsstartpunkt zu bilden. Außerdem wird $MgCl_2$ hinzugefügt, das die Aufgabe hat, lösliche Komplexe mit den dNTPs zu bilden und stabilisierend auf die Primer zu wirken.

Zu diesem Mastermix wird dann eine geringe Menge der verwendeten DNA gegeben und anschließend davon 25 μ l in PCR-Gefäße pipettiert, die dann unter einem für die Länge der Sequenz und die verwendete Polymerase optimiertem Programm in den Thermocycler gestellt werden.

3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Während der PCR-Reaktion wird die anschließende Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese vorbereitet. Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Verfahren zum Auftrennen von Nukleinsäuren nach ihrer Größe. Die Nukleinsäuren wandern im Gel entlang eines Spannungsfeldes. Man nutzt hierbei die Eigenschaft, dass sie durch die Phosphatgruppen negativ geladen sind und somit zur Anode wandern. Je kleiner ein Molekül ist, desto weiter und schneller wandert es im Gel und umgekehrt. Je höher die Konzentration der Agarose im Gel ist, desto langsamer wandern die Moleküle, was besonders eine höhere Auflösung kleinerer Fragmente erlaubt.

Bei den meisten Versuchen wurde ein Gel mit einer Konzentration zwischen 0,8-2% Agarose verwendet. Exemplarisch gibt man bei einem 1% igen Gel 2 g Agarosepulver in 200 ml TAE-Puffer und erwärmt es in der Mikrowelle auf maximaler Stufe bis das Pulver vollständig aufgelöst ist (etwa 2 min). Danach werden 10 μ l Midori Green (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren) zur schlierenfreien Lösung hinzugegeben, was essentiell für die später folgende Auswertung ist, da mit diesem Stoff die DNA-Fragmente als einzelne Banden im Gel unter UV-Licht sichtbar werden. Mithilfe eines standardisierten Basenleiters kann man anschließend die Größe der einzelnen Banden bestimmen. Das aufgelöste Gel wird in einen Gelträger gegossen, ein Taschenkamm für die spätere Befüllung eingesetzt und zum Erhärten 30 auskühlen gelassen. Vor dem Befüllen der Taschen wird die Kammer mit TAE-Puffer befüllt, bis das Gel vollständig von Flüssigkeit bedeckt ist.

Zu den fertigen PCR-Proben werden jeweils 5 μ l Orange G hinzupipettiert, eine glyzerolhaltige Farbstoff-Lösung, die die Dichte der DNA-Probe erhöht und verhindert, dass sich die Probe mit dem überstehenden Puffer vermischt. Die Proben werden in die Geltaschen pipettiert, die

Kammer geschlossen und eine Spannung von 120-160 V angelegt. Im Anschluss können im Gel unter UV-Licht die Banden sichtbar gemacht und dokumentiert werden (Geldoc, Bio-Rad Laboratories GmbH).

DNA-Isolierung aus einem Agarose-Gel

Nachdem die DNA durch die Gelelektrophorese in einzelne Banden aufgetrennt wurde, ist es möglich, sie für Folgeversuche wieder aus dem Gel zu isolieren, damit sie wieder in Lösung vorliegt. Hierfür wird die betreffende Bande unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss erfolgt die Auflösung des Gels und die Isolierung der DNA mit Hilfe des Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kits unter Befolgung der beiliegenden Anleitung.

Kurz: Die herausgeschnittenen Gelwürfel werden gewogen und anschließend die dreifache Menge an ADB-Puffer hinzugegeben. Im Heizblock wird der Agaroseblock bei 55°C mindestens 10 min gelöst, bis eine klare Flüssigkeit vorhanden ist und keine Gelreste mehr zu sehen sind. Im Folgenden werden durch verschiedene Wasch- und Zentrifugationsschritte an einer Säulenmatrix das Gel und weitere Verunreinigungen herausgewaschen, bis schließlich die DNA mit Nuklease-freiem H₂O eluiert werden kann.

3.2.5 RT-qPCR-Analyse

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) ist eine Methode, die zum Nachweis und zur Quantifizierung von Nukleinsäuren verwendet wird. Bei der RT-qPCR erfolgt dieser Versuch mit RNA, die zuvor von der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben wird. Für diesen Versuch wurde das CFX Connect™ Real-Time System von Bio-Rad benutzt.

Bei diesem Versuch wird die sondenbasierte (probe based) Form der qPCR verwendet, welche es im Gegensatz zur farbstoffbasierten Methode ermöglicht, dass in einer Probe mehrere Targets gleichzeitig quantifiziert werden.

Die zu messenden Nukleinsäuresequenzen werden mit einer Hydrolysesonde versehen, die komplementär zur Zielsequenz ist. Diese Sonde trägt einen Reporter-Fluorophor am 5'- und einen Quencher am 3'-Ende und bildet somit ein kurzes Oligonukleotid. Der Quencher unterdrückt zunächst die Fluoreszenz der Sonde. Das Signal kommt nun dadurch zustande, dass während des PCR-Zyklus die Sonde von der verwendeten Polymerase hydrolysiert wird. Der Quencher wird von dem Reporter-Fluorophor entfernt, sodass er diesen nicht mehr hemmen kann. Daher kommt es zu einer Fluoreszenz.

Durch die Vervielfältigung der DNA mittels PCR wächst die Fluoreszenz somit proportional zur DNA-Menge an, was in Echtzeit gemessen werden kann. Der Versuch diente dazu, die Menge des Ziel-Gens in der RNA, die vorher durch die RNA-Isolierung aus den Meerschweinchengeweben aufgearbeitet wird, in den unterschiedlichen Geweben herauszufinden. Hierfür wird das Gen *MXRA5* in Relation zu *ACTB* gesetzt, welches quasi ubiquitär in den unterschiedlichen Geweben vorkommt. Für den Versuch finden zwei verschiedene Farbstoffe Verwendung; FAM für *MXRA5* und HEX für *ACTB*. Es wird ein Mastermix (2x MM Luna, NEB), den beiden Farb-Assays und einem Enzym erstellt und jeweils 64 µl in ein Eppi vorgelegt. Zu diesem Mastermix werden 3 µl RNA-Probe hinzugegeben. Das Gemisch wird anschließend als Triplet à 20 µl auf eine 96-well-Platte pipettiert. Die Platte wird in den Thermocycler gestellt und ein versuchsoptimiertes Programm, welches 40 PCR-Zyklen enthält, eingestellt.

Anfangs ist für 10 min auf einer konstanten Temperatur von 55°C die Reverse Transkriptase aktiv, um die RNA in DNA umzuschreiben. Danach wird analog zur PCR-Reaktion (s.o.) mit Hilfe einer Erhöhung der Temperatur auf 95°C die doppelsträngige DNA in Einzelstränge aufgespalten, woraufhin sich anschließend bei 60°C Primer anlagern können und die Amplifikation stattfinden kann, was zur Verdopplung der DNA mit jedem Schritt führt. Proportional dazu wächst auch die Fluoreszenz an, die dann in Echtzeit ermittelt werden kann. Da zu Beginn der Reaktion erst wenig DNA quantifiziert ist, ist in der Fluoreszenz kaum ein Wert zu messen. Mit fortschreitender Zykluszahl steigt das Signal zunächst sehr langsam an und ab einem bestimmten Zyklus kommt es zu einem nahezu exponentiellen Anstieg mit einem pseudolinearen Bereich, bevor es sich dann am Schluss wieder einem Grenzwert ohne weiteren Anstieg annähert.

Interessant für die Auswertung ist hierbei der pseudolineare Bereich, bei dem es zum größten Anstieg der zu messenden DNA-Menge kommt. Dieser Wert des *MXRA5*-Gens wird in Relation zum Referenzwert von *ACTB* gesetzt, wodurch man den Anteil an *MXRA5* in den einzelnen Geweben bestimmen kann.

Die Ergebnisse wurden via Excel ausgewertet.

3.2.6 Klonierung (Manipulation von DNA)

Um die Expressionsvektoren mit dem zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt in die Zellkultur zu bringen, müssen diese vorher in Kolonien kompetenter Bakterien vermehrt werden. Dies dient dazu, zunächst eine geeignete Menge an DNA-Material zu besitzen, welche erst zur Sequenzierung an das Max Planck Institut für Experimentelle Medizin verschickt wird und anschließend in der Zellkultur zur Transfektion Verwendung finden kann. Die Sequenzierung dient der Identifikation und Beschreibung des Gens, ob sämtliche vorausgegangen

Amplifikationsprozesse und Manipulationen ohne Effekte auf die Nukelinsäuresequenz gewesen sind.

Grundlegend ist wichtig, dass die Klonierung in einer Bakterienkultur kompetenter *E. coli*-Bakterien abläuft, wofür zirkuläre Plasmide für die Vervielfältigung Verwendung finden. Diese Plasmide besitzen verschiedene essenzielle Eigenschaften, wie einen Replikationsursprung, an welchem die Replikation der DNA startet, oder auch gewisse Sequenzen, die Resistenzen gegen Antibiotika besitzen. Diese Antibiotikaresistenz macht man sich für das selektive Wachstum auf antibiotikahaltigen Agarplatten zu Nutze. Entscheidend für die Klonierung ist aber noch die Anwesenheit gewisser Polylinker im Plasmid, an welche man die zu klonierende DNA anbinden kann. Es wird durch verschiedene Vorgänge die DNA in ein Plasmid eingebracht, das dann in den Bakterien vervielfältigt werden kann.

Anzucht der Bakterien

Die verwendeten kompetenten Bakterien aus dem *E. coli*-Stamm besitzen eine Ampicillin-Resistenz. Daher werden die zum Wachstum verwendeten Agarböden und LB-Medien mit Ampicillin versehen, um die Selektivität der Plasmid-beladenen Bakterien zu gewährleisten und das Wachstum anderer Kolonien zu unterdrücken.

Auf den Agarplatten der Kolonien, die mit dem pRACE-Vektor kloniert werden, können zusätzlich zur besseren Selektion 50 µl IPTG und 50 µl X-Gal ausgestrichen werden. Diese Stoffe bewirken eine Blaufärbung der Kolonien, in welche der Vektor nicht erfolgreich eingebaut wurde (Blau-Weiß-Selektion).

Transformation

Für die einzelnen Genabschnitte werden geeignete Primer bestimmt, mit deren Hilfe mittels PCR die betreffende Genregion vervielfältigt wird. Die fertigen PCR-Proben werden wie oben beschrieben auf ein Gel zur Agarose-Gelelektrophorese aufgetragen, und die jeweiligen Banden ausgeschnitten.

Die DNA wird im Anschluss aus dem Gel isoliert (Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit) und deren Konzentration bestimmt. Danach wird sie in einen Vektor für die anschließende Transformation in die Bakterienkultur eingebracht und zu einem Mastermix gegeben. Der fertige Vektor wird nach Befolgen des Transformationsprotokolls für Stellar™ Competent Cells in die Bakterienkultur integriert. Hierzu werden die Proben in die flüssige Bakterienkultur pipettiert und zunächst auf Eis ruhen gelassen. Entscheidend für die „Integration“ ist der nächste Schritt, der Hitzeschock, bei dem die Bakterien für 30-45 sek. in ein 42°C warmes Wasserbad gestellt werden. Dies dient dazu, die Bakterienhülle kurzfristig durchlässig für die

einzubringende DNA werden zu lassen. Durch ein darauffolgendes Abkühlen auf Eis soll sich die Membran wieder verschließen. Der Kultur wird SOC Medium hinzugefügt, welches den Bakterien eine optimale Nährumgebung bietet. Das Gemisch wird schüttelnd für eine Stunde bei 37°C Raumtemperatur inkubiert. Als letzter Schritt werden die Bakterien auf einer Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C RT inkubiert.

Nachdem die Bakterienkolonien bei 37°C über Nacht auf der Agarplatte gewachsen sind, werden ausgewählte Kolonien mit einer Pipettenspitze isoliert und in 3 ml LB-Medium, das mit 3 µl Ampicillin versetzt ist, gegeben. Dies wird erneut bei 37°C über Nacht schüttelnd in den Inkubator gestellt. Nun kann am Folgetag ein Bakterienwachstum festgestellt werden, wenn die Flüssigkeit trüb geworden ist.

Aus der Flüssigkultur wird im Folgenden mit Hilfe des Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research) die Plasmid-DNA aufgereinigt und deren Konzentration mittels bestimmt.

Restriktionsspaltung

Die Methode wird genutzt, um festzustellen, ob in den Klonierungsvorgängen die Gensequenz korrekt in den Vektor eingebaut worden ist. Hierfür werden verschiedene Restriktionsspaltungsenzyme verwendet, die nur dann zu einer Spaltung in bestimmte Bruchstücke führen, wenn die Sequenz richtig vorliegt.

Es wird ein Mastermix mit CutSmart Puffer und den Enzymen (New England BioLabs, Darmstadt) angesetzt, wozu eine geringe Menge (etwa 2 µl) Mini-DNA hinzupipettiert wird. Diese Mischung muss nun im Wasserbad bei 37°C für eine Stunde inkubieren und kann im Anschluss auf ein Gel zur Agarosegelelektrophorese aufgetragen werden. Nach dem Versuch kann anhand der Bandenaufteilung im Gel untersucht werden, ob die Enzyme an der richtigen Stelle im Vektor angegriffen haben.

3.2.7 Zellkultur

Um die Wirksamkeit eines vorhandenen Antikörpers gegen ein Epitop auf Exon 7 des Gens *MXRA5* testen zu können, ist es von Vorteil, wenn dieses Epitop in einer großen Menge vorliegt. Ein bewährtes Mittel zur Vervielfältigung des vom Genabschnitt kodierten Proteinteils ist die Zellkultur, bei welcher das Exon in eine menschliche Zelllinie eingebracht und von diesen im Folgenden vermehrt produziert wird.

Hierfür können verschiedene für die Laborarbeit etablierte Zellstämme verwendet werden, wobei für diesen Versuch eine Zelllinie aus dem Stamm der HEK-Zellen (Human Embryonic Kidney) herangezogen wurde, und zwar HEK293-Zellen. Abzugrenzen davon sind die

HEK293T-Zellen, die zusätzlich mit einem SV40 large-T-Antigen transfiziert sind, was für die schnellere Produktion gedacht ist, da die Zellen schneller wachsen und nicht bei Kontakt im Medium ihr Wachstum einschränken. Somit wird das Medium auch schneller verbraucht und die Zellkultur muss häufig gesplittet werden. Da dies nicht essenziell für den Versuch ist, werden die „untransfizierten“ HEK293-Zellen verwendet, welche das Wachstum der Kultur bei Kontakt und zu eng besetztem Nährmedium stoppen und somit langsamer wachsen. Diese Vorgehensweise verspricht eine einfachere Handhabung durch weniger enge Kontrollen. Außerdem ist die Transfektion mit diesem Zellstamm vielversprechend, da er sich gut transfizieren lässt.

Die Zellen in der Zellkultur dienen lediglich als Bioreaktoren und „Produktionsstätten“, weshalb die Zellmorphologie auch nicht weiter interessant ist und nur darauf geachtet wird, dass sie das erwünschte Protein herstellen.

Als Wachstumsmedium wird fetales Kälberserum (FCS) verwendet, das für ein gutes Milieu zum Zellwachstum sorgt. Die genaue Zusammensetzung hierfür ist nicht vollständig bekannt. Zu dem FCS wird Anti-Anti hinzugefügt, wodurch durch die bakterizide und fungizide Wirkung des Stoffs mögliche Fehlbesiedlungen des Nährmediums ausgeschlossen werden.

Zur Splittung der Zellkultur und Aufteilung auf mehrere Kulturflaschen für das weitere Wachstum, wird Trypsin verwendet. Trypsin ist als Enzym in der Lage Proteine zu spalten, was dazu dient Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte aufzubrechen, wodurch die Zellen in der Kulturflasche mobilisiert werden und im Folgenden neu ausgesäht werden können. Die Proteine unterliegen einer gewissen Halbwertszeit und werden daher regeneriert und können sich wieder nachbilden. Dieser als Trypsinverdau bezeichnete Vorgang dauert etwa 5 min an und kann durch die Zugabe von neuem Nährmedium unterbrochen werden.

Lipofectamin-Transfektion

Mit Hilfe der Lipofectamin-Transfektion werden die DNA-Bestandteile, welche in der Bakterienkultur kloniert wurden, in die HEK293-Zellen der Zellkultur eingebracht, um dort für die folgende Antikörper-Testung vervielfältigt zu werden. Dies geschieht unter Befolgung des Protokolls für „Lipofectamine 2000 Transfection for HEK293 cells“.

Die DNA-Proben werden mit Optimem und Lipofectamin 2000 vermischt und inkubiert, was eine bessere Integration in die Zellen bewirken soll. Anschließend wird das Gemisch tröpfchenweise auf die Zellkultur verteilt und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Parallel dazu wird jeweils eine Negativkontrolle der DNA-Proben ohne Lipofectamine 2000 und in beiden Fällen ein Wildtyp ohne integrierte DNA-Bestandteile inkubiert.

Nach weiteren 48 h können die Zellen für Folgeversuche verwendet werden.

3.2.8 Western-Blot

SDS-Gelelektrophorese

Vorbereitung der Proben:

Um die Proben in der Gelelektrophorese auftrennen zu können, müssen sie in einen SDS-Laufpuffer überführt werden. Hierfür wird zunächst der vorliegende sechsfach SDS-Laufpuffer zu einem Zweifachpuffer verdünnt, indem 400 µl Puffer in 800 µl H₂O gegeben werden. Die HEK293-Zellen werden nach dem „Ernten“ zweimal mit PBS gewaschen, um die FCS-Proteine aus dem Wachstumsmedium zu entfernen, sodass die Zellen ohne Verunreinigung vorliegen, und im Anschluss weggefroren. Vor dem Western-Blot werden sie aus dem -80°C Kühlfach entnommen und mit jeweils 200 µl des Laufpuffers versetzt. Das Gemisch wird mit einem Rührspatel vom Plattenboden abgerieben, in ein neues 1,5 ml Eppi überführt und durch kurzes Anzentrifugieren sedimentiert. Im Anschluss wird zur Ultraschall-Fragmentation der DNA das Gemisch für 10 sek. bei 50% Leistung sonifiziert. Zuletzt werden noch 100 µl H₂O hinzugefügt und die Proben bis zur SDS-Gelelektrophorese bei -80°C weggefroren.

Gießen des SDS-Gels:

Für die SDS-Gelelektrophorese müssen zuvor die Gele gegossen werden, die sich jeweils aus einem Sammel- und einem Trenngel zusammensetzen. Die Glasplatten, zwischen denen sich das Gel befindet, werden in eine passende Vorrichtung eingespannt. Das Trenngel wird gegossen und bis zur Markierung in den Zwischenraum der Platten gefüllt. Hierfür wird eine geeignete Gelkonzentration in Abhängigkeit der Größe des zu bestimmenden Proteins ausgewählt (in diesem Fall 10%) und nach dem Rezept für Trenngele bereitet. Der restliche Bereich über der Markierung, der als Reservoir für das Sammelgel dient, wird mit Ethanol aufgefüllt, um eine gerade Begrenzung der Trenngels während des Polymerisierungsprozesses ohne Luftblasen zu gewährleisten.

Nach Erhärten des Trenngels wird das Sammelgels anstelle des Ethanols in die Kammer gegossen und ein Kamm eingesetzt, der für die Aussparung sorgt, in die beim späteren Versuch die Proben pipettiert werden können.

Die fertigen Gele können bis zum Versuchstag innerhalb der folgenden Tage in feuchte Tücher eingeschlagen bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden.

Durchführung des Western-Blots

Die weggefrorenen Proben werden aus dem Kühlfach entnommen, jeweils 80 µl in ein neues Reagenzgefäß überführt und für 10 min bei 95°C im Heizblock erhitzt. Die vorbereiteten Gele

werden mitsamt den Glasplatten in die Blotting Kammer des Mini-PROTEAN® Tetra System der Firma Bio-Rad eingespannt. 16 µl der Proben werden in die Gelkammern pipettiert, die Kammer mit SDS-Laufpuffer aufgefüllt und für ca. 1 h ein Strom zwischen 60-80 mA angelegt.

Nach Auftrennung mittels Gelelektrophorese werden die Sammelgele von den Glasplatten abgelöst und unter stetigem Befeuchten des Systems in eine Vorrichtung zur Übertragung auf die Membran gespannt. Hierbei ist auf die richtige Orientierung des Gels zur Membran zu achten. Nach Platzierung in der Blotting Kammer, wird diese mit SDS-Transferpuffer aufgefüllt und unter Rühren (mittels Rührfisch) für 2 h ein Strom von 250 mA angelegt. Um einer Erwärmung des Systems entgegenzuwirken, wird die Kammer noch mit einem Kühlakku gekühlt.

Nach der Übertragung auf die Membranen, werden diese aus der Vorrichtung entnommen und die Banden kurzfristig mit Ponceau-Lösung sichtbar gemacht, wodurch die erfolgreiche Übertragung vom Gel überprüft werden kann.

In der Zwischenzeit wird eine Lösung aus 5 g Milchpulver und 100 ml TBST-Puffer vorbereitet, nach Abwaschen der Ponceau-Lösung auf die Membranen gegeben und für 1 h schwenkend inkubiert. Die Milchproteine dieser Lösung besetzen die übrigen Bindestellen auf der Membran, um Verunreinigungen zu vermeiden.

Nachfolgend werden die Membranen in Folien eingeschweißt und 2 ml Milchpulverlösung, die mit dem primären *MXRA5*-Antikörper versetzt ist, hinzugefügt. Die Membranen werden mit dem Antikörper über Nacht schüttelnd inkubiert.

Der Nachweis über die Funktion der Antikörperbindung erfolgt durch die ECL-Reaktion (enhanced chemiluminescence). Hierzu werden die Membranen am nächsten Tag aus der Folie entnommen und dreimal für 10 min mit TBST-Puffer gewaschen. Zur weiteren Bearbeitung werden sie erneut mit 20 ml Milchpulverlösung bedeckt und 1 µl des sekundären Antikörpers POX-rabbit (Peroxidase-gekoppelt) hinzupipettiert. Die Inkubation dauert schüttelnd 1,5 h und danach erfolgen drei weitere Waschschrte für jeweils 10 min in TBST-Puffer.

Wenn die Antikörper-Reaktion nun erfolgreich ist, kann der sekundäre Antikörper durch eine Substratlösung über Chemilumineszenz nachgewiesen werden.

3.2.9 Histologische Färbungen von Paraffinschnitten

Entparaffinieren der histologischen Schnitte

Die Schnitte der in Paraffin eingebetteten Organe von Meerschweinchen und Mensch werden mittels einer speziellen Alkoholreihe vom Paraffin befreit, um im Anschluss durch verschiedene Färbeschritte mikroskopisch beurteilt werden zu können. Paraffin ist ein Gemisch aus Alkanen und aufgrund seiner wachsartigen Konsistenz und guten Schnittfähigkeit sehr gut zur Konservierung anatomischer Präparate geeignet.

Die Schnitte werden zunächst dreimal für 5 min in Xylol gestellt und anschließend mit einer absteigenden Alkoholreihe inkubiert. Dies erfolgt für jeweils 2 min in Färbeküvetten, die 2-Propanol in absteigender Konzentration beinhalten, und zwar 99%, 80% und 70%. Zuletzt werden sie gründlich mit H₂O bidest abgespült und sind bereit für die Färbeschritte, wobei darauf zu achten ist, dass die Schnitte immer mit Flüssigkeit bedeckt sein sollten, um nicht auszutrocknen.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine Routinemethode, die zur Differenzierung verschiedener Gewebestrukturen im histologischen Bild dient.

Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff aus dem Blauholzbaum, mit dem aufgrund seines basischen Charakters besonders saure/basophile Bestandteile des Präparats, wie bspw. Zellkerne, Ribosomen oder das raue endoplasmatische Retikulum, blau angefärbt werden können.

Eosin hingegen wird synthetisch hergestellt und ist ein saurer Farbstoff, der vor allem basische (eosinophile) Strukturen rötlich anfärbt.

Bei der Färbereaktion wird nun ein bestimmtes Protokoll, welches das Eintauchen in die Färbelösungen und anschließend eine aufsteigende Alkoholreihe beinhaltet. Die Schnitte werden anfangs ca. 9 min in Hämalan inkubiert und nach Spülschritten in H₂O, die die „Bläuung“ der basophilen Strukturen bewirken, für 45 sek. in Eosin gestellt. Zuletzt werden die Schnitte durch die aufsteigende Alkoholreihe bis 99% Isopropanol und dreimalige Inkubation in Xylol auf die Einbettung mit DePex vorbereitet.

Die Schnitte sind danach direkt bereit, um unter dem Mikroskop beurteilt zu werden.

Masson-Goldner-Trichrom-Färbung

Die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung ist besonders gut zur Darstellung des Bindegewebes geeignet, da dieses, in Abgrenzung zu den rotgefärbten Zellen, grün angefärbt wird. Bei dieser

Färbung wird nach der Gebrauchsanweisung des Masson-Goldner-Trichrom-Färbekit von Carl Roth (Karlsruhe) vorgegangen.

Zu Beginn werden die Zellkerne mittels Eisenhämatoxylin dunkel angefärbt. Dies ist nötig, da die Goldner-Lösungen wegen ihres sauren Charakters eine einfache Hämatoxylinfärbung wieder entfärben würden.

Im Anschluss an die Kernfärbung kommt es dann erst zur eigentlichen Trichrom-Färbung. Hierbei werden die Präparateschnitte nacheinander in den drei verschiedenen Goldner-Lösungen inkubiert und zwischen jedem Färbeschnitt für 30 sek. mit 1% Essigsäure gespült.

Goldner-Lösung I (Ponceau-Säurefuchsin) färbt mittels Ponceau die Muskulatur und das Zytoplasma rot an, während mit Säurefuchsin das Bindegewebe ebenfalls rot dargestellt wird. Die im Anschluss verwendete Goldner-Lösung II (Phosphorwolframsäure-Orange G) entfärbt das Bindegewebe durch die Phosphorwolframsäure wieder und färbt mit Orange G die Erythrozyten orange an. Zuletzt dient Goldner-Lösung III (Lichtgrün SF) dazu, das entfärbte Bindegewebe grün anzufärben.

Nach den Färbe- und Spülschritten werden die Schnitte für 2:30 min mit 1% Essigsäure ausgewaschen und analog zur HE-Färbung durch die aufsteigende Alkoholreihe bis 99% Isopropanol und dreimalige Inkubation in Xylol auf die Einbettung mit DePex vorbereitet.

3.2.10 Immunhistochemie/Immunfluoreszenz

Die Immunhistochemie ist eine Methode, mit der man bestimmte Proteine und andere Zellstrukturen durch immunchemische Bearbeitung sichtbar machen kann. Dies geschieht mittels Antikörpern, die Antigene auf der gesuchten Struktur erkennen und an diese binden können. In diesem Fall bindet der primäre *Mxra5*-Antikörper (Abbexa, UK) an ein Epitop, das von Exon 7 des Gens kodiert wird. Dieser primäre Antikörper aus dem Kaninchen kann nun von einem sekundären Antikörper erkannt werden, der an seinem F_C-Teil mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert vorliegt und somit mittels Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann. Dieser immundiagnostische Nachweis wird auch als Immunfluoreszenznachweis bezeichnet.

Die zu bearbeitenden Präparate werden zunächst entparaffiniert und in PBS-Puffer, der für ein optimales Milieu sorgt und vor Austrocknung schützt, gestellt.

Die Objektträger werden aus dem Puffer entnommen und die einzelnen Schnitte mit einem Fettstift umrandet, der eine Grenze bildet, sodass die Flüssigkeiten aus den folgenden Schritten nur über dem Präparat eine Kuppel bilden und sich nicht auf dem ganzen Objektträger ausbreiten und somit austrocknen können. Außerdem führt dieses Verfahren zur sparsamen Verwendung von Flüssigkeitsmengen. Anschließend werden die Schnitte mit einer

Blockierungslösung bedeckt, die dafür sorgt, dass unspezifische Bindungen abgesättigt und dadurch vermieden werden. Nach einstündiger Inkubation wird die Blockierungslösung abgesaugt und das Präparat mit PBS-Puffer gewaschen. Der Mxra5-Antikörper wird 1/3000 verdünnt, indem 1 µl Antikörper in 3 ml Carrier-Solution pipettiert wird, und jeweils ca. 80-100 µl der Lösung auf die Schnitte aufgetragen. Anschließend werden die Objektträger über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert.

Am Folgetag wird die Antikörper-Lösung abgesaugt und die Präparate dreimal für 5 min mit PBS-Puffer gewaschen. 2 µl des sekundären Antikörper Cy3 werden in 2 ml Carrier-Solution pipettiert, sodass eine Verdünnung von 1/1000 entsteht. Diese wird dann auf die Schnitte aufgetragen und für 1 h im Dunklen inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS-Puffer erfolgt eine 5-minütige Inkubation in DAPI-Lösung, einem Fluoreszenzfarbstoff, der speziell die Kerne anfärbt. Dieser wird ebenfalls zweimal mit PBS-Puffer gewaschen, die Präparate werden mit Mowiol unter einem Deckglas eingebettet und können mikroskopiert werden. Damit ein späteres Betrachten unter gleichen Bedingungen möglich ist, sollten die Präparate bei 4°C gelagert werden.

Optimierung der Immunhistochemie

Suppression des Hintergrunds durch TrueVIEW®:

Um in der Immunfluoreszenz das gesuchte Signal unter dem Mikroskop besser hervorzuheben, werden die Schnitte mit dem Vector® TrueVIEW® Autofluorescence Quenching Kit (Vector Laboratories, USA) behandelt, um Hintergrundfluoreszenzen im Präparat zu unterdrücken. Hierfür werden je gleiche Anteile Reagent A und B aus dem Kit zusammenpipettiert und für 10 sek. mittels Vortex vermischt. Danach wird noch ein Mengenäquivalent Reagent C hinzugefügt und erneut gevortext. Die Lösung wird auf die Präparate pipettiert und 5 min inkubiert.

Dieser Schritt erfolgt nach der sekundären Antikörper-Inkubation und vor der DAPI-Färbung und wird wie die zuvor beschriebenen Schritte ebenfalls mit zweimaligem Waschen in PBS-Puffer abgeschlossen.

Thermische Demaskierung:

Bei der Fixierung der zu untersuchenden Präparate soll durch das Fixans (z.B. Formaldehyd) der Verwesungsprozess gebremst werden. Hierbei werden sowohl die bakteriellen Proteine funktionell beeinträchtigt, als auch bestimmte Bindestellen und Proteine im Präparat blockiert, an welchen zerstörende Substanzen der Bakterien wie Proteinasen und RNasen u.a. angreifen können. Diese Bindestellen können für die Immunreaktion und Antigenität der

Gewebe von Bedeutung sein, sodass die Antikörper in der Immunhistochemie schwieriger oder gar nicht an die Zielepitope binden können.

Die Theorie dieser Methode beinhaltet, dass durch die thermische Behandlung in Citratpuffer, das Citrat diese Bindestellen „demaskiert“ und die Antigene besser präsentiert. Somit kann auch eine bessere Bindung der Antikörper an den freien Bindungsstellen erfolgen.

Um ein optimales Milieu für die Präparate herauszufinden, wird der Citratpuffer in verschiedenen pH-Konzentrationen (Testung mit pH3, pH6, und pH9) verwendet. Zunächst wird eine 1 molare Citratlösung mit 19,2 g Citronensäure ad 100 ml A. bidest hergestellt. Die einzelnen Citratpuffer werden dann mit 10 ml Citratlösung auf 1 l Puffer mit A. bidest aufgefüllt, um eine 10 mM Lösung zu erhalten. Die erwünschten pH-Werte werden am pH-Meter unter kontinuierlichem Rühren (mittels Rührfisch) durch Zugabe von HCl oder NaOH eingestellt.

Um eine Vergleichbarkeit zu erzielen, wird immer ein Schnitt des gleichen Präparats in eine Glasküvette gestellt, und die Küvette mit dem jeweiligen Citratpuffer aufgefüllt. Die Küvette wird mit Deckel in eine Glasschüssel gestellt, die mit ca. 700 ml Wasser gefüllt ist und in einer Mikrowelle bei maximaler Leistung zum Kochen gebracht. Im Anschluss werden die Schnitte bei Raumtemperatur 30 min abgekühlt und stehen danach für die weitere Bearbeitung in der Immunhistochemie bereit.

4. Resultate

Ziel dieser Arbeit war es, anhand der Versuchsreihe herauszufinden, ob das Meerschweinchen (*Cavia porcellus*) als mögliches Versuchstier zur Beschreibung von *MXRA5* in Frage kommt und somit mehr über dieses Gen und das kodierte Protein herausgefunden werden kann, da es in Maus und Ratte nicht ausgeprägt wird.

Die Reihenfolge der Versuche wurde so gewählt, dass zunächst die genomische DNA-Sequenz betrachtet wurde, um im Anschluss die RNA-Transkription zu untersuchen. Zuletzt wurde sich dann mit dem kodierten Protein in der Fluoreszenzmikroskopie beschäftigt. Außerdem erfolgte zu Beginn eine *in vitro*-Betrachtung des Gens, etwa mit Hilfe von Zellkulturen, um es später auch *in vivo* anhand der Gewebeschnitte von Meerschweinchen untersuchen zu können.

Das vorläufige Ziel der Arbeit bestand darin, die Sequenz des Gens in *C. porcellus* zu bestimmen, die Transkription in verschiedenen Geweben zu untersuchen und einen kommerziellen Antikörper zu validieren, der gegen humanes *MXRA5* hergestellt wurde. Im Anschluss wurde dieser auf seine potenzielle Wirkung gegen *MXRA5* von *C. porcellus* getestet.

4.1 Sequenzierung

Untersuchung zum Aufbau des Meerschweinchengens

Das Ziel dieses Versuchsschrittes war es, die genomische DNA, welche aus den Meerschweinchen-Blutproben gewonnen wurde, zu isolieren, bestimmte Genabschnitte mittels PCR zu amplifizieren, diese in der Bakterienkultur zu vervielfältigen und anschließend zu sequenzieren. Diese Sequenzierungsergebnisse erlauben im Folgenden ein Ableiten geeigneter Assays für eine sich anschließende qRT-PCR.

Da die kodierende Region des humanen *MXRA5* mit über 8 kb im Gesamten zu groß ist, um es erfolgsversprechend in Plasmide einzubauen, wurden Primer ausgewählt, die gezielt Abschnitte des Gens ablesen, welche dann später wieder zusammengesetzt werden können. Kleinere PCR-Produkte sind zudem in der Regel schneller und einfacher zu klonieren.

MXRA5 setzt sich im menschlichen Genom aus sieben Exons zusammen (NCBI Gene ID 25878), daher lag die Vermutung nahe, dass es beim Meerschweinchen ähnlich aufgebaut ist. Die Nummerierung der Exons ist im Folgenden von dem bekannten humanen Gen abgeleitet. Aus der Nachbarspezies *Cavia tschudii* ist die Sequenz der Exons vier bis sieben bekannt (St. Maxeiner, pers. Mitteilung), welche auch eine Ähnlichkeit zum menschlichen Gen aufweist. Abb. 4-1 zeigt einen groben Aufbau der bisher bekannten Gene.

Anhand dieser bekannten Sequenz wurden Primer für die Exons 5-7 so abgeleitet, dass sie an der richtigen Stelle im Gen des verwendeten Labormeerschweinchens (*C. porcellus*) ansetzen. Als Probe kam die genomische Meerschweinchen-DNA zum Einsatz, die vorher aus dem Meerschweinchen-Vollblut gewonnen wurde. Primer wurden so gewählt, dass sie eine Sequenz erkennen, welche im exonnahen Intronbereich des Gens liegt. Somit soll gewährleistet werden, dass das gesamte Exon jeweils miterfasst wird, da die Sequenzierung in der Regel erst 30 Basen nach dem Primeransatz beginnt und auswertbar wird.

Hierfür wurden die zuvor vermuteten Exons 1-4 zu einem gemeinsamen Teil zusammengefasst und die Exons 5, 6 und 7 jeweils separat betrachtet. Da in beiden Spezies, *C. porcellus* und *C. tschudii*, der Transkriptionsstart nicht bekannt ist, wurde die cDNA aus dem Gehirn benutzt, die zuvor aus RNA umgeschrieben wurde, um die Sequenz stromaufwärts von Exon 5 zu erfassen. Bei diesem Versuch findet die 5'RACE-PCR (**R**apid **A**mplification of **c**DNA **e**nds) Anwendung, welche anhand der cDNA die zu suchende mRNA bis zum Transkriptionsstart ermitteln soll.

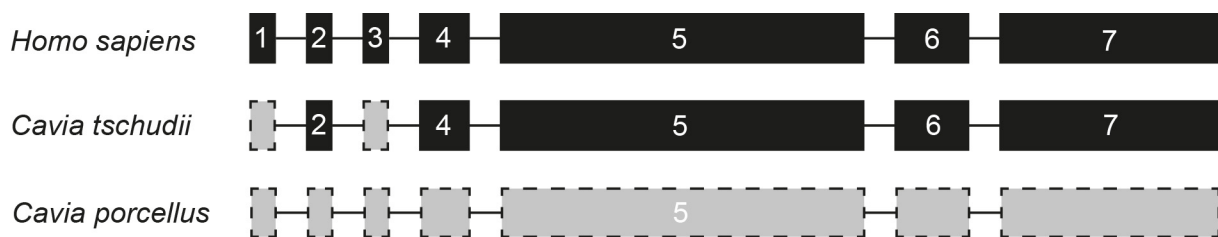


Abbildung 4-1: Schematischer Aufbau der Gene von Mensch, *Cavia tschudii* und *Cavia porcellus*

Die schwarzen nummerierten Kästen repräsentieren die Exons, deren Sequenz bereits bekannt ist, wobei die Nummerierung vom humanen Gen abgeleitet ist; in grau sind die bisher unbekanntes Exons dargestellt; bei *Cavia porcellus* ist Exon 5 dennoch nummeriert, da hiervon bereits ein Teil bekannt ist. Die Größe der Exons entspricht hierbei nicht ganz der Realität und soll nur die groben Größenunterschiede aufzeigen; zudem wurde die exakte Intronlänge ignoriert.

Mit Hilfe der PCR wurde der spezifische Abschnitt durch das jeweilige Primerpaar amplifiziert und vervielfältigt. Danach konnten die Genfragmente in der Agarose-Gelelektrophorese als Bande sichtbar gemacht werden. Anhand der Bandenposition war es bereits möglich, über die Größe des Fragments erste Rückschlüsse zu ziehen, ob die Primer an der richtigen Stelle tatsächlich das zu erwartende Fragment amplifiziert haben.

Anfangs fand der Q5-Mastermix (NEB) Anwendung und bei der PCR wurde ein Temperaturprofil mit den Stufen 58-62-68°C eingestellt. Unter diesen Bedingungen zeigten sich bei dem verwendeten Primerpaar 797/798 für Exon 6 bereits deutliche Banden in der Höhe von ca. 1 kb auf dem Gel (Abb. 4-2 (A)), was den Erwartungen entsprach. Somit konnte

diese Bande direkt ausgeschnitten und für die weiteren Versuche verwendet werden. Das Primerpaar 795/796 für Exon 7 führte bei einer Versuchswiederholung mit geringeren Temperaturstufen nur zu einer schwachen Bande bei 55°C (Abb. 4-2 (B)) (Anmerkung: alle Primersequenzen sind im Anhang aufgeführt).

Exon 5 wurde aufgrund seiner Größe von über 5 kb auf zwei überlappende Fragmente mit den Primerpaaren 799/800 und 801/802 aufgeteilt, für welche sich in diesem Versuchsaufbau jedoch im ersten Anlauf keine Banden zeigten. In den folgenden Versuchen wurde nun ein alternativ formulierter Mastermix verwendet, um ein möglicherweise besseres Ergebnis zu erzielen. Ein Mastermix von TaKaRa führte im Fall von Exon 7 bei Temperaturen zwischen 60-65°C zu sichtbaren Banden für weitere Verwendung. Aufgrund zunächst gut lokalisierter Banden für die Genfragmente von Exon 5 wurde zusätzlich versucht, diese beiden durch die Primerkombination 799/802 zu überbrücken, um somit das gesamte Exon 5 herzustellen.

Um Verunreinigungen oder DNA-Schädigungen durch UV-Bestrahlung zu vermeiden, wurden die passenden Banden vor der Bildaufnahme bereits ausgeschnitten. Mittels DNA-Recovery Kit wurde die DNA aus dem Gel isoliert und die Konzentration bestimmt.

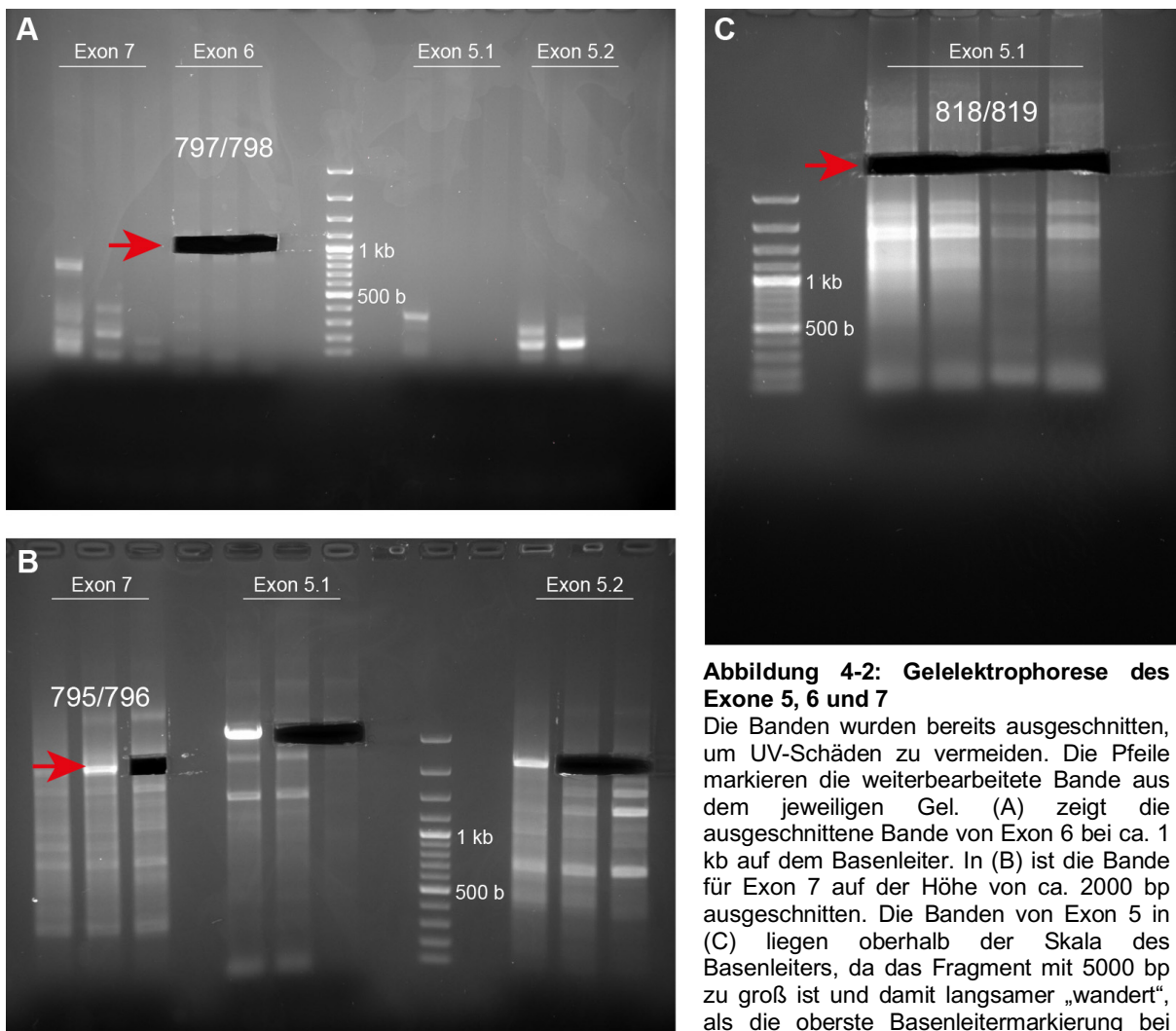


Abbildung 4-2: Gelelektrophorese des Exone 5, 6 und 7

Die Banden wurden bereits ausgeschnitten, um UV-Schäden zu vermeiden. Die Pfeile markieren die weiterbearbeitete Bande aus dem jeweiligen Gel. (A) zeigt die ausgeschnittene Bande von Exon 6 bei ca. 1 kb auf dem Basenleiter. In (B) ist die Bande für Exon 7 auf der Höhe von ca. 2000 bp ausgeschnitten. Die Banden von Exon 5 in (C) liegen oberhalb der Skala des Basenleiters, da das Fragment mit 5000 bp zu groß ist und damit langsamer „wandert“, als die oberste Basenleitermarkierung bei 3000 bp

Transformation und Vervielfältigung der DNA für die Sequenzierung

Mit Hilfe kompetenter *E. coli*-Bakterien wurden die DNA-Abschnitte für die folgende Sequenzierung vervielfältigt. Die DNA wurde in einen Vektor eingebracht, der als Plasmide in *E. coli* vervielfältigt werden konnte. Für das 5'RACE-Fragment kam hierfür der spezifische Vektor pRACE zum Einsatz, bei den übrigen Exons der Vektor pMini. Anschließend wurden die DNA-Fragmente, wie im Methodenteil beschrieben, in die Bakterienkolonie eingebracht.

Von den auf Agar gewachsenen Kolonien wurden einzelne isoliert und für das weitere Wachstum im flüssigen LB-Medium über Nacht inkubiert. Durch Zugabe von Ampicillin zu dem Medium wurde die Selektivität der Bakterien, durch das auf dem Plasmid kodierte Resistenzgen, gewährleistet. Aus den angezüchteten Bakterienklonen wurde eine sogenannte Mini-DNA zur qualitativen Analyse gewonnen. Hier wurde im Anschluss durch eine Restriktionsspaltung überprüft, ob die zu testende Sequenz korrekt in das Bakterienplasmid eingebaut wurde. Dabei werden solche Stellen im Plasmid gesucht, an welchen die Restriktionsenzyme nur dann spalten, wenn es zum Einbau der DNA gekommen ist. Durch eine folgende Agarose-Gelelektrophorese kann anhand der Größe der Restriktionsfragmente abgeschätzt werden, ob der Klonierungsschritt erfolgreich war. Eine weitere Methode zum Überprüfen des Einbaus in die Bakterienplasmide, ist die Kolonie-PCR. Dabei wird mit Q5-Mastermix eine direkte PCR der isolierten Bakterienkolonie durchgeführt, unter Verwendung von Primern, die spezifisch den vervielfältigten DNA-Abschnitt erkennen.

Nach erfolgreicher Testung wurde die Mini-DNA nun zur Sequenzierung verschickt. Es hat sich gezeigt, dass bei *Cavia porcellus* das beim Menschen beschriebene Exon 1 nicht existiert.

Da für Exon 5 bei der Sequenzierung kein zufriedenstellendes Ergebnis erreicht werden konnte, wurde die zuvor beschriebene TaKaRa-PCR erneut wiederholt, allerdings mit einem neuen Primerpaar 818/819 (Abb. 4-2 (C)). Diese Primer waren länger als die vorherigen und mit zwei Linker versehen, welche dazu dienen sollen, über homologe Assemblierung dieses PCR-Produkt in pRACE zu klonieren. Durch Teilsequenzierungen konnte nun die vollständige Sequenz von Exon 5 bestimmt werden. Abb. 4-3 zeigt schematisch die Primer, welche zur finalen Sequenz des Gens beigetragen haben.

Mit Hilfe der neu bestimmten Gensequenz von *MXRA5* bei *Cavia porcellus* bestand nun die Möglichkeit einen geeigneten Assay für die nachstehende qRT-PCR zu ermitteln.

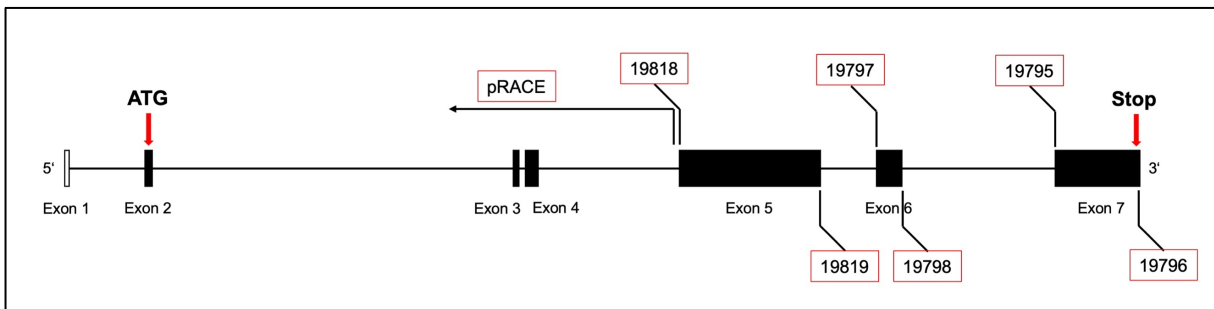


Abbildung 4-3: Darstellung des humanen MXRA5 mit den Primern für die jeweiligen Exons

Eingefügt wurden nur die Primer und deren Positionen, welche zu dem schlussendlich korrekten Ergebnis geführt hatten. Außerdem ist das humane MXRA5 dargestellt, da die Konstellation des Meerschweinchengens zu diesem Zeitpunkt noch unbekannt war und somit von der humanen Exonverteilung ausgegangen wurde.

4.2 Erstellen einer RNA-Bank der vorhandenen Meerschweinchen-Gewebe

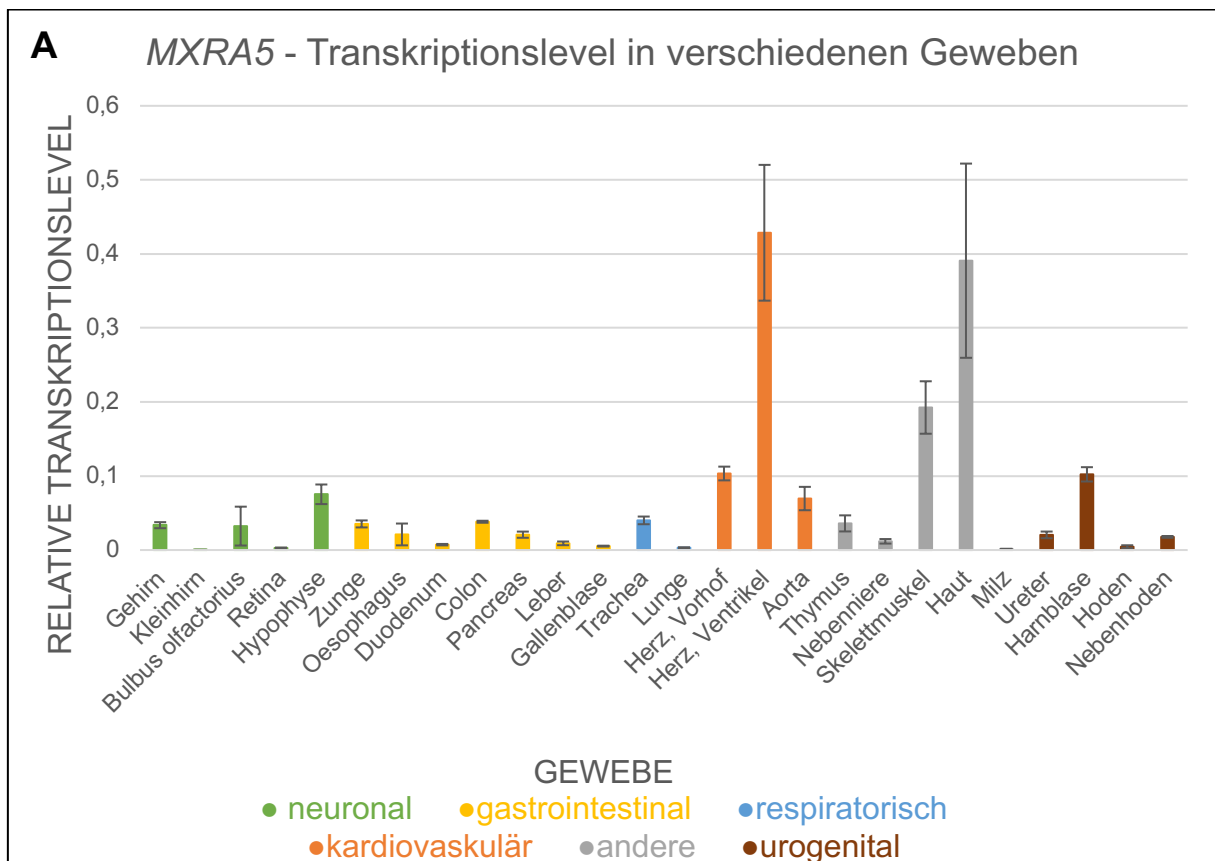
Im nächsten Schritt wurde untersucht, wie hoch die RNA-Transkription des zu erforschenden Gens *MXRA5* in den einzelnen Geweben des Meerschweinchens (*Cavia porcellus*) ist. Hierzu wurde mittels qRT-PCR eine Relation zum ubiquitär ausgeprägten Gen, *ACTB* (beta-Aktin, „Haushaltsgen“), vorgenommen.

Die RNA einzelner Gewebe lag bereits vor (von St. Maxeiner zur Verfügung gestellt), ein weiterer Teil musste noch aufgearbeitet werden, um die RNA aus den zuvor eingefrorenen Geweben zu isolieren. Diese Meerschweinchen-RNA wurde zunächst nach dem Direct-zol™ RNA Miniprep Plus Kit (Zymo Research, USA) aus den in TriReagent homogenisierten Geweben gewonnen, revers transkribiert und mittels qPCR quantifiziert. Danach wurde die RNA durch ein säulenbasiertes Auswaschverfahren aus den homogenisierten Proben gewonnen und in einer Matrix aufgefangen. Um DNA-Verunreinigungen zu vermeiden, ist die Säulenmatrix zur Verdauung der genomischen DNA mit einer DNase behandelt worden. Bei der qRT-PCR sind zusätzlich intronüberspannende Assays zum Einsatz gekommen, damit nur die cDNA repliziert und genomische Kontaminationen außer Acht gelassen werden konnten. Speziell im Fall von *MXRA5* wurde ein Assay verwendet, welches die Übergänge der Exons 4 und 5 darstellt.

Bei nahezu allen Geweben, mit Ausnahme der Nervengewebe, wurde die Probenanzahl n=4 gewählt, da erst ab n=3 eine statistische Auswertung mit Fehlerbalken möglich ist. Bei den Nervengeweben waren es n=3, da das Gehirn eines Meerschweinchens separat in die einzelnen Hirnregionen unterteilt wurde (Abb. 4-4.2).

Hierbei zeigte sich zunächst einmal, dass *MXRA5* in jedem untersuchten Gewebe vorhanden ist, jedoch in sehr unterschiedlicher Ausprägung. Wenn auch die Transkription in den Nervengewebe wie Kleinhirn oder Retina eher gering war, so zeigten sich bei einigen anderen, strukturell kompakteren Geweben wie Haut, Skelettmuskulatur oder auch Herzventrikel bedeutend höhere Werte, die bis auf 40% der *ACTB*-Transkription heranreichten (Abb. 4-4.1 (A)). Am markantesten jedoch waren die RNA-Werte in der Niere, die im Schnitt bei allen vier getesteten Tieren das 14-fache der *ACTB*-Konzentration aufzeigten (Abb. 4-4.1 (B)).

Anhand dieser Ergebnisse kann man die verschiedenen Gewebe bezüglich ihrer *MXRA5*-Transkription untereinander vergleichen und eventuelle Rückschlüsse auf die Bedeutung der Unterschiede ziehen. Da dieser Versuch jedoch lediglich die Transkriptmenge, also quantitative RNA, in den verschiedenen Geweben angibt, muss im Folgenden auch untersucht werden, ob eine Korrelation zwischen der Transkript- und der Proteinmenge existiert.



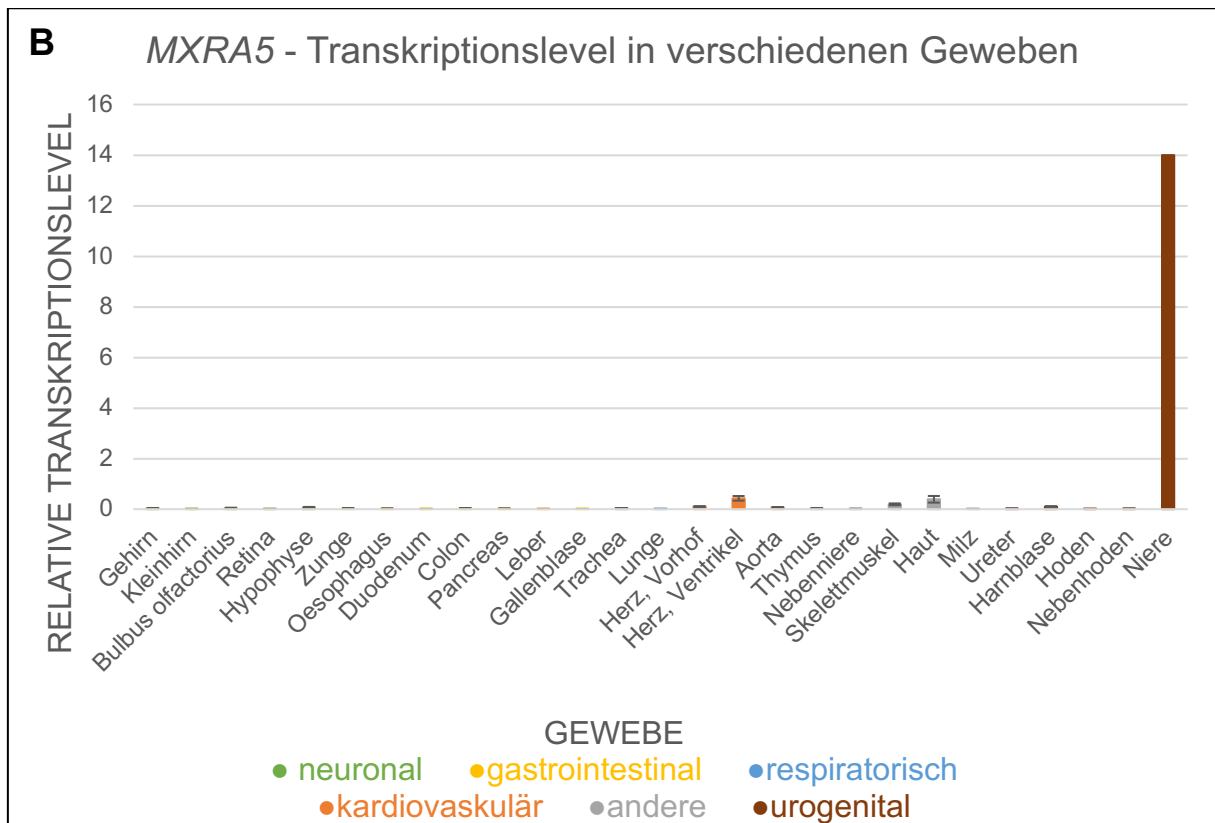


Abbildung 4-4.1: Die RNA-Transkriptmenge von *MXRA5* im relativen Verhältnis zu der von *ACTB*

(A) zeigt die Werte aller untersuchter Organe mit Ausnahme der Niere; zusätzlich wurde die Standardabweichung eingefügt, welche sich durch die Arbeit an vier verschiedenen Tieren ergeben hat. Diagramm (B) zeigt die gleichen Werte unter Hinzunahme der Niere; zu erkennen ist, dass mit Ausnahme von wenigen Geweben wie Herzventrikel oder Haut kaum eine Aussage über die Transkriptmenge möglich ist, da besagte aus der Niere alle anderen bei weitem übertragt.

Die einzelnen Strukturen des zentralen Nervensystems (ZNS), darunter Cortex, Hippocampus, Thalamus, Hirnstamm und Striatum, wurden nur bei einem der vier Versuchstiere separat entnommen. Somit sind diese Ergebnisse nicht ausreichend valide für eine statistische Betrachtung, werden daher gesondert aufgeführt, da sie deutliche Unterschiede aufweisen.

Abb. 4-4.2 zeigt, dass in der Hirnrinde (Cortex) die RNA-Transkriptmenge in der qRT-PCR am höchsten war, gefolgt von Hippocampus und Striatum. Im Thalamus und Hirnstamm hingegen konnte man kaum *MXRA5*-Transkripte nachweisen.

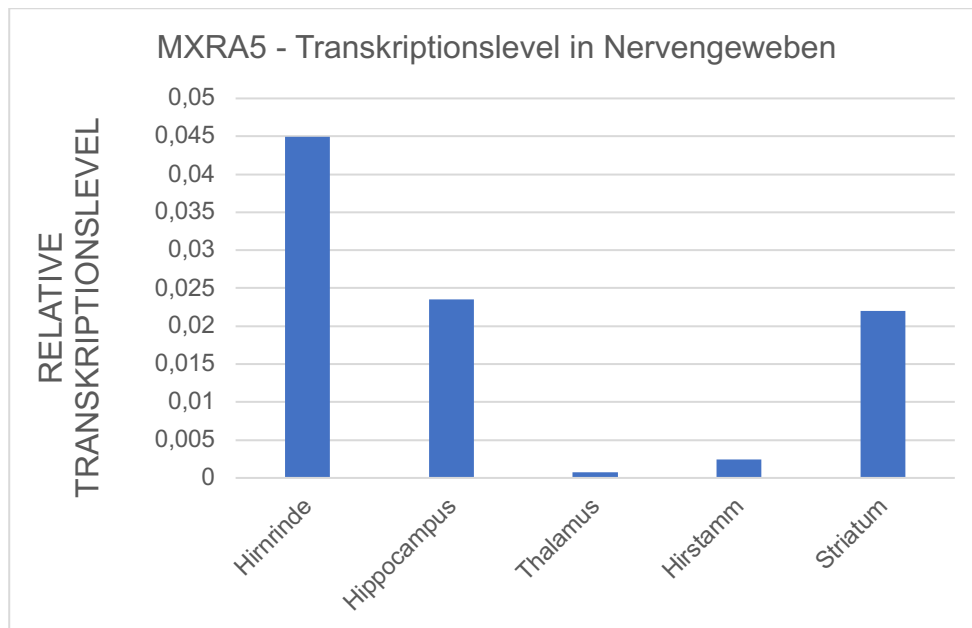


Abbildung 4-4.2 Die RNA-Transkriptmenge in neuronalen Geweben

Anhand der Skalierung des relativen Transkriptlevels ist im Vergleich zu den Organen aus Abb. 4-4.1 zu erkennen, dass dieses deutlich geringer ausfällt. Lediglich bei Cortex zeigt sich eine höhere Expression, die jedoch in Bezug auf die weiteren Gewebe (s.o.) eher zu vernachlässigen ist.

4.3 Herstellung der Epitope in der Zellkultur zur Validierung des Antikörpers

Im Vorfeld des Versuchs wurde ein kommerzieller Antikörper der Firma Abbexa, der gegen das humane MXRA5 generiert wurde, ausgesucht. Ziel der Untersuchung in den anschließenden Zellkulturexperimenten war es, nun einerseits die Qualität des Antikörpers zu testen und andererseits, ob er auch das potenzielle Protein des Meerschweinchen in selbigem Gewebe erkennen könnte. Besagter Antikörper richtet sich gegen einen Teil des Proteins, welcher von Exon 7 des Gens kodiert wird und in beiden Spezies eine gewisse Ähnlichkeit aufweist. Daraus wurden Genabschnitte mit PCR amplifiziert, in Testvektoren kloniert, um sie in der Zellkultur zu exprimieren, jeweils für das menschliche und für das Meerschweinchen-Protein.

Die Testvektoren wurden in humane HEK-293-Zellkulturen transfiziert, damit diese den Teil des Proteins separat herstellen, an welchen der Antikörper bindet, um ihn zu vervielfältigen. Dies diente dazu, dass das vom Antikörper erkannte Epitop somit erst einmal im Überschuss präsentiert werden kann, was zur Optimierung der Immundetektionsbedingungen eine günstigere Voraussetzung gewährleistet.

Nach der nötigen Inkubationszeit wurden die Proteine aus den Zellen gewonnen, mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Membran transferiert (Blotting), bevor diese im Immunoblot dem Antikörper präsentiert wurde. Es hat sich in der Auswertung eine deutliche Bande im Bereich für das Epitop auf Exon 7 gezeigt, wodurch deutlich wird, dass der

Antikörper sowohl im Menschen als auch im Meerschweinchen zum Nachweis von MXRA5 Protein genutzt werden kann.

Mittels Immunoblot wird getestet, ob der vorhandene Antikörper die Proteinepitope, die durch die Zellkultur hergestellt wurden, erkennt und an diese bindet. Die Plasmide FS 12.7, für das humane MXRA5, und FS 14.5, welches das MXRA5-Epitop des Meerschweinchens kodiert, wurden in der HEK-Kultur zuvor vervielfältigt. Die Testung erfolgt einerseits mit einem Antikörper gegen GFP, 1/2000 verdünnt, und andererseits mit dem MXRA5-Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen. Der anti-GFP-Antikörper mVenus findet Anwendung, da das MXRA5 Epitop-getaggt wurde, wodurch dessen Ausprägung zusätzlich überprüft werden kann. Hierbei wird den Teilsequenzen der MXRA5-Proteine, welche durch den Antikörper gegen MXRA5 erkannt werden sollen, ein Epitop angeheftet, das von GFP-Antikörpern erkannt wird. Somit lässt sich anhand der Position der jeweiligen Banden überprüfen, ob diese sich auf derselben Höhe befinden, also das richtige Epitop durch den Antikörper erkannt wurde.

Beim ersten Durchgang wurde der MXRA5-Antikörper 1/1000 und 1/4000 verdünnt und zusätzlich die Hälfte der Proben vor dem Immunoblot auf 95°C im Heizblock erhitzt. Damit wird versucht, sich an die optimalen Versuchsbedingungen heranzutasten. Die Milchpulverlösung, in welcher die Membranen mit dem Antikörper inkubieren und zwischendurch inkubiert werden, hat die Aufgabe mit den in ihr vorhandenen Milchproteinen die übrigen Bindestellen auf den Membranen abzusättigen, um somit unspezifische Bindungen zu vermeiden.

Nach der Inkubation mit dem primären erfolgt die Inkubation mit dem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper, welcher an den F_C-IgG-Anteil des MXRA5-Antikörpers (bzw. GFP-Antikörper) bindet und mittels Chemilumineszenz dargestellt werden kann. Es entstehen deutlich ausgeprägte Banden (Abb. 4-5 (A)), die sich in der richtigen Höhe für das Fragment, knapp oberhalb der 50 kD Bande (erwartetes Molekulargewicht ca. 56 kDa für Mensch und Meerschweinchen) des Markers, befinden, wodurch die erste Antikörper-Testung erfolgreich ist. Das parallel zu erkennende anti-GFP-Signal, dient der Absicherung, dass es sich um das Fusionsprotein mit mVenus handelt (Abb. 4-5 (C) und (D)). Das Signal, welches nach 5 und 10 sek. Expression aufgenommen wurde, ist jedoch extrem stark, und es kommt zu einer Anfärbung weiterer Banden, sodass der Versuch mit einer stärkeren Verdünnung der Antikörper und zusätzlich einer Verdünnung der Proben wiederholt wurde. Damit soll die erwartete Bande deutlicher hervortreten und mögliche unspezifische Banden vermieden werden.

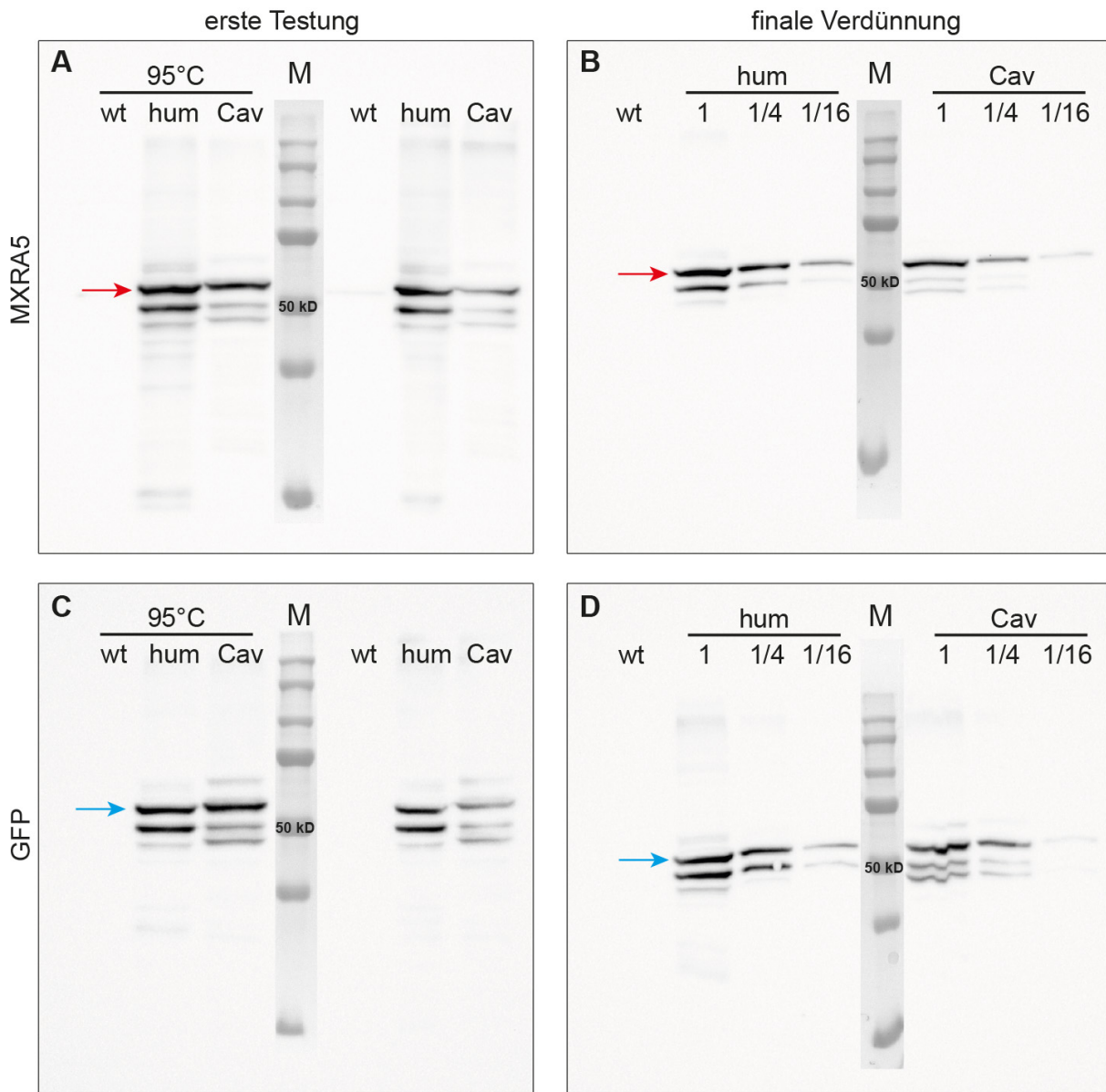


Abbildung 4-5: Immunoblot der Fragmente aus der HEK-Zellkultur

(A) und (B) stellen hierbei die Inkubation mit dem Antikörper gegen MXRA5 dar, (C) und (D) mit dem anti-GFP-Antikörper; (A) und (C) zeigen den ersten Versuch mit einer Verdünnung des MXRA5-Antikörpers auf 1/1000 und des GFP-Antikörpers auf 1/2000; auf der linken Seite des Markers (M) wurden die Proben zuvor erhitzt. (B) und (D) stellen den optimierten Versuchsaufbau dar, bei welchem der MXRA5-Antikörper auf 1/8000 und auch die Proben des humanen Epitops 12.7 (hum) und des Meerschweinchen-Epitops 14.5 (Cav) jeweils auf 1, 1/4 und 1/16 verdünnt wurden; bei dem GFP-Antikörper wurde die Verdünnung 1/2000 beibehalten. wt bezeichnet in der Abbildung jeweils den Wildtyp der Zellen, bei welchem keine Genfragmente eingefügt wurden und dient somit als Negativprobe. Die roten Pfeile kennzeichnen die Banden, die bei der Testung des anti-MXRA5-Antikörpers entstehen und sich auf der richtigen Höhe knapp oberhalb von 50 kD befinden, was der Größe des getesteten Fragments entspricht. Analog dazu markieren die blauen Pfeile die Banden in der GFP-Testung.

Da die Erhitzung der Proben auf 95°C einen positiven Effekt auf das Resultat des ersten Versuchs hatte, werden bei der Wiederholung alle Proben diesem Schritt unterzogen. Die Proben werden in der Ausgangskonzentration, auf 1/4 und auf 1/16 verdünnt aufgetragen. Zusätzlich wird bei allen Versuchen eine Wildtyp-Probe als Negativprobe eingesetzt. Als primäre Antikörper finden anti-GFP in der Konzentration 1/2000 und MXRA5, stärker verdünnt

auf 1/4000 und 1/8000, Verwendung. Wie Abb. 4-5 (B) und (D) zeigen, sind die Banden nach dieser Behandlung besser sichtbar als im Vorversuch, was den MXRA5-Antikörper-Nachweis bestärkt.

Da die Testung des Antikörpers erfolgreich war und dieser das richtige Epitop auf dem Protein erkennt, kann er im Weiteren für die Anfärbung in der Immunfluoreszenz verwendet werden.

4.4 Fluoreszenzmikroskopie

4.4.1 Etablierung des MXRA5-Antikörpers für die Histologie

Um die Spezifität des kommerziellen Antikörpers noch weiter zu überprüfen, werden hinzukommend zu dem zuvor beschriebenen Immunoblot die in der Zellkultur gezüchteten HEK-Zellen mit dem primären Antikörper und daran anschließendem sekundären, Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper inkubiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop studiert. Hierzu werden wie zuvor die Plasmide FS 12.7 und FS 14.5 in HEK293-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden auf Glasdeckgläschen gezüchtet, fixiert und mit MXRA5-Antikörper und sekundären Antikörpern immunmarkiert. Daneben wird mit GFP und Wildtyp-Zellen eine Gegenprobe durchgeführt.

Hierbei ist jeweils nach Transfektion beider Plasmide ein deutliches Signal zu erkennen (Abb. 4-6), was die Antikörper-Wirkung wiederum bestätigt. Es kommt zu einer Anfärbung ganzer Zellen, wobei teilweise sogar intrazelluläre Granula zu erkennen sind. Allerdings ist nicht jede Zelle Signal-positiv. Eine Erklärung hierfür ist, dass die Transfektion nicht jede Zelle gleichermaßen erreicht. Die intrazelluläre Anfärbung kann dadurch zustande kommen, dass es sich lediglich um ein Fragment des vollständigen Gens handelt, welches als EZM-Protein eigentlich aus der Zelle heraustransportiert werden sollte. In der Kontrolle mit den Wildtyp-Zellen kommt es zu keinem Signal nach der Fluoreszenzanregung. Diese Voruntersuchungen sollten somit für eine weitere Verwendung des kommerziellen MXRA5-Antikörpers in anschließenden Untersuchungen an Meerschweinchgeweben ausreichend sein.

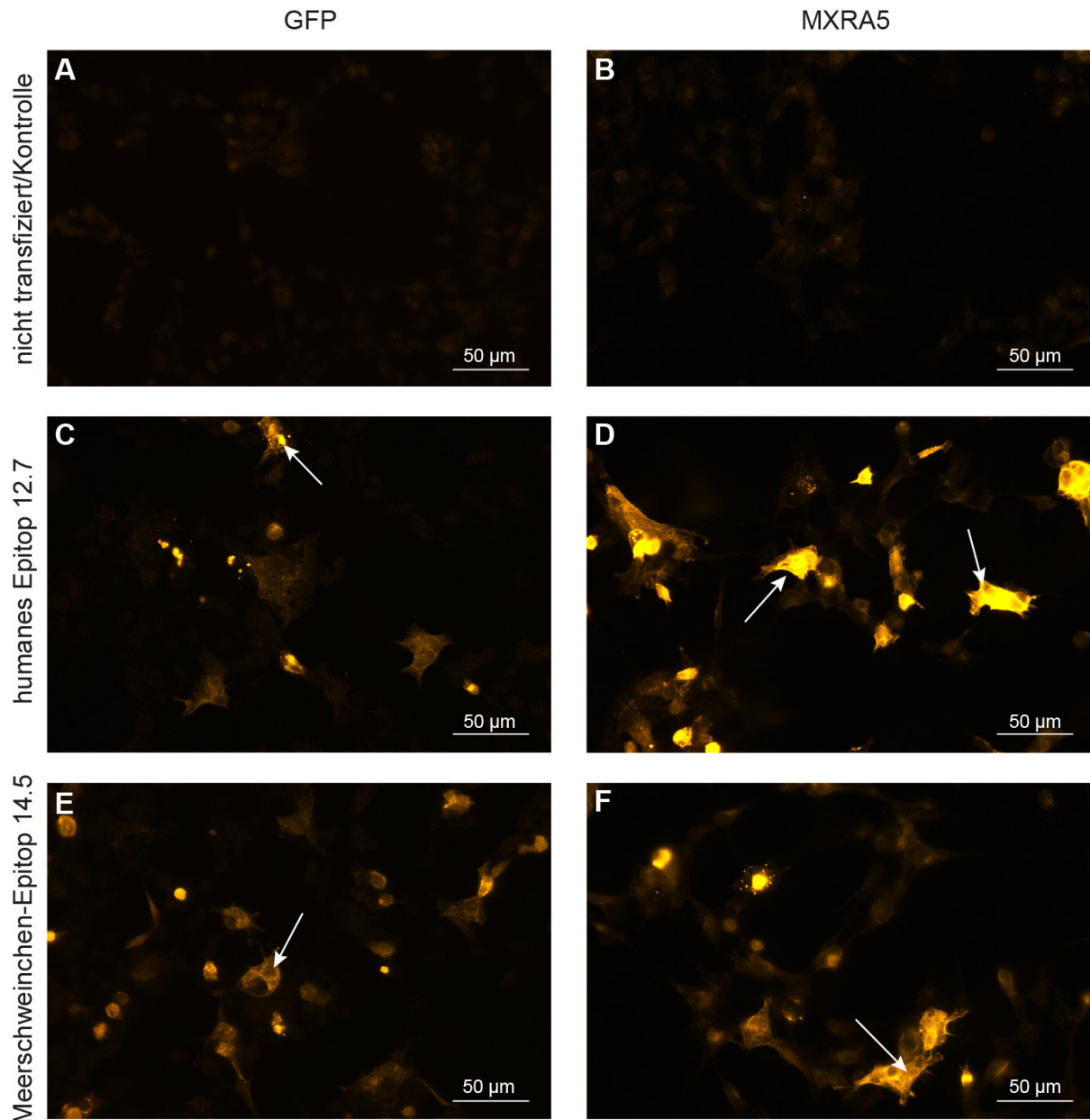


Abbildung 4-6: Immunfluoreszenz der ausgestrichenen HEK-Zellen

Auf der Abbildung ist neben dem Negativbeispiel der nicht transfizierten Zellen in (A) und (B) das Signalverhalten bzgl. GFP- und MXRA5-Antikörper in den HEK-Zellen, die die Genfragmente 12.7 und 14.5 enthalten, dargestellt. Hierbei ist in allen Fällen ein deutliches intrazelluläres Signal zu erkennen, wie durch die weißen Pfeile exemplarisch dargestellt. (C) zeigt das GFP-Signal, (D) das MXRA5-Signal des humanen Epitops 12.7. Analog dazu stellt (E) das GFP-Signal und (F) das MXRA5-Signal des Meerschweinchen-Epitops 14.5 dar. Zu erkennen ist auch, dass das Signal von MXRA5 (D,F) in beiden Fällen noch stärker ausgeprägt ist als das GFP-Signal (C,E).

4.4.2 Erste Lokalisationsbeobachtungen in verschiedenen Geweben

Nach der erfolgreichen Testung des MXRA5-Antikörpers im Immunoblot und in Zellkultur-Experimenten wird dieser erstmals auf Paraffinschnitten angewandt. Zu den ersten Gewebeschnitten gehören humane Nierenschnitte aus Rinde, Mark und Kelch, und eine Gruppe von Meerschweinchen-Geweben, darunter Herzventrikel, Niere, Harnblase,

Gallenblase, Trachea und Epididymis. Diese wurden ausgewählt, um stichprobenartig Gewebe mit unterschiedlich starken RNA-Transkriptionen aus verschiedenen Gewebegruppen, wie etwa gastrointestinalem oder urogenitalen Trakt etc., zu vergleichen. Es konnte untersucht werden, ob die zuvor gemessene RNA-Transkription mit dem Antikörper-Signalverhalten korreliert.

Von all diesen Schnitten werden jeweils zwei Objektträger verwendet. Auf einem davon werden die jeweiligen Gewebeschnitte zunächst mit dem primären MXRA5-Antikörper und anschließend mit einem sekundären Antikörper Cy3 inkubiert. Auf dem zweiten erfolgt die Inkubation lediglich mit dem sekundären Antikörper, um zu überprüfen, ob dieser nicht irrtümlich an unspezifische Epitope bindet und das entstehende Fluoreszenzsignal auch wirklich das angefärbte MXRA5 im Gewebe widerspiegelt.

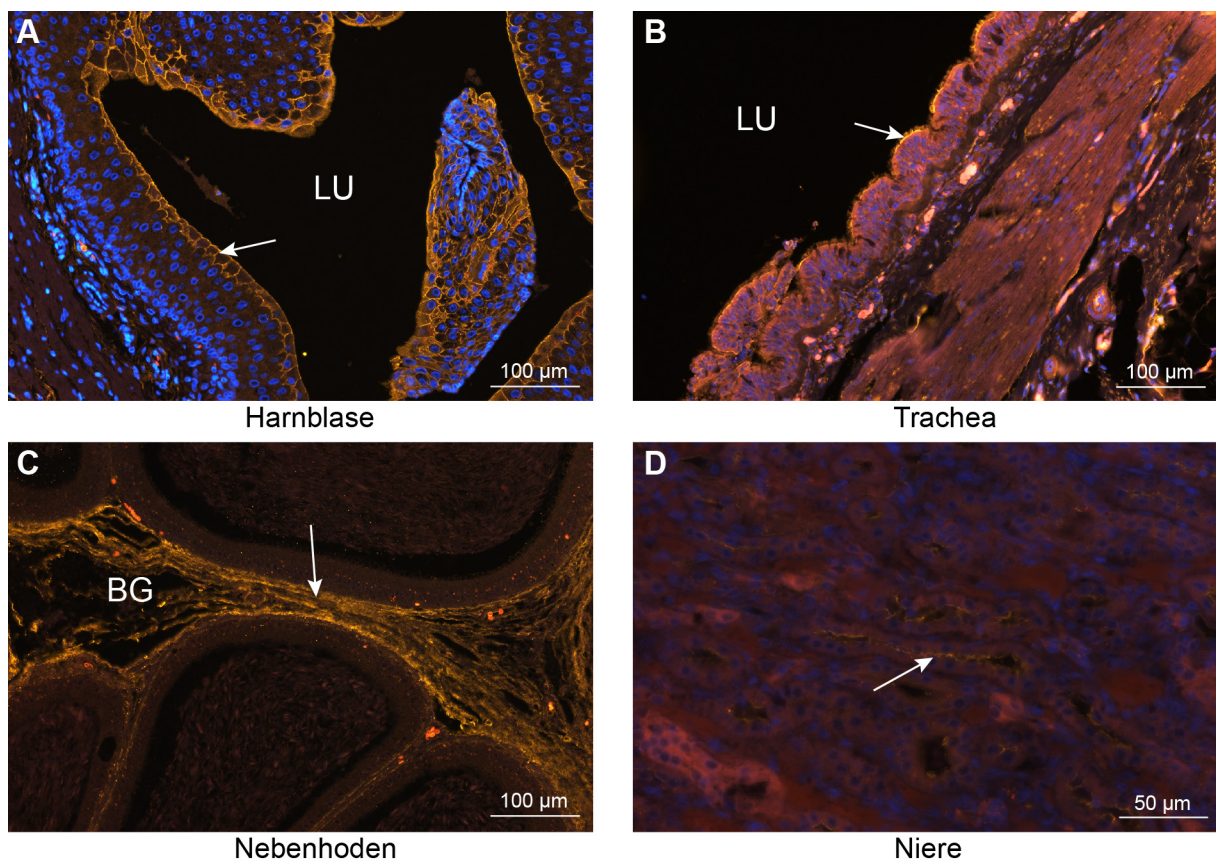


Abbildung 4-7: Erste Lokalisationsbeobachtungen des MXRA5-Antikörpers in verschiedenen Meerschweinchengeweben

Die weißen Pfeile zeigen in dieser Abb. exemplarisch auf Antikörpersignale; in (A) ist die Harnblase zu erkennen, bei der es bereits zu einem deutlichen Signal in den oberen Urothelzellschichten kommt; (B) zeigt die Trachea, das Antikörpersignal hebt sich allerdings kaum von der Anfärbung des restlichen Gewebes ab; (C) stellt einen Schnitt durch den Epididymis dar, wobei wie in (A) bereits ohne weitere Bearbeitung eine starke Antikörperfärbung zu erkennen ist; im Schnitt der Niere in (D) lässt sich wie in B das Signal schwer von der Gewebefärbung abgrenzen. LU = Lumen, BG = Bindegewebe.

In den Meerschweinchengeweben Harnblase und Epididymis (Abb. 4-7 (A) und (C)) kann man mittels dieser Antikörperfärbung bereits ein Signal unter dem Fluoreszenzmikroskop erkennen. Die Trachea (Abb. 4-7 (B)) lässt lediglich eine schwache Anfärbung des Antikörpers in Lumennähe erkennen, jedoch ist es schwer von der Färbung des restlichen Gewebes abzugrenzen. Im Nierengewebe in Abb. 4-7 (D) zeigt sich ähnlich wie in der Trachea nur ein schwach abgrenzbares Signal, hier im Lumen der Sammelrohre.

Im Epididymis erscheint das Signal im Bindegewebe gelegen zwischen den einzelnen Ductus, bei der Niere über dem Endothel der Sammelrohre und in der Harnblase kommt es zur stärksten Anfärbung in den obersten eineinhalb Schichten des Urothels. Anhand der Lokalisation ist es nun im Grunde auch schon möglich, über eine mögliche Funktion von MXRA5 zu spekulieren, allerdings sind hierfür deutlichere Signale im Gewebe wünschenswert.

Bei den Geweben Herzventrikel und Gallenblase war kein verwertbares Signal zu erkennen, weshalb auf eine Abbildung verzichtet wurde. Ähnlich verhielt es sich bei den humanen Nierenproben.

Da es zu sehr verschieden starken Signalen kommt, wurde in den folgenden Versuchsreihen durch unterschiedliche zusätzliche Variationen im Färbeprotokoll versucht, ein einheitlich gutes Ergebnis des Antikörpersignals in den verschiedenen Geweben zu erzielen.

4.4.3 Optimierung der Antikörper-Färbungen

TrueView zur Reduktion des Hintergrunds

Eine Methode zur Signalverstärkung und der gezielten Anfärbung in der Immunfluoreszenz ist eine Inkubation der Schnitte mit Vektor TrueVIEW[®]. Es handelt sich hierbei um eine Lösung, die anschließend nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper auf die Schnitte aufgetragen wird. Sie dient dazu, die Hintergrundfluoreszenz in den Gewebeschnitten zu unterdrücken. Autofluoreszenz oder unspezifische Signale werden dadurch leicht reduziert, womit das gewünschte Signal insgesamt stärker in den Vordergrund tritt. Diese Behandlung der Gewebeschnitte wirkt sich positiv auf die Fluoreszenzsignale aus, sodass nun alle weiteren Proben auf diese Weise bearbeitet werden, um ein optimales Ergebnis zu erzielen.

Ergänzend erfolgt eine Färbung mit DAPI, welches gezielt die DNA in den Zellkernen anfärbt. Dies erleichtert das Auffinden und Fokussieren des Präparates während des Mikroskopierprozesses. Außerdem hilft es bei der Differenzierung von Zelltypen im mikroskopischen Bild.

Thermische Demaskierung zur Verbesserung der Zugänglichkeit der Epitope

Nach erfolgreicher Testung des Verfahrens der Thermischen Demaskierung in vorherigen Arbeiten (Dissertationen von Jacqueline Schmidt und Pascal Henrich), wird diese Methode angewandt, um zu evaluieren, ob es auch in diesen Versuchen zu einer Signalverstärkung in der Fluoreszenzmikroskopie kommt.

Hierfür wird eine 10 mM Citratlösung unter Zugabe von Salzsäure oder Natronlauge auf die pH-Werte 3, 6 und 9 eingestellt. Diese Antigendemaskierung soll dazu dienen, die Immunreaktivität der Gewebeschnitte wiederherzustellen, welche beim Einbetten in Paraffin verloren gegangen sein könnte. Es wird davon ausgegangen, dass durch dieses Verfahren die Antigene im Gewebe wieder zugänglich gemacht werden, was zur Folge hat, dass die Antikörper möglicherweise besser an diese binden können. Dies kann man durch Erhitzen der Gewebeschnitte in definierten Lösungen, wie der Citratlösung, mittels einer Mikrowelle erreichen. Die „Maskierungen“ der Gewebe, etwa durch Quervernetzungen von Proteinen, entstanden durch Fixierungsmittel wie PFA/Formalin oder Glutaraldehyd, können hiermit teilweise wieder aufgehoben werden.

Es zeigt sich bei nahezu allen Gewebeschnitten besonders bei pH 3 ein verbessertes Ergebnis. Durch die Bearbeitung kommt es zu einem deutlich stärkerem Antikörpersignal und zum Teil zur Anfärbung weiterer Strukturen im Gewebe, die im ersten Versuch nicht zu erkennen waren (s. Abb. 4-8.5).

pH-Anpassung in einzelnen Geweben

Die Suche nach den am besten geeigneten Versuchsbedingungen hinsichtlich der Thermischen Demaskierung erfolgte an den beiden Meerschweinchengeweben Harnblase und Niere. Hierfür wurden jeweils fünf Präparate der beiden Organe auf unterschiedliche Weise bearbeitet, mit dem Ziel, den optimalen Versuchsweg zu ermitteln, um diesen im Folgenden auf die anderen Gewebeschnitte anwenden zu können. Alle fünf Präparate erhielten jedoch die gleiche Inkubation in primärem und sekundärem Antikörper, wodurch lediglich die zusätzliche Bearbeitung unterschieden werden kann.

Drei Objektträger wurden vor der Antikörper-Färbung in aufsteigender Reihe mit den pH-Werten 3, 6 und 9 mittels Thermischer Demaskierung behandelt und danach zusätzlich mit dem Vektor TrueVIEW®-Kit inkubiert. Eine Probe wurde nur der Inkubation von Vektor TrueVIEW® nach der Antikörper-Inkubation unterzogen und das letzte Präparat erhielt lediglich die herkömmliche Antikörper-Färbung ohne zusätzliche Bearbeitung („unbehandelte“ Probe).

Als erstes Beispiel wird die Harnblase des Meerschweinchens aufgegriffen. Diese zeigte bereits unbehandelt ein deutliches Signal für die Lokalisation des MXRA5 Proteins. Da dort

die Unterschiede gut zu erkennen waren, wurde diese für die folgende Ergebnisbeschreibung berücksichtigt.

Harnblase, unbehandelt

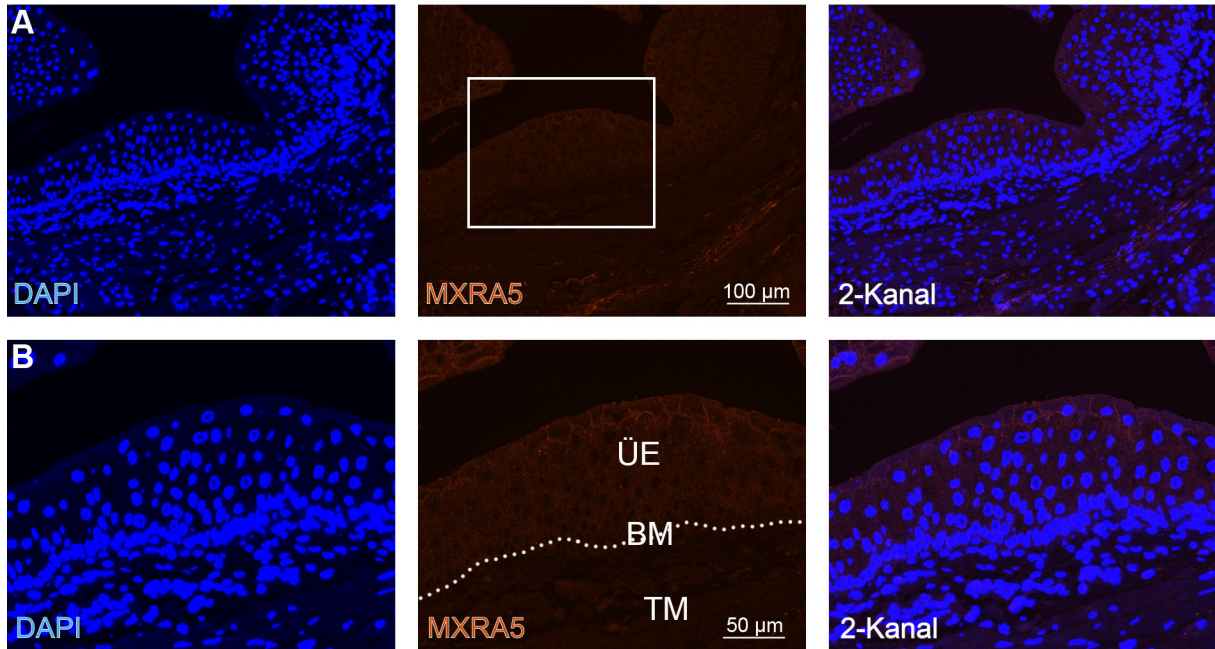


Abbildung 4-8.1: Antikörperfärbung der Harnblase des Meerschweinchens ohne zusätzlich Bearbeitung („unbehandelt“)

(A) zeigt den Schnitt unter dem 20x-Objektiv, (B) unter 40x. Durch diesen Färbeprozess kommt es lediglich zu einem schwachen Signal in den oberen 1,5 Schichten des Harnblasenurothels. Die Gewebefärbung wird zudem durch die DAPI-Färbung der Zellkerne überstrahlt. ÜE=Übergangsepithel, BM=Basalmembran, TM=Tunica muscularis

Wie auf Abbildung 4-8.1 zu erkennen ist, entsteht bei der unbehandelten Probe nur ein sehr schwaches Signal in den oberen 1-2 Schichten des Harnblasenurothels. Die DAPI-Färbung der Zellkerne überstrahlt hier das Bild, sodass das gesamte Gewebe auch eher schwächer hervortritt. Im zusammengesetzten Bild können die einzelnen Zellen dadurch jedoch deutlich voneinander differenziert werden. Bei dem Präparat mit TrueView®-Behandlung (Abb. 4-8.2) ist das Antikörpersignal bereits besser in den oberen Schichten zu erkennen.

Damit zeigt sich der Vorteil der Anwendung des Vektor TrueVIEW®-Kits, mit dessen Hilfe die Signale besser vom umliegenden Gewebe abzugrenzen sind.

Harnblase, TrueView ohne Demaskierung

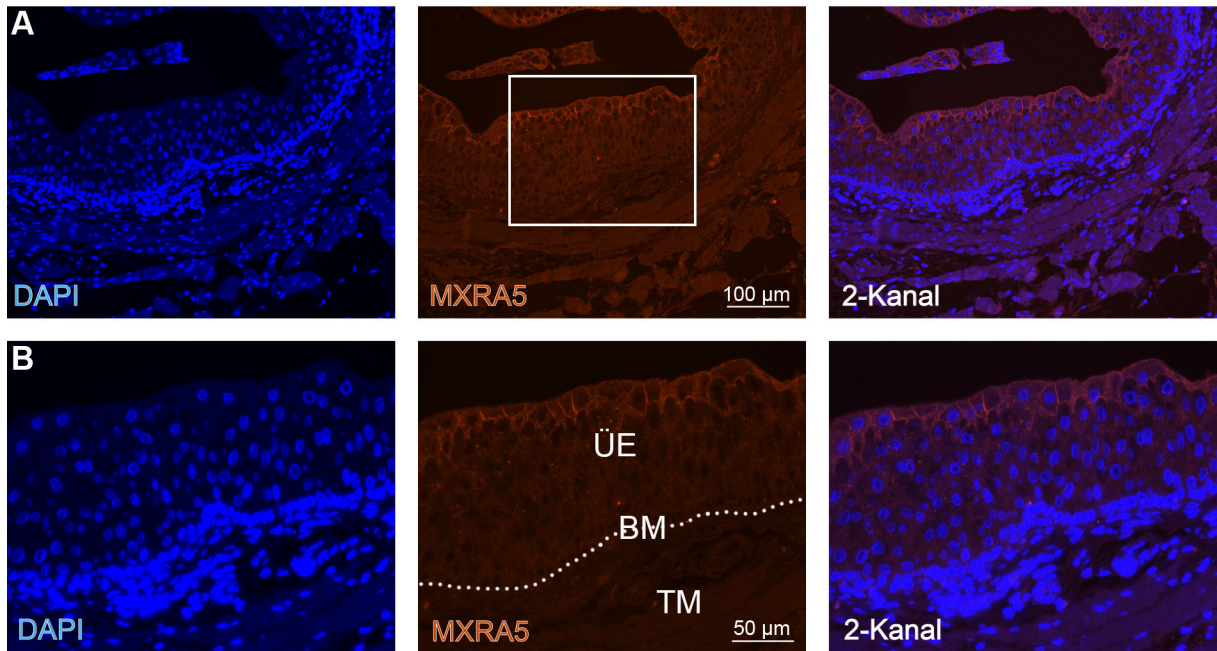


Abbildung 4-8.2: Antikörperfärbung der Harnblase des Meerschweinchens inklusive der Inkubation mittels VektorTrueVIEW®-Kit

(A) zeigt den Schnitt unter dem 20x-Objektiv, (B) unter 40x. Die ergänzende Behandlung mit Vektor TrueVIEW® sorgt hier für ein besseres Signal des MXRA5-Antikörpers, welches sich nun deutlicher vom umliegenden Gewebe abgrenzen lässt. Die in Abb. 4-8.1 beschriebene Lokalisation kommt hierbei noch besser zum Vorschein. ÜE=Übergangsepithel, BM=Basalmembran, TM=Tunica muscularis

Harnblase, pH9

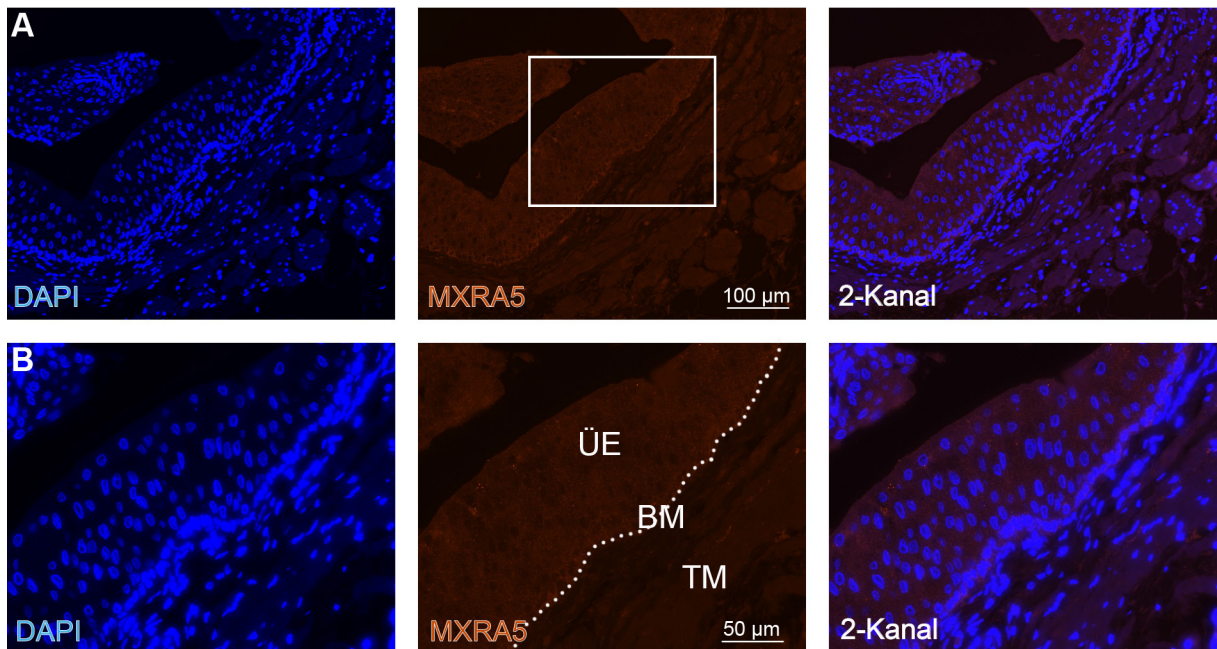


Abbildung 4-8.3: Antikörperfärbung der Harnblase des Meerschweinchens nach thermischer Demaskierung bei pH=9, inklusive der Inkubation mittels Vektor®TrueVIEW®-Kit
 (A) zeigt den Schnitt unter dem 20x-Objektiv, (B) unter 40x. Die thermische Demaskierung in der Citratlösung mit pH=9 wirkt sich eher negativ auf das Antikörpersignal aus. Das in den Abbildungen 4-8.1 und 4-8.2 beschriebene Signal ist hier nahezu nicht mehr zu erkennen. ÜE=Übergangsepithel, BM=Basalmembran, TM=Tunica muscularis

Die Demaskierung durch der Citratlösung mit pH 9 zeigt auf Abb. 4-8.3 einen nachteiligen Effekt auf das Ergebnis unter dem Fluoreszenzmikroskop. Es ist in diesem Fall kaum ein Antikörpersignal zu erkennen.

Anders erweist es sich allerdings bei der Verwendung der niedrigeren pH-Stufen. Bei pH 6 in Abb. 4-8.4 ist das Signal bereits deutlich intensiver als in den zuvor beschriebenen Fällen und es sind zusätzlich schwach leuchtende, intrazelluläre Granula in den oberen Urothelschichten zu erkennen.

Harnblase, pH6

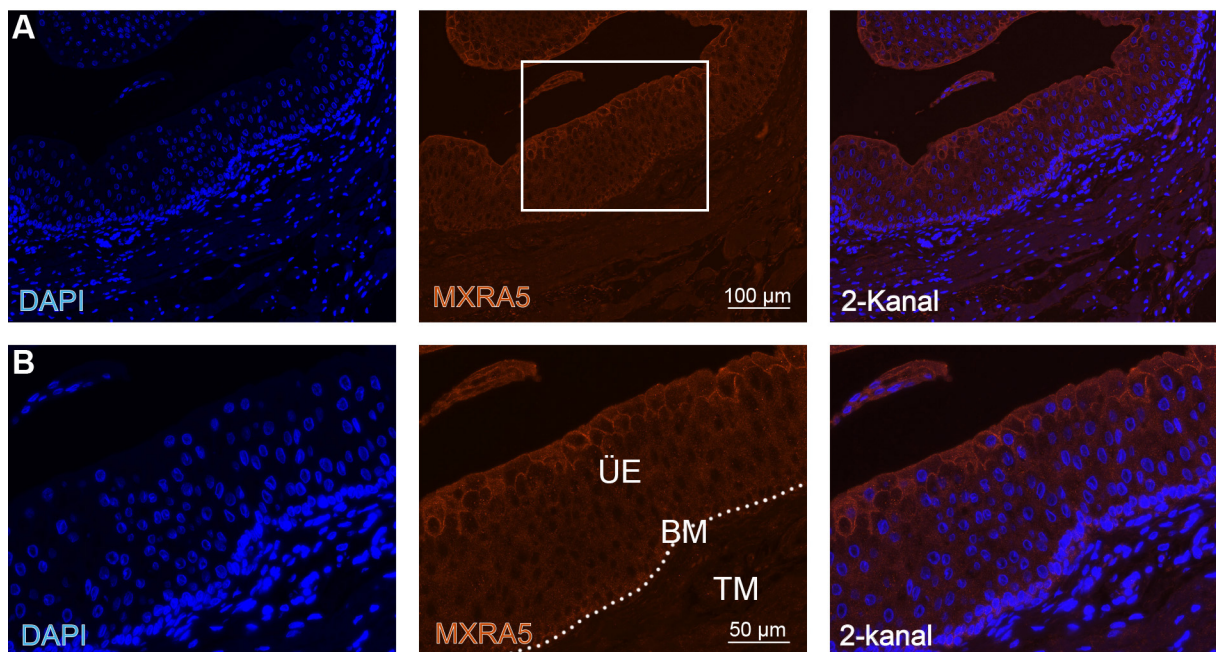


Abbildung 4-8.4: Antikörperfärbung der Harnblase des Meerschweinchens nach thermischer Demaskierung bei pH=6, inklusive der Inkubation mittels Vektor TrueVIEW®-Kit (A) zeigt den Schnitt unter dem 20x-Objektiv, (B) unter 40x. Im Gegensatz zu Abb. 8.3 ist nach der thermischen Demaskierung in der Citratlösung mit pH=6 das MXRA5-Antikörpersignal deutlich stärker in den oberen 1,5 Schichten des Harnblasenendothels zu erkennen, jedoch besteht kaum ein Unterschied zur unbehandelten Methode (Abb. 4-8.2). In den tieferen Urothelschichten ist zudem ein sehr schwaches Signal in Form kleiner Granula zu erkennen. ÜE=Übergangsepithel, BM=Basalmembran, TM=Tunica muscularis

Harnblase, pH3

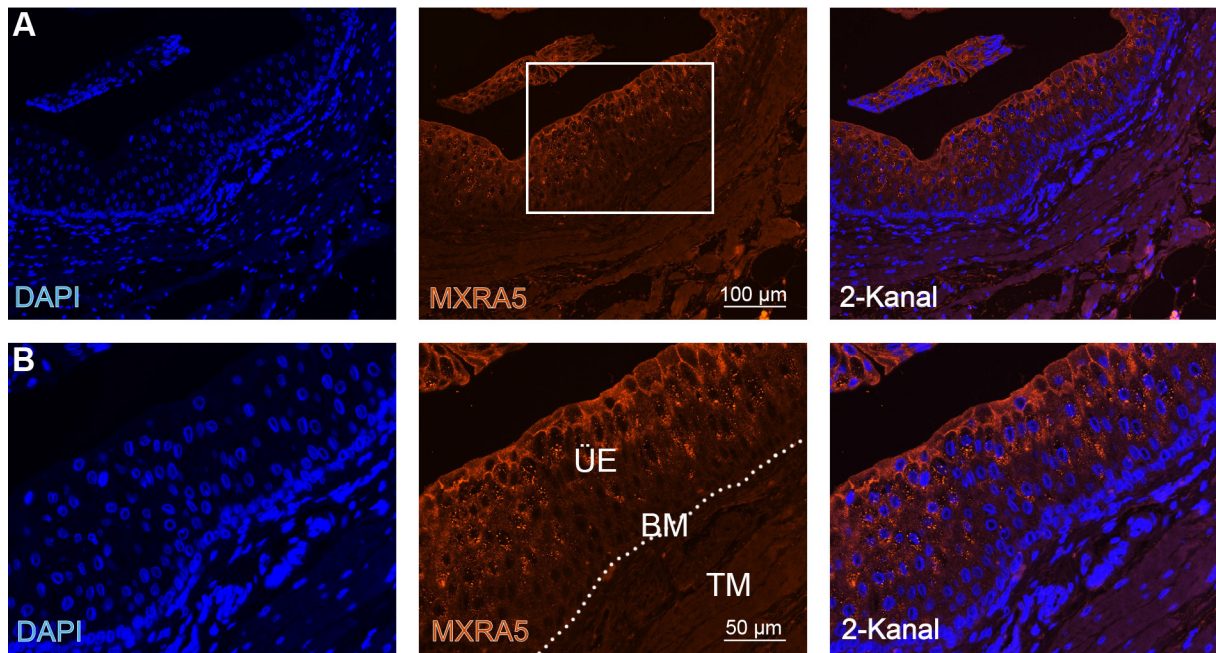


Abbildung 4-8.5: Antikörperfärbung der Harnblase des Meerschweinchens nach thermischer Demaskierung bei pH=3, inklusive der Inkubation mittels Vektor TrueVIEW®-Kit (A) zeigt den Schnitt unter dem 20x-Objektiv, (B) unter 40x. Dieser Färbeprozess, die thermische Demaskierung in der Citratlösung mit pH=3, zeigt in der Immunfluoreszenz das beste Ergebnis. Die Anfärbung um die Urothelzellen der oberen 1,5 Schichten ist deutlich zu sehen, zudem kommt es zu einem intensiveren Signal der unter Abb. 4-8.4 beschriebenen Granula bis in tiefere Urothelzellschichten. ÜE=Übergangsepithel, BM=Basalmembran, TM=Tunica muscularis

Abb. 4-8.5 zeigt, dass es durch die thermische Demaskierung in der Citratlösung mit pH 3 zum besten Ergebnis kam. Es ist eine deutliche Anfärbung rund um die Urothelzellen der oberen 1-2 Schichten zu sehen und die zuvor beschriebenen Granula sind intensiver und bis in tiefere Urothelschichten zu erkennen. Hierbei könnte es sich um das Protein MXRA5 handeln, welches intrazellulär produziert werden muss, um dann als Bestandteil einer EZM sezerniert zu werden. Dies geschieht offensichtlich während des Differenzierungsprozesses des Übergangsepithels.

Zusammenfassend lässt sich zu der Färbung in der Harnblase feststellen, dass pH 3 zum besten Fluoreszenzsignal führt, welches mit steigendem pH-Wert jedoch abnimmt. Die optimale Bearbeitung der weiteren Gewebeschnitte ist somit im Folgenden durch Demaskierung in Citratlösung mit pH 3 und in Kombination mit der Anwendung von Vektor TrueVIEW® erfolgt.

Niere

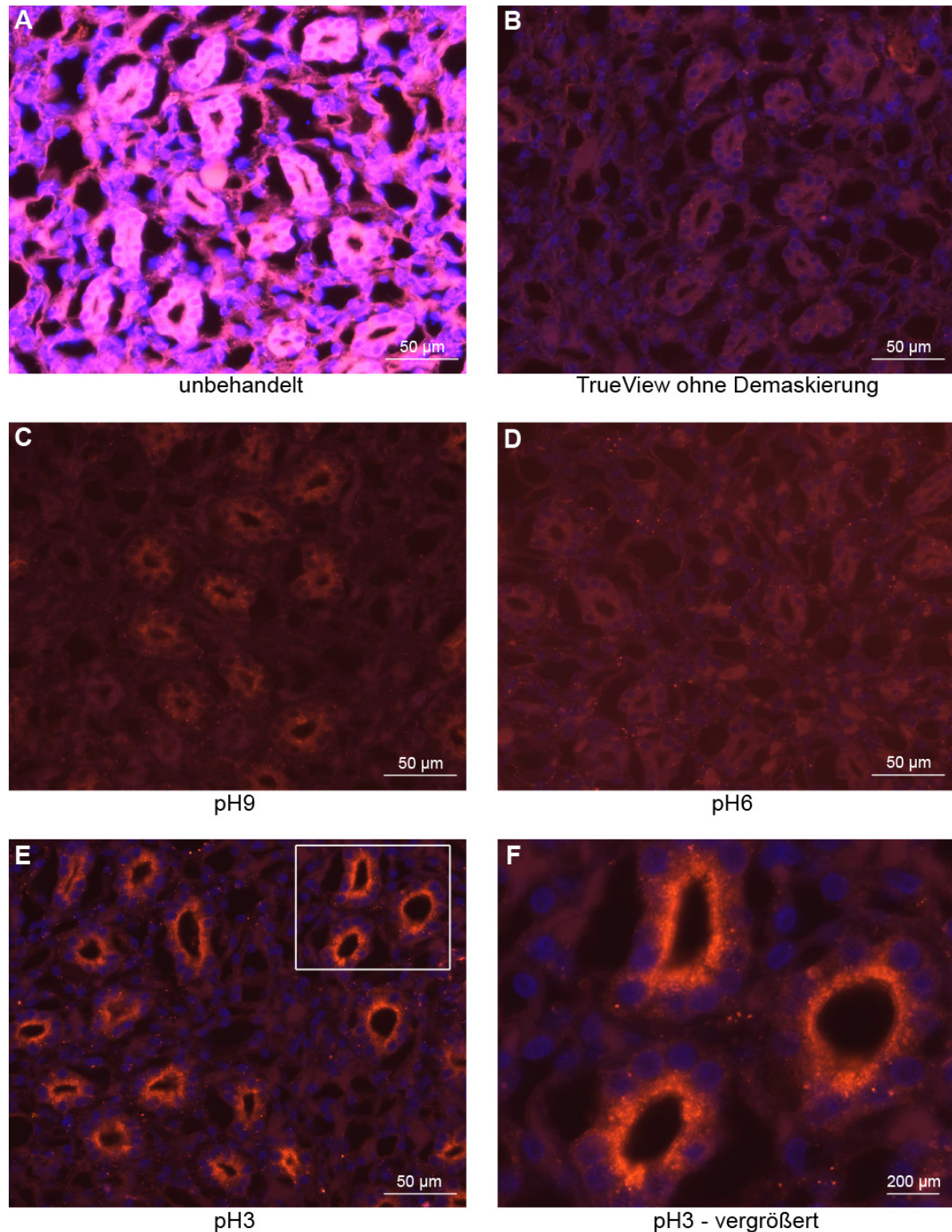


Abbildung 4-9: Thermische Demaskierung und pH-Anpassung in der Meerschweinchenniere

Die Schnitte der Niere wurden analog zu den Harnblasenpräparaten aus Abb. 8.1-8.5 behandelt. (A) zeigt den nativen Zustand, bei dem lediglich die Färbung mit dem MXRA5-Antikörper erfolgte; das Ergebnis ist allerdings kaum zu verwerten, da die Autofluoreszenz alles überstrahlt. Nach der Bearbeitung mit Vektor TrueVIEW®-Kit in (B) ist ebenfalls kaum ein Signal zu erkennen. (C) und (D) zeigen die thermische Demaskierung mit den Citratlösungen mit pH=9 und pH=6; hierbei hat die Färbung auch nicht zum gewünschten Ergebnis geführt und es erscheint alles trüb und verwaschen; bei pH=9 (C) lassen sich im Bereich der Sammelrohre leichte Anfärbungen erkennen, die aufgrund der Trübung schwer zu verwerten sind. Ähnlich zur Immunfluoreszenz der Harnblase ist auch bei der Citratlösung mit pH=3 (E) das beste Ergebnis zu sehen; hierbei kommt es zu einem deutlichen Signal im Bereich des Lumens der Sammelrohre. Der weiße Rahmen um drei Sammelrohre in (E) kennzeichnet den vergrößerten Abschnitt aus (F).

Die Gewebeschnitte der Meerschweinchenniere (s.o. Abb. 4-9) wurden der gleichen Bearbeitung analog zur Harnblase unterzogen. Auch die entstandenen Bilder sind vergleichbar, allerdings erscheinen hier die Präparate nach der Demaskierung in den Citratlösungen mit den pH-Werten 6 und 9 eher trübe und sind im Vergleich zu den übrigen Präparaten schwieriger auszuwerten. Die native Aufnahme lässt sich schwer beurteilen, da für ein geeignetes Antikörpersignal eine längere Belichtungszeit von Nöten ist und somit das gesamte Bild von der DAPI-Färbung überstrahlt wird. Bei pH 3 kommt es auch bei der Niere zu dem besten Ergebnis mit einer deutlichen Anfärbung im Lumen der Sammelrohre und vereinzelt intrazellulären Granula.

Auch in diesem Fall wurde also mit pH 3 und einer Vektor TrueVIEW[®]-Inkubation das beste Ergebnis erzielt, was diesen Bearbeitungsweg zusätzlich stärkt.

4.4.4 Validierungskontrolle durch Hinzunahme eines weiteren Fluoreszenz-Kanals

Um die Wirksamkeit des MXRA5-Antikörpers auch noch ergänzend in der Immunfluoreszenz zu überprüfen, kann man unter dem Fluoreszenz-Mikroskop noch einen zusätzlichen Kanal hinzuschalten. Hierfür werden in diesem Fall die Sammelrohre der Niere im Querschnitt unter Hinzunahme eines grünen Kanals (Abb. 4-10 C), welcher unspezifische Gewebesignale darstellt, untersucht. Hinsichtlich des Antikörpersignals wird hiermit getestet, ob es sich nicht um das „Durchbluten“ eines anderen Epitops oder unspezifischer Signale handeln könnte.

Die unterschiedlichen Kanäle und das zusammengelegte Bild sind in Abb. 4-10 dargestellt. In dem orangenen Kanal wird das Signal des sekundären Antikörpers Cy3 abgebildet. Hierbei kann man eine deutliche Anfärbung im Lumen der Sammelrohre feststellen. In dem grünen Kanal, welcher unspezifische Signale innerhalb des Gewebes aufzeigt, tritt an diesen Stellen kein Signal auf, was im kombinierten Bild unterschiedlicher Farbkanäle (Abb. 4-10 D) auch gut zu sehen ist. Würde nun ein Signal aus dem Grünkanal „durchbluten“, käme es in dem Fall in dem orangenen Kanal an derselben Stelle zu einem zusätzlichen Signal im Gewebeschnitt. Das Signal aus dem Lumen der Sammelrohre würde zudem im grünen Kanal deutlich erkennbar sein.

Somit bestätigt sich die gezielte Anbindung des sekundären Cy3-Antikörper an den primären MXRA5-Antikörper und eine unspezifische Bindung bzw. Fluoreszenzsignale aus dem grünen Kanal können ausgeschlossen werden.

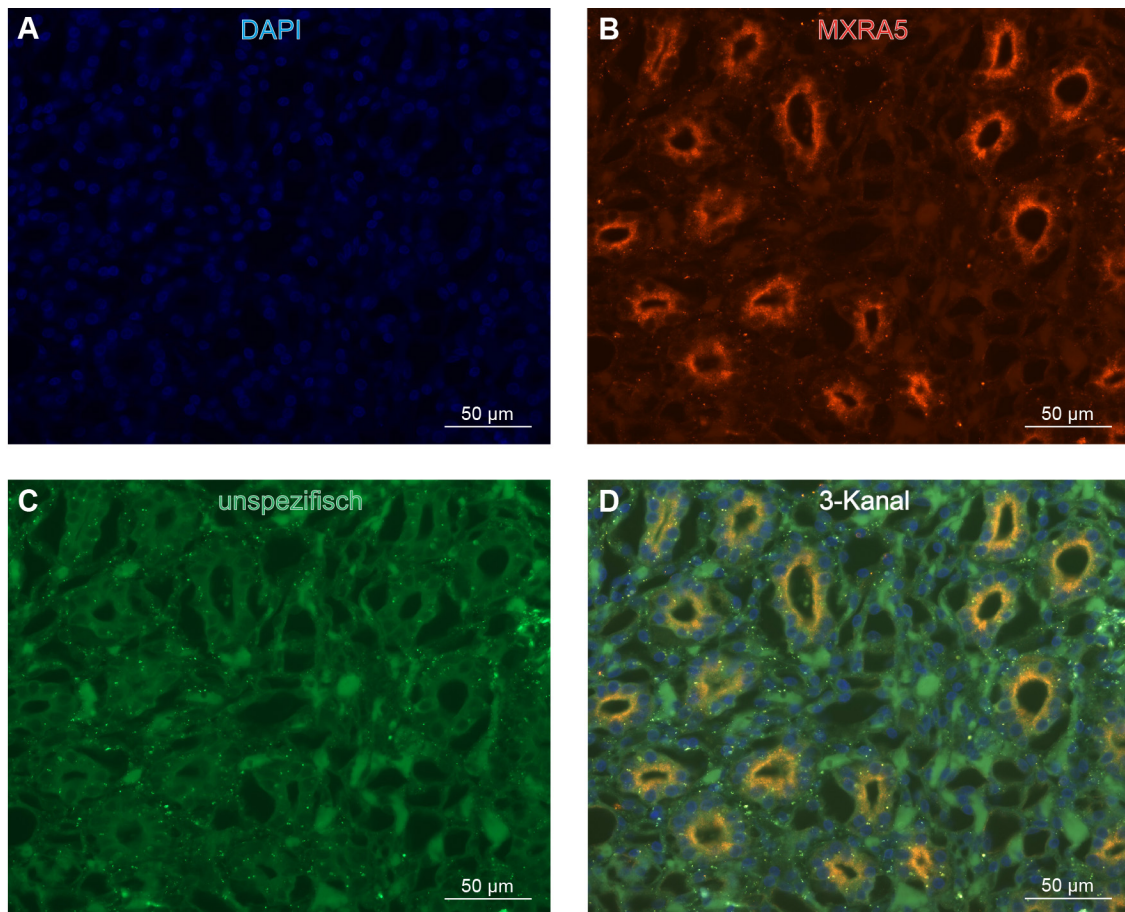


Abbildung 4-10: Kontrolle des MXRA5-Antikörpers mit zusätzlichem Kanal in der Immunfluoreszenz an der Meerschweinchenniere

Die Abbildung zeigt die einzelnen verschiedenen Kanäle der Immunfluoreszenz und das zusammengesetzte Bild (merged); auffällig ist hierbei, dass das Signal des MXRA5-Antikörpers nur in dem orangenen und nicht im grünen unspezifischen Kanal (C) zu erkennen ist, was ein „Durchbluten“ aus dem höheren grünen Kanal ausschließt.

4.4.5 Spezielle Lokalisationen des Proteins MXRA5

In der letzten Gewebegruppe wurde nun versucht, das optimale Färbeprotokoll aus den zuvor geschilderten Versuchen auf die übrigen Gewebe anzuwenden. Hierfür wurde, wie in Abschnitt 4.4.3 beschrieben, die thermische Demaskierung in der Citratlösung mit dem pH-Wert 3 und anschließend die Bearbeitung mittels Vektor TrueVIEW® gewählt.

Abb. 4-11 zeigt das Signal des MXRA5-Antikörpers auf dem Schnitt zweier Blutgefäße in einem Duodenumquerschnitt des Meerschweinchens. Es ist eine deutliche Anfärbung auf der dem Gefäßlumen zugewandten Seite der Wandschicht zu erkennen, welche von der Lokalisation her der *Membrana elastica interna* entsprechen könnte. Diese erstreckt sich fast „glühdrahtartig“ rund um das Gefäßlumen in der *Tunica intima*, wie man in Abb. 4-11 B erkennen kann. Die nach außen folgende, vor allem aus glatten Muskelzellen bestehende,

Tunica media ist frei von Antikörpersignal. Im Bindegewebe der *Adventitia* ist allerdings eine nicht so geordnete Anfärbung wie in der *Tunica intima*, sondern eher diffus verteilte zu erkennen.

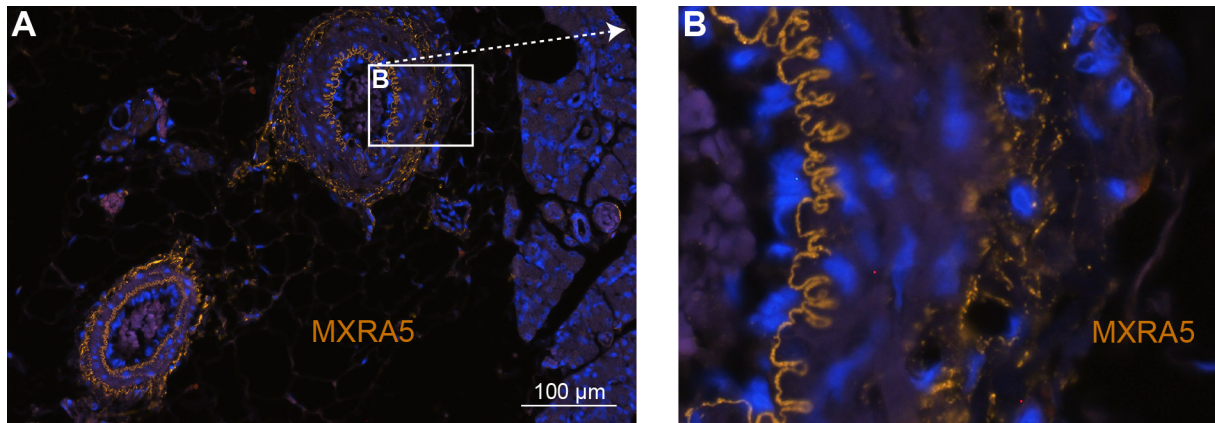


Abbildung 4-11: Immunfluoreszenz des MXRA5-Antikörpers an Gefäßen in der Region des Duodenums

(A) zeigt einen Ausschnitt aus dem Präparat, welcher zwei Gefäße im Bereich des Duodenums des Meerschweinchens unter dem 20x-Objektiv darstellt; in (B) ist exemplarisch eine Vergrößerung der arteriellen Wandschichten abgebildet. Dieser Schnitt wurde nach der in Abschnitt 4.4.3 beschriebenen Methode bearbeitet und zeigt ein deutliches Signal in der Membrana elastica interna und der Adventitia der Gefäße.

Da sich in den Geweben mit Epithelgewebe, Harnblase (Abb. 4-7, 4-8.5) und Niere (Abb. 4-9), gute Signale zeigten, wurden auch die Epithelien der Haut betrachtet.

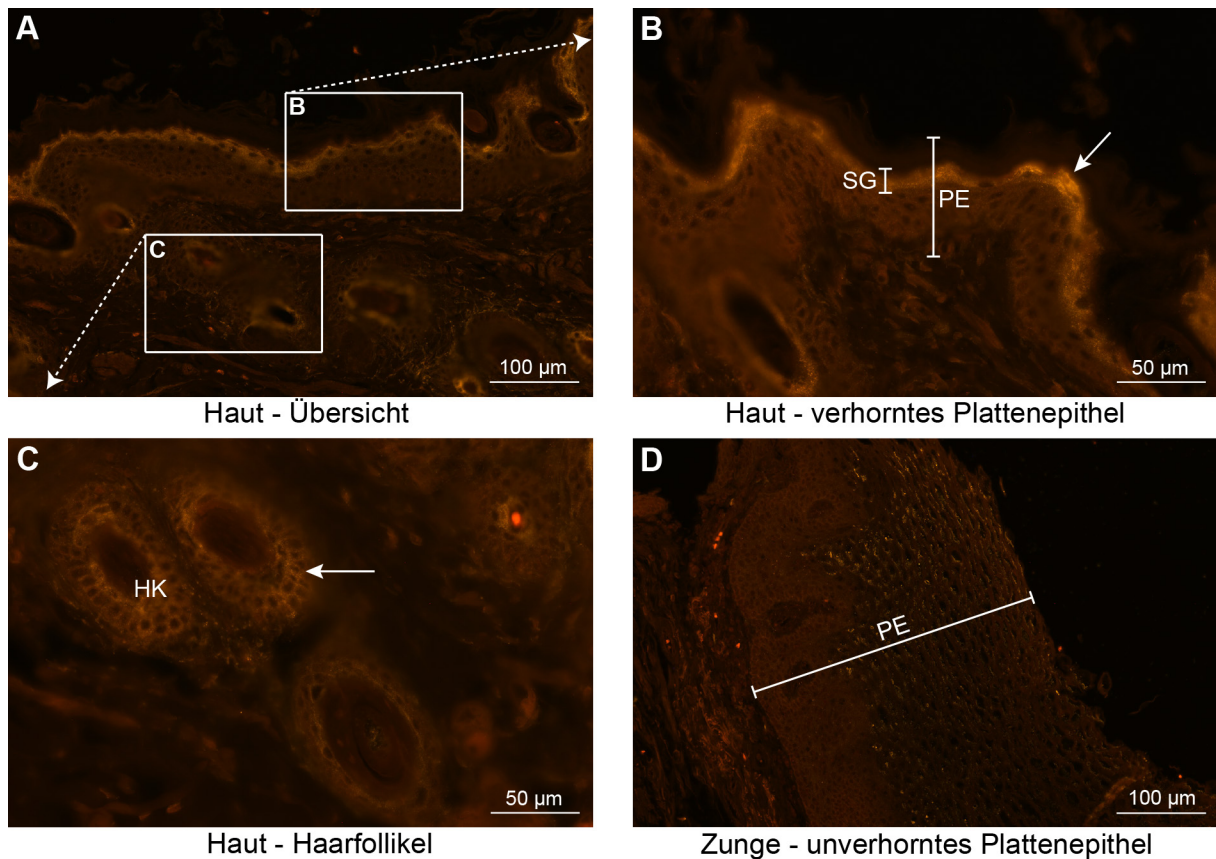


Abbildung 4-12: Immunfluoreszenz von Haut (Dermis) und Zunge des Meerschweinchens mit optimierter Färbestrategie

In (A) ist zunächst eine Übersichtsaufnahme der Haut dargestellt, auf der bereits schwache Signale zu erkennen sind; (B) zeigt eine Vergrößerung des verhornten mehrschichtigen Plattenepithels, wobei hier in den oberen Schichten ein Signal des Antikörpers zu erkennen ist. In (C) sind die Haarfollikel vergrößert dargestellt und auch diese weisen ein Signal in ihrem Epithel auf. Im Gegensatz dazu ist in (D) das mehrschichtig unverhornte Plattenepithel der Zunge zu sehen, in welchem bis auf einzelne „Pünktchen“ kaum ein Signal zu erkennen ist. PE = Plattenepithel, SG = Stratum granulosum, HK = Haarkulikula

Wie in Abb. 4-12 zu sehen ist, kommt es in den oberen Schichten des mehrschichtig verhornten Plattenepithels der Dermis im Bereich des Stratum granulosum zu einem positiven Signal (Abb. 4-12 (B)). Zudem treten deutlich Signale in der Kutikula des Haares auf (Abb. 4-12 (C)). Im Gegensatz dazu ist im mehrschichtig unverhornten Plattenepithel der Zunge kaum ein Antikörpersignal zu erkennen (Abb. 4-12 (D)). Bei genauer Betrachtung fallen lediglich einzelne „Pünktchen“ in der Epithelschicht auf.

Abbildung 4-13 zeigt jedoch, dass dieses Färbeprotokoll nicht bei jedem Gewebe das optimale Ergebnis erzielt. Es zeigt in der Niere allgemein eine sehr schwache Anfärbung, und das Antikörpersignal ist nur dezent in Lumennähe der Sammelrohre zu erkennen. Ein deutlicher Unterschied zur ersten Bearbeitung mit dieser Methode (Abb. 4-9 E) ist zu erkennen, welcher durch die Fixierung und die unterschiedliche Schnittrichtung bedingt sein kann. Die Belichtungszeit unter dem Immunfluoreszenzmikroskop ist eine entscheidende Komponente und kann hierbei zu einer verschlechterten Darstellung führen.

Beim Hoden kann man ein leichtes Antikörpersignal rund um die Hodenkanälchen ausmachen. Dieses befindet sich extrazellulär, umgibt die Kanälchen ähnlich einer Begrenzung und zeigt die Lokalisation von MXRA5 im Bindegewebe auf.

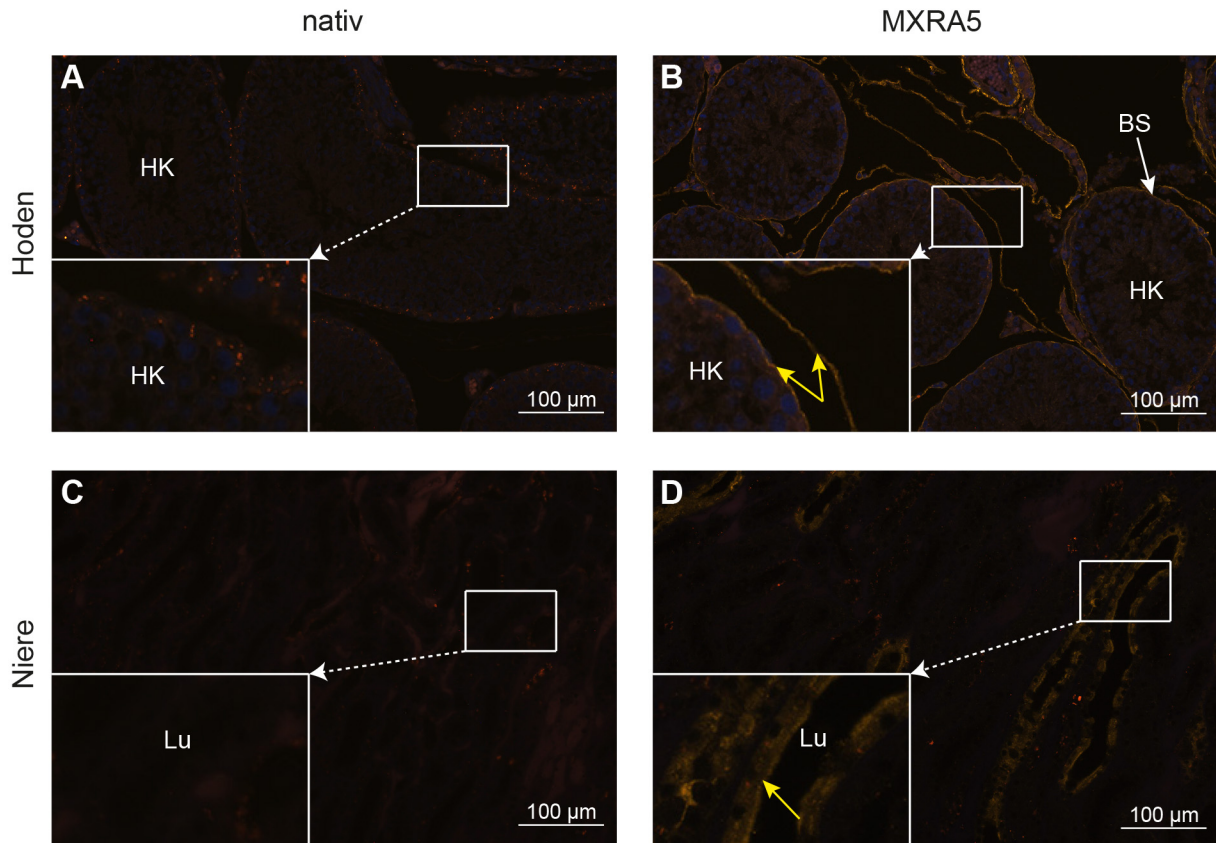


Abbildung 4-13: Immunfluoreszenz von Hoden und Niere des Meerschweinchens mit optimierter Färbestrategie

Es ist jeweils der Vergleich zwischen Schnitten ohne (nativ) Antikörperinkubation und mit MXRA5-Antikörperfärbung dargestellt. Im Hoden zeigt sich ein Signal im Bereich der Bindegewebssepten (BS) rund um die Hodenkanälchen (exemplarisch mit HK angedeutet), dieses ist auf dem nativen Schnitt nicht vorhanden. In der Niere kommt es zu einer schwachen Anfärbung im Lumen (LU) der Sammelrohre. Im Vergleich zu Abb. 10 ist das Signal jedoch deutlich geringer ausgeprägt. Die gelben Pfeile markieren das Antikörpersignal in der zusätzlichen Vergrößerung.

Bei Gewebeschnitten aus Milz und Leber, aber auch aus den muskulären Geweben wie Herz- und Skelettmuskel besteht die gleiche Analogie. Aufgrund mangelnder Signale in der Fluoreszenzmikroskopie wurde auf Abbildungen dieser Gewebe verzichtet. Bei der Lunge und der Retina verhielt es sich ähnlich.

Letztendlich konnte mithilfe geeigneter Primer eine Gensequenz für *MXRA5* von *Cavia porcellus* ermittelt werden. Es war dadurch möglich, die Proteinsequenz zu bestimmen und es konnten zudem Vergleiche mit Mensch und dem nah verwandten *Cavia tschudii* gezogen werden. Ein Antikörper, der ursprünglich gegen das humane Protein gerichtet war, wurde zur Immunmarkierung verwendet. Dabei hat es sich als sinnvoll erwiesen, den Antikörper zuvor

mittels Immunoblot als Kontrollexperiment zu testen, um zu vermeiden, dass er in der darauffolgenden Fluoreszenzmikroskopie keine Signale erbringt. In der Immunfluoreszenz führte dieser Antikörper hinsichtlich seiner Wirkung gegen das Protein von *Cavia porcellus* jedoch zu sehr positiven Ergebnissen. Erste Aussagen über die Lokalisation und Vermutungen über die Funktion von MXRA5 waren dadurch möglich. In den behandelten Geweben war zu erkennen, dass es sich um ein epithelassoziiertes Protein handelt, welches vor allem im Bindegewebe vorkommt. Es zeigte sich auch besonders an den Grenzen bestimmter Gewebeschichten, wie etwa dem Lumen der Harnblase, der Hautoberfläche oder in den Sammelrohren der Niere. Da hierbei jedoch die genaue Funktion bis jetzt nicht geklärt ist, lassen sich zunächst nur Vermutungen aufstellen.

5. Diskussion

Es ist mit Hilfe dieser Arbeit gelungen, das Gen *MXRA5* und das daraus kodierte Protein im Meerschweinchen (*Cavia porcellus*) als Modelltier genauer zu untersuchen, und bereits erste Rückschlüsse auf seine Lokalisation und Funktion zu erhalten. Hierfür konnte ein geeigneter Antikörper gefunden und validiert werden. Dieser war ursprünglich gegen das menschliche Protein gerichtet, es konnte allerdings gezeigt werden, dass er auch das homologe Protein im Meerschweinchen erkennt und somit für anschließende Untersuchungen genutzt werden kann. Anhand der dadurch ausgearbeiteten Immunfluoreszenz lassen sich auch Vermutungen über mögliche Funktionen des Proteins anstellen.

Die ermittelte Gensequenz kann mit der aus dem humanen Genom verglichen werden, wodurch mögliche Gemeinsamkeiten und Unterschiede aufgedeckt werden können.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen zudem die These, dass das Meerschweinchen als geeignetes Modelltier für die Erforschung verschiedener Gene in Frage kommen könnte. Hierbei handelt es sich vor allem um Gene, die in den klassischen Labortieren, wie Maus und Ratte, nicht exprimiert werden, wie es bei vielen Genen im Bereich der pseudoautosomalen Region beschrieben wird (Maxeiner et al., 2021).

5.1 Validierung eines kommerziellen Antikörpers gegen *MXRA5*

Zu Beginn der Versuche waren nur zwei Antikörper kommerziell erhältlich, welche sich gezielt gegen das Protein *MXRA5* im menschlichen Gewebe richten. Es wurde der Antikörper der Firma Abxexa ausgewählt, da dieser ein Epitop erkennt, welches im Genom des Meerschweinchens in ähnlicher Zusammensetzung vorhanden ist. Frühere Versuche mit diversen Antikörpern hatten allerdings gezeigt, dass die Erkennung des richtigen Epitops durch den Antikörper häufig ein Problem darstellt. Somit blieb zunächst die Frage offen, ob die erfolgten Versuche in ihrer Vollständigkeit und die damit einhergehende Erforschung des Proteins, vor allem im Meerschweinchengewebe, überhaupt möglich wäre.

Wie in den Ergebnissen chronologisch beschrieben, hat sich dieser Antikörper für die vorliegende Arbeit als nützlich und verlässlich erwiesen. Mittels Immunoblot konnte zuerst gezeigt werden, dass neben dem vom menschlichen *MXRA5* kodierten Protein auch das Protein des Meerschweinchens durch den Antikörper erkannt und gebunden werden kann.

Auch in der Immunfluoreszenz der transfizierten HEK-293-Zellen war ein deutlich positives Signal des Antikörpers innerhalb der Zellen zu erkennen. Obwohl ein extrazelluläres Signal zu

erwarten war (Protein aus der EZM), befand es sich intrazellulär, da zu dieser Testung nur das zu erkennende Epitop von Exon 7 in die Zellkultur eingebracht wurde.

Die in der Versuchsreihe zur optimierten Fluoreszenzmikroskopie durchgeführte thermische Demaskierung bestätigte die Wirksamkeit des Antikörpers zusätzlich auf Meerschweinchengewebe.

Bei der Auswahl der Organe für die Immunfluoreszenz wurde sich zunächst an der zuvor in der qRT-PCR ermittelten Genexpression orientiert. Daher fielen einige Organe, wie beispielsweise Duodenum, Gallenblase oder Kleinhirn, aufgrund ihrer geringen RNA-Transkriptlevel aus dieser Versuchsreihe heraus. Exemplarisch erfolgte allerdings eine Antikörperfärbung bei ausgewählten gering exprimierenden Organen, wie Leber und Milz, um mögliche fehlerhafte Schlussfolgerungen auszuschließen. Damit wurde überprüft, ob die RNA-Transkription mit dem Antikörpersignal, also der Protein-Translation, in Zusammenhang steht. Dies konnte in genannten Geweben sowie zusätzlich in der Lunge oder der Retina bestätigt werden.

Es zeigten sich allerdings auch widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich dieser Vermutung. Somit ergaben die Schnitte des Hodens und des Nebenhodens recht gute Antikörpersignale im Bindegewebe trotz geringer Transkriptlevel. Muskelgewebe wie Herzventrikel und Skelettmuskel zeigten schlechte Signale bei hoher Expression.

Anhand dieser Erkenntnisse in den ersten Versuchen der Fluoreszenzmikroskopie, wurden im Folgenden gezielt Gewebe mit gutem Antikörpersignal ausgesucht, um dieses zu optimieren und dadurch bessere Rückschlüsse auf die Lokalisation und Funktion ziehen zu können. Daher wurde sich in den späteren Experimenten vor allem auf die Harnblase und die Niere konzentriert, wobei letztere auch aufgrund des relativ hohen Transkriptlevels von Interesse war.

5.2 Bessere Zugänglichkeit durch Demaskierung?

Die Antikörper-Färbung präsentierte in einigen Geweben bereits ohne vorherige Bearbeitung gute Ergebnisse. So wurde etwa in der Harnblase ein deutliches Signal in den oberen ein bis zwei Urothelzellschichten nachgewiesen. Im Verlauf der Forschungsarbeit wurde untersucht, ob die Möglichkeit bestünde, das Signal durch bestimmte Prozesse zusätzlich zu verstärken oder sogar weitere Signale in den Geweben zu erzielen. Hiermit wollte man der Beantwortung der Frage näherkommen, wie das Protein überhaupt in die oberen Schichten gelangt oder durch welche Zellen es produziert wird.

Die thermische Demaskierung durch Aufkochen der Objektträger in Citratpuffer mit pH 3 hat sich hierbei als geeignete Methode erwiesen. Es ist gelungen, in den tiefer gelegenen Urothelzellschichten der Harnblase ein Signal in Form von kleinen Granula zu erhalten. Es kam zu einer paranukleären Anfärbung in diesen Schichten, mit der man in folgenden Versuchen mögliche Rückschlüsse auf die produzierenden Zellen ziehen könnte. In diesem Zusammenhang wäre auch interessant, welcher Zelltyp für die Produktion des Proteins zuständig ist. Eine Schlussfolgerung aus diesem Versuch könnte sein, dass diese Granula auf dem Weg in die oberen Schichten durch Exozytose in den Extrazellulärraum gelangen. Hier könnte der Inhalt dann mit dem enthaltenen MXRA5-Protein ausgeschüttet werden, um anschließend dort seine Funktion auszuüben.

An diese Ergebnisse angeknüpft, könnte in folgenden Studien untersucht werden, ob MXRA5 auch in den Granula des *Stratum granulosum* neben Keratohyalin (Freeman et al., 2022) enthalten ist oder, ob dieses losgelöst davon in anderen Granula transportiert wird.

5.3 Allgemeine Überlegungen

Die Betrachtung der Ergebnisse lässt schlussfolgern, dass ein starker Zusammenhang zwischen der Expression von MXRA5 und Geweben, die physiologisch Volumenunterschieden ausgesetzt sind, besteht. So könnte MXRA5 als eine Art „Begrenzung“ bei der Ausdehnung eines Organs, wie beispielweise der Harnblase oder der Haut, dienen.

Die Elastizität bestimmter Gewebe muss auch eine Grenze haben, damit die Rückstellkräfte in Form von Elastin-Fasern eine adäquate Funktion ausführen können, und es nicht zu einer Überdehnung kommt. Dies könnte auch durch die starke Ausprägung in der *Lamina elastica interna* von Gefäßen verdeutlicht werden. Die Überlegung wäre daher, ob das Protein MXRA5 als eine Art „Limitator der Ausdehnung“ (Abb. 5-8) fungieren könnte. Infolgedessen würde im Rahmen einer Mutation dieses Gens die Möglichkeit bestehen, dass eine Prädisposition zur Metastasierung oder Aneurysmabildung resultiert (Wang et al., 2013).

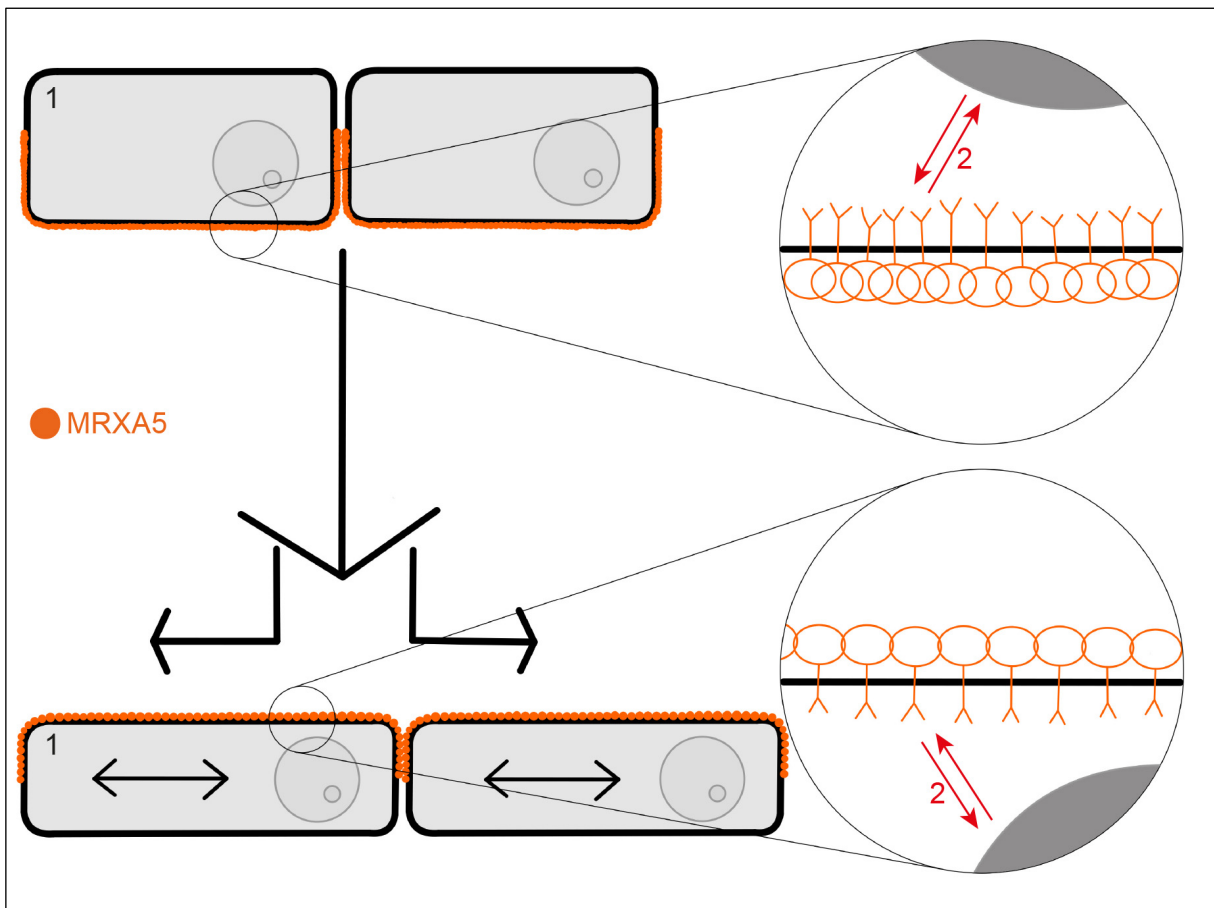


Abbildung 5-1: Mögliche Änderungen des Proteins MXRA5 während der Kontraktion und Relaxation von Epithelzellen

Die Abb. veranschaulicht schematisch die Theorie von MXRA5 als „Limitator der Ausdehnung“; im oberen Bildabschnitt befinden sich die Epithelzellen im kontrahierten Zustand, die Vergrößerung zeigt, dass sich das als Ketten dargestellte Protein MXRA5 dicht gedrängt formiert; im Gegensatz dazu stellt der untere Teil die gleichen Zellen in relaxiertem bzw. ausgedehnten Zustand dar, wobei sich hierbei die Proteine in der Vergrößerung aufgereiht darstellen und somit die Begrenzung des Dehnungszustandes verdeutlichen sollen. 1 beliebige Epithelzelle mit Zellkern, 2 Austausch von Informationen zwischen MXRA5 und Zellkern über Dehnungszustand der Zelle.

Durch den Wegfall der Rückstellkräfte könnte es beispielsweise im Colon auch zu einer Beschädigung der Grenzschiicht im Bindegewebe kommen, was es Tumorzellen erleichtert, diese zu durchdringen und zu metastasieren. Diese Hypothese wird auch durch die Fluoreszenzbilder von Lunge, Colon und Epididymis unterstützt, in welchen sich das Protein als eine geflechtartige Struktur darstellt, die als Abgrenzung und Stütze dienen kann. Dies lässt wiederum vermuten, dass das von MXRA5 kodierte Protein möglicherweise eine stabilisierende Funktion einnimmt. Der Gedanke, dass es als pathologische Folge zu einem Austreten von Tumorzellen durch die *Lamina propria* kommen könnte, wird auch durch Untersuchungen bekräftigt, welche Metastasierungs-Überlegungen hinsichtlich der Mutation des Gens aufstellen (Wang et al., 2013; Yu et al., 2014).

Außerdem könnte es in Gefäßen, trotz Vorhandensein der elastischen Fasern, durch ausbleibende Ausdehnungsbegrenzung zu einem „Ausleihen“ der Gefäßwand kommen, wodurch Aneurysmata oder gar Dissektionen (vgl. Bouchareb et al., 2021) entstehen könnten.

Diese „Stabilitäts-Theorie“ wird auch durch die hohe Expression in der Niere gestützt, die man vor allem in der qRT-PCR auffinden konnte. Das Organgewebe ist aufgrund der starken Durchblutung einer hohen Druckbelastung ausgesetzt und muss kontinuierlich großen Kräften trotzen, weshalb eine hohe Gewebestabilität vorhanden sein muss, um Pathologien entgegenzuwirken. Die Transkriptlevel aus der qRT-PCR zeigen auch einen stärkeren Zusammenhang mit Geweben, die in ihrer natürlichen Funktion Volumenunterschieden ausgesetzt sind, wie die Blase, der Herzmuskel, das Auge, aber auch die Niere.

Die Fluoreszenzbilder der Haut lassen vermuten, dass MXRA5 dort eine stabilisierende Rolle, vielleicht auch Barrierefunktion, einnimmt, was die aufgestellte Theorie zusätzlich stützt.

Anhand der Lokalisation im Fluoreszenzbild befinden sich die Proteine vor allem in den äußersten Schichten von Epithelien und anderen Geweben, wodurch sie vielen auf sie wirkenden Kräften standhalten müssen. Daher sind sie vermutlich auch über Transmembranproteine fest mit der Zelle verbunden, um zu vermeiden, dass sie mit Flüssigkeiten oder anderen einwirkenden Kräften abgetragen werden. Die Kopplung an die Zelle könnte auch zur Informationsweitergabe dienen. Die Interaktion mit Oberflächenmolekülen, wie etwa Transmembranrezeptoren, translatieren ein externes Signal auf eine intrazelluläre Signalkaskade, sodass die Zelle „reagieren“ kann. Sukzessiv könnte man erforschen, mit welchen Transmembranproteinen MXRA5 interagiert, um somit weitere Rückschlüsse auf die Funktion ziehen zu können.

Es wäre also denkbar, dass MXRA5, wie viele andere Extrazellulärmatrixproteine, an der Zellinteraktion teilnimmt, etwa an der Weiterleitung/Signaltransduktion mechanischer Informationen. Ein Beispielorgan wäre diesbezüglich die Blase, bei der sich ein deutliches Fluoreszenzsignal in den obersten Urothelzellschichten zum Lumen hin ergibt (siehe Resultate Abb. 4-7). Hierbei könnte es bei der Blasenfüllung zu einer Weitergabe eines Dehnungssignals an die Zelle kommen, welche sich im Folgenden zum Entgegenwirken gegen die Belastung kontrahiert und somit die Miktion unterstützt.

5.4 Zukünftige tierexperimentelle Untersuchungen

Da sich das Meerschweinchen im Hinblick auf die pseudoautosomale Region und somit auch auf MXRA5 als vielversprechendes Versuchstier erwiesen hat, wären auch eine Vielzahl an Versuchen zur weiteren Erforschung dieses Gens interessant.

Ein Experiment, das diesbezüglich an Epithelgeweben durchgeführt werden könnte, wäre die Untersuchung, wie sich das Protein bei pathologischen Vorgängen verhält. Hierfür könnte man beispielsweise im Bereich der Bauchhaut nach Enthaarung eine kleine oberflächliche Schnittwunde provozieren und daran mit Hilfe der Antikörperfärbung, aber auch der RNA-Transkription mittels qRT-PCR, das Verhalten des Gens und durch Immunfluoreszenzfärbung des Proteins herausfinden; im Folgenden versuchen, wie es sich während der Wundheilung verhält.

Hinsichtlich des Urothels der Harnblase könnte das Verhalten des Proteins bei Überbeanspruchung, beispielsweise durch Überfüllung der Blase, analysiert werden. So bestünde die Möglichkeit, die RNA-Transkriptmengen in den verschiedenen Füllungszuständen zu vergleichen, um eventuelle Unterschiede ermitteln zu können. Eine Betrachtung in der Immunfluoreszenz könnte hilfreich sein. Hierbei wäre eine Lokalisationsänderung des Proteins denkbar, oder es käme zu einem vermehrten Auftreten von signalreichen Granula in den tieferen Urothelzellschichten. Diesbezüglich wäre auch einer Beobachtung des Urothels unter dem Elektronenmikroskop ein Teilversuch, um die Lokalisation eventuell noch genauer zu bestimmen und auch mögliche Änderungen bei Druckbelastung festzustellen. Man könnte MXRA5 gezielt mit Antikörpern markieren, welche an Goldpartikel gebunden sind und somit unter dem Elektronenmikroskop expliziter ausgewertet werden können. Dieses Experiment bezeichnet man als Immungold-Markierung (vgl. Roth et al., 1978; Eskelinen et al., 1988).

Zukünftig bestünde die Möglichkeit auch aufwendigere Untersuchungsdurchführungen zu verrichten. Innerhalb dieses Versuches könnten Knockout-Tiere mit Hilfe der CRISPR/Cas-Methode (Jinek et al., 2012) erzeugt und gezüchtet werden, bei denen die Funktion des MXRA5 ausgeschaltet ist. Dabei wäre interessant, diese Tiere im Hinblick auf die vermuteten Funktionen und die aufgestellte „Stabilitäts-Theorie“ zu erforschen. Kommt es etwa zu einer Vielzahl von Aneurysmata? Treten vermehrt Tumoren bei älteren Tieren auf? Hat sich die Kontraktionskraft der Aorta verändert, da die *Lamina elastica interna* nicht mehr adäquat funktioniert? Letzteres könnte beispielsweise mit Messungen der Kontraktionskraft von Aortenringen genauer untersucht werden (Löhn et al., 2002; Schleifenbaum et al., 2010). All das wären Fragen, die eventuell mittels Knockout-Tieren geklärt werden könnten. Zunächst einmal bleibt jedoch offen, ob die Tiere ohne dieses Gen überhaupt geboren werden können und überlebensfähig sind oder, ob es bereits zu schwerwiegenden phänotypischen Veränderungen in der Fetalentwicklung kommt. Hierzu existieren zum momentanen Zeitpunkt grundsätzlich noch keine Daten zur Bedeutung von MXRA5 während der Embryonalentwicklung. Spekulativ könnte hier etwa geklärt werden, wo MXRA5 in den Genitalorganen vorkommt, und welche Funktion es dort erfüllt. Allerdings wäre es bis dahin wohl noch ein weiter Weg, da aufgrund physiologischer Unterschiede das Knockout-Verfahren beim Meerschweinchen schwieriger zu handhaben ist als bei der klassischen Labormaus.

Prinzipiell wäre dies sicher möglich. Das Verfahren ist jedoch weniger etabliert und herausfordernder, da die Tiere größer sind, kleinere Geburtenzahlen erbringen und somit eine Kohortenbildung schwieriger ist.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, andere Gene, die sich auf der pseudoautosomalen Region befinden, mit Hilfe des Meerschweinchens als Modelltier zu erforschen. Man könnte in der Zukunft versuchen, anhand dessen das *SHOX*-Gen genauer zu untersuchen, um erstmals das Turner-Syndrom in einem Nagetiermodell nachzustellen. Mit *ANOS1* und *CD99* stünden auch noch weitere klinisch relevante Gene zur Verfügung, welche anhand des klassischen Mausmodells bis heute nicht abschließend untersucht werden konnten.

Es wäre also möglich, zunächst analog zu dieser Arbeit eine Grundlagenforschung genannter Gene zu betreiben, um dann später noch weiter in die klinische Forschung überzugehen.

5.5 Diskussion bisheriger Literatur

Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen in einigen Fällen mit den Ergebnissen aus früheren Versuchen überein, allerdings stellen sich in verschiedenen Ansätzen auch deutlich erkennbare Unterschiede dar.

So bestätigt sich beim Betrachten der Fluoreszenzbilder der „Verdacht“, dass es sich um ein Extrazellulärmatrix-Protein handelt. Wie Jonay Poveda et al. 2016 bereits die hohe Expression in der menschlichen Niere nachgewiesen hat, findet sich übereinstimmend dazu beim Meerschweinchen in der qRT-PCR ebenfalls eine hohe Expression an RNA von *MXRA5* verglichen mit dem ubiquitär vorkommenden *ACTB*.

Die immer wiederkehrende Assoziation des Gens mit Tumoren und Metastasierung unterstützt die aufgestellte Theorie über die stabilisierende Funktion von *MXRA5*.

Es werden allerdings auch diverse Unstimmigkeiten der durchgeführten Versuche mit der vorhandenen Literatur ersichtlich. Exemplarisch zu dieser These wurde von Ting Yu et al. (2014) beschrieben, dass *MXRA5* in nahezu allen gesunden Colongewebe abwesend war und daher als Biomarker für CRC (kolorektales Karzinom) verwendet werden könnte. Gerade die Aufstellung einer RNA-Datenbank des Meerschweinchengewebes mittels qRT-PCR zeigte aber demgegenüber, dass eine Transkription von *MXRA5* in allen Geweben der Tiere zu finden war. Zwar gab es Unterschiede in der Expression, die Aussage, es käme im gesunden Gewebe kaum vor, wird hierdurch jedoch fragwürdig.

Bei den meisten Versuchen, die sich mit der Expression des Gens beschäftigten, kam es auch lediglich zu einer Auswertung in Datenbanken vorhandener Messwerte. Auch die Tatsache, dass in fast jedem Gewebe ein Signal in der Fluoreszenzmikroskopie zu erkennen war,

verdeutlicht dies. Aufgrund dessen erweist sich die Nutzung von MXRA5 als Biomarker als kompliziert. Bei deutlicher Herauf- oder Herabregulation im pathologischen Zustand wäre dies jedoch noch immer möglich. Eine Erforschung des Gens/Proteins in Bezug auf den Nachweis von Karzinomen oder die Metastasierung wäre eher mittels Ausschaltung des Gens im Tierversuch möglich.

Auffällig ist auch, dass es bei den Untersuchungen von Guang-Hui Wang et al. (2013) zum CRC und von He Xiao et al. (2020) zur Prostatahyperplasie im Rahmen der Antikörperfärbung vor allem zu einem intrazellulären Signal im Zytoplasma der Zellen gekommen ist. Auch bei Sun et al. (2021) werden, in einem Artikel über MXRA5 als Biomarker für Gliome, intrazelluläre Signale in der Fluoreszenzmikroskopie beschrieben.

Wie in den Ergebnissen aufgeführt, kommt es bei den hier beschriebenen Versuchen vor allem zu Signalen außerhalb der Zellen, etwa im Bindegewebe oder um die Zellen der Epithelien herum. Der verwendete Antikörper wurde mit Hilfe des Immunoblots bezüglich seiner Spezifität und Sensitivität etabliert und färbt somit mit hoher Wahrscheinlichkeit das richtige Protein in den Geweben an. Daher kommt die Frage auf, ob es sich bei den genannten Untersuchungen möglicherweise um einen nicht ausreichend erprobten Antikörper handelte, welcher dann in der Folge das falsche Epitop anfärbte. Dies würde jedenfalls erklären, warum es zu einem Signal in anderen Zellkompartimenten kam. Zu einem intrazellulären Signal kam es in der hier vorliegenden Forschungsarbeit nur in Form von kleinen Granula nach der thermischen Demaskierung, welche bei genannten Versuchen nicht erfolgt war, und sehr wahrscheinlich das naszierende Protein vor der Exozytose markierte.

In der zuletzt genannten Arbeit (Sun et al., 2021) wird MXRA5 zudem als sezerniertes Glykoprotein aus der MXRA-Familie bezeichnet. Über die Sekretion und Freisetzung des Proteins ist allerdings bisher wenig bekannt, auch die Bezeichnung als Glykoprotein wirft Fragen auf. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, existiert keine wirkliche MXRA-Familie. Hierzu sind lediglich drei Gene bekannt, die in Aufbau und Funktion wenig Gemeinsamkeiten besitzen. Anhand dieser Kritikpunkte könnte man, wie bereits zuvor beschrieben, ebenfalls vermuten, dass es sich lediglich um eine Auswertung bereits vorhandener Messwerte aus Datenbanken handeln könnte, und somit das Protein MXRA5 gar nicht genauer untersucht wurde.

Rihab Bouchared und Koautoren präsentieren 2021 in einer der neuesten Studien zu MXRA5, neben anderen Extrazellulärmatrixproteinen, als einen potentiellen Biomarker für kalzifizierte Aortenklappenstenosen. Diese neue Erkenntnis stützt erneut die aufgestellte Theorie der stabilisierenden Wirkung des Proteins. Etwas widersprüchlich ist in diesem Fall jedoch, dass es zu einer deutlichen Erhöhung der Proteinwerte kommt. Dies könnte etwa dadurch erklärt werden, dass die Proteinmenge als mögliche Antwort auf einen physiologischen Stimulus ansteigt. Allerdings handelt es sich dabei nur um die absolute Menge des vorhandenen

Proteins. Es wurde nicht nachgewiesen, ob möglicherweise eine Veränderung dessen vorliegt, die mit einer möglichen Strukturänderung und folgendem Funktionsverlust einhergehen könnte.

Zusammenfassend lässt sich zu der bereits vorhandenen Literatur sagen, dass es sich in den meisten Fällen lediglich um die Auswertung von Messwerten aus bestehenden Protein- oder DNA-Datenbanken handelt oder gemessene Werte verwendet werden. Dabei wurde nie eine biologische Analyse des Gens und des Proteins durchgeführt, sondern diese lediglich mit gewissen Sonden ausgewertet, welche Sequenzen aus dem humanen Genomprojekt nachweisen können. Bisher wurde auch nicht untersucht, wo sich das Protein MXRA5 in den einzelnen Geweben genau befindet, von welchen Zellen es produziert wird, geschweige denn, welche Funktion es überhaupt ausübt. Mithilfe der hier dargestellten Ergebnisse soll versucht werden, diese Fragen teilweise zu beantworten. Hinsichtlich der Funktion sind allerdings noch weitaus mehr Versuche nötig.

Problematisch bei der Versuchsauswertung ist auch, gerade im Hinblick auf die qRT-PCR, dass hierbei durch die mRNA nur die Aktivität des Gens in den verschiedenen Geweben dargestellt wird, welche jedoch nicht direkt mit dem Vorhandensein des daraus kodierten Proteins korreliert.

5.6 Struktur des Proteins

Zur Struktur des Proteins MXRA5 ist, wie bereits in der Einleitung beschrieben, bisher bekannt, dass es unter anderem aus sieben Leucin-rich-repeat-Domänen, LRR-Domänen, und zwölf Immunglobulin ähnlichen Regionen (IgG-Domänen) besteht. Anhand bestimmter Experimente, bei denen eine Art Linearbeschleuniger verwendet wird, kann man kristallographisch die Raumstruktur des Proteins ermitteln, welche auch Rückschlüsse über gewisse Funktionen geben kann.

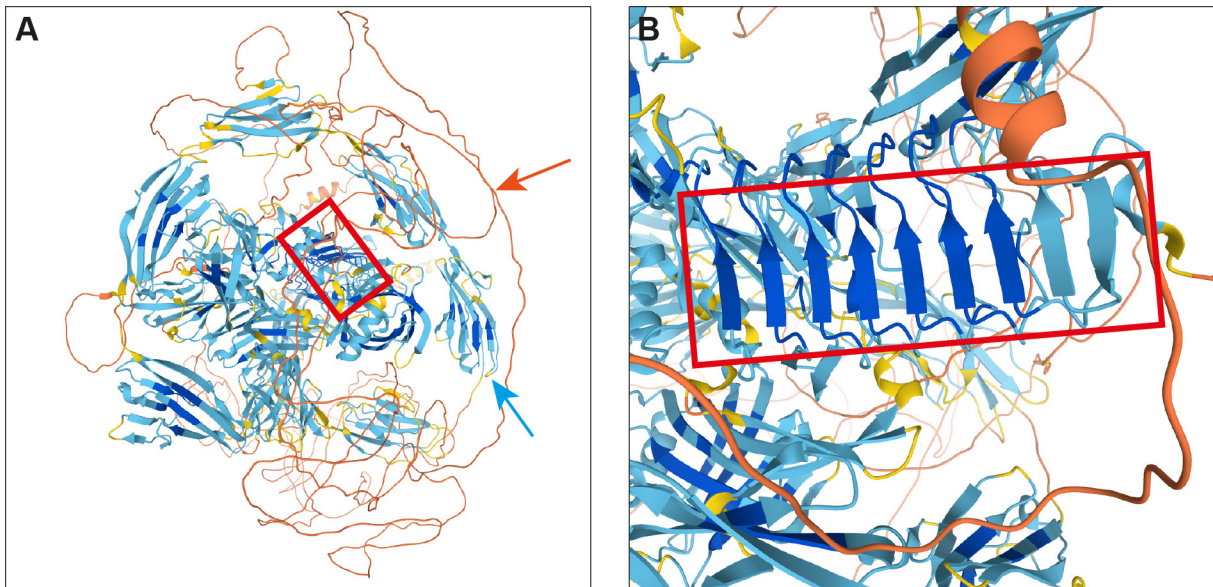


Abbildung 5-2: Räumliche Struktur des Proteins MXRA5

(A) zeigt die Struktur des gesamten Proteins; die orangefarbenen Linien (exemplarisch in (A) mit orangem Pfeil markiert) verdeutlichen Bereiche des Proteins, die hinsichtlich ihres Aufbaus noch nicht vollends erforscht sind, was bei MXRA5 zu einem großen Teil zutrifft. Der blaue Pfeil zeigt auf die Bereiche, welche strukturell bereits bekannt sind. Das rote Viereck umgibt den Proteinabschnitt, der in (B) vergrößert dargestellt wird; hierbei ist eine sehr regelmäßige Strukturabfolge innerhalb des Proteins zu erkennen, welche der Leucin-rich-repeat Region entspricht. Quelle: <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/F1QPU8>

In Abbildung 5-2 ist diese Raumstruktur im Überblick zu sehen, die allerdings durch künstliche Intelligenz durch das Programm AlphaFold vorhergesagt wurde. Hierbei werden große Teile des Proteins durch orangefarbene Linien verkörpert, was verdeutlichen soll, dass in diesen Bereichen die Darstellung noch zu ungenau erforscht ist. Diese Ungenauigkeit kann dadurch zustande kommen, dass es noch keine Referenzstrukturen für die entsprechende Aminosäuresequenz gibt, die strukturell biologisch aufgeschlüsselt wurden. In der isolierten Probe liegt das Protein in unstrukturierter Form vor und geht somit keine Bindungen mit anderen Liganden ein.

Allerdings existieren auch Regionen, deren Raumstruktur bereits exakt bestimmt werden konnten. So kann man in Abb. 5-2 beispielsweise erkennen, dass der markierte Bereich der Leucin-rich-repeat-Domänen eine sehr geordnete, fast leiterartige Raumstruktur einnimmt, während die IgG-Domänen nicht ganz so deutlich hervorstechen.

Diese beiden Strukturbesonderheiten lassen auch Rückschlüsse als Protein-Protein-Anbindungsstelle zu. Somit könnte die funktionelle Form durch Interaktionen auch im Gewebe verändert erscheinen und daher nochmal von bisherigen Erkenntnissen abweichen.

5.7 Vergleich von *Homo sapiens*, *Cavia porcellus* und *Cavia tschudii* hinsichtlich des Gens *MXRA5*

Im Vorfeld der Versuche war die Gensequenz des Berg-Meerschweinchens (*Cavia tschudii*), bis auf Exon 3, bereits bekannt. Aufgrund der besseren Zugänglichkeit war es von Interesse diese für das Hausmeerschweinchen (*Cavia porcellus*) zu bestimmen. Als eng verwandte Spezies sind sich beide zwar sehr ähnlich, es bestehen jedoch auch mögliche Unterschiede. *C. porcellus* steht zudem als kommerziell zu erwerbendes Labortier zur Verfügung, was die Ermittlung der Sequenz zusätzlich rechtfertigt.

Zum Vergleich der Sequenzen beider *Cavia*-Spezies wurde die Webseite <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/> verwendet. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Sequenzen zu gewährleisten, wurde das zuvor bei *C. porcellus* sequenzierte Exon 3 auch für *C. tschudii* eingesetzt, da davon ausgegangen wurde, dass die Unterschiede der beiden Gene - wenn überhaupt - sehr gering sind. Diese Vermutung bestätigt sich auch im Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen. Bei einer Gengröße von 9012 Nukleotiden zeigt sich lediglich in 81 Fällen ein Unterschied der Basen, was etwa 0,9% entspricht. Bei den Aminosäuren sind es mit 35 von 3003 ca. 1,1%. Dies verdeutlicht die Ähnlichkeit der beiden Spezies hinsichtlich des Gens *MXRA5* und des daraus kodierten Proteins.

Die Gegenüberstellung der Gene von *C. porcellus* und Mensch ist für die weitere Forschung entscheidend, da sie auch Rückschlüsse darüber geben kann, inwiefern das Meerschweinchen als geeignetes Versuchstier zur Verfügung steht.

Beim Vergleich der Gene von *C. porcellus* und Mensch mit Hilfe zuvor genannter Webseite ist zu erkennen, dass die Gensequenzen sich im ersten und letzten Drittel des Gens nur sehr gering voneinander unterscheiden. In diesen Bereichen befinden sich die LRR-Domänen und IgG-Domänen, welche in beiden Genomen ähnlich aufgebaut sind. Dazwischen sind bei *C. porcellus* auf Exon 5 zahlreiche repetitive Sequenzen lokalisiert, die im humanen Gen fehlen.

Die beiden ähnlich aufgebauten Domänen, nämlich die LRR- und die IgG-Domänen, dienen der Proteininteraktion, und sind somit vermutlich der ausschlaggebende Genabschnitt, welcher die Funktion des Proteins *MXRA5* bestimmt. Zudem könnte man schlussfolgern, dass der Zwischenbereich mit den repetitiven Sequenzen weniger wichtig für die Funktion des Gens ist. Dieser Bereich könnte jedoch für die Struktur und Stabilität von Bedeutung sein, da er zahlreiche GC-reiche Sequenzen enthält, die für eine thermodynamische Stabilität sorgen (Galtier et al., 1997; Yakovchuk et al. 2006).

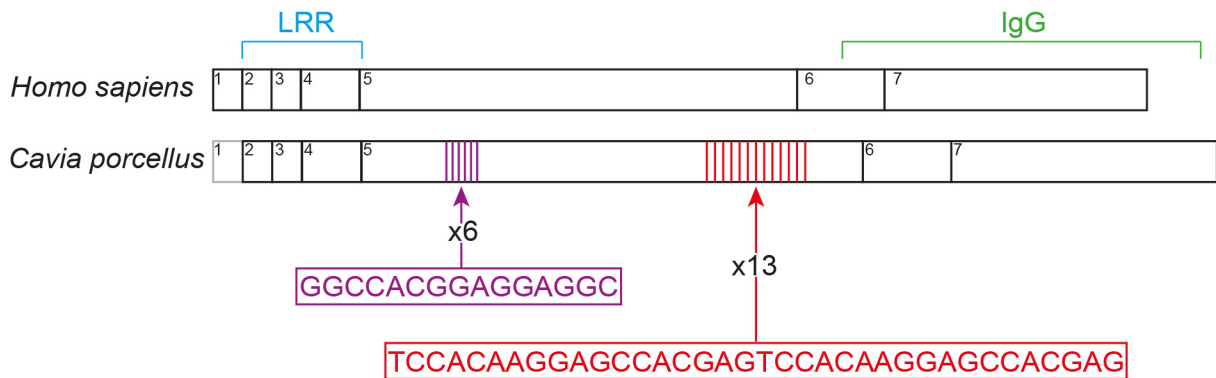


Abbildung 5-3: Schematischer Vergleich der kodierenden Regionen von MXRA5 bei Mensch und *Cavia porcellus*

Die Abb. zeigt eine Aneinanderreihung der Exons beider Spezies. Die Größe der Exons entspricht nicht der exakten Realität und soll nur die Größenverhältnisse darstellen; außerdem wurde sich bei der Nummerierung am humanen Gen orientiert und das bei *C. porcellus* abwesende Exon 1 grau hinterlegt. Die unterschiedliche Länge der Gene kommt dadurch zustande, dass bei *C. porcellus* auf Exon 5, wie in der Abb. rot und violett markiert, zahlreiche repetitive Sequenzen lokalisiert sind, und diese im humanen Gen fehlen. In den farbigen Kästen ist die jeweilige repetitive Sequenz aufgeführt. Die übrigen Exone sind allerdings ähnlicher aufgebaut und in beiden Spezies befinden sich im ersten Drittel die leucin-rich-repeat-Domänen (LRR) und im letzten Drittel die IgG-Domänene (IgG).

Bei der Betrachtung der Gensequenzen hat sich zusätzlich gezeigt, dass die Nummerierung der Exons unglücklich gewählt ist. In beiden Meerschweinchenspezies existiert kein Exon 1 und es wird somit mit Exon 2 begonnen. Auch beim Menschen liegt der Transkriptionsstart wahrscheinlich auf Exon 2, sodass die Nummerierung willkürlich ist. Daher wäre es sinnvoll, die bisherige Nummerierung zu überdenken, sodass sich die kodierende Region von *MXRA5* nur aus 6 Exonen zusammensetzt und in verschiedenen Spezies zusätzliche 5'UTR (nicht kodierende Abschnitte) alternativ bezeichnet werden, wie bspw. für *SCNN1D* im Meerschweinchen beschrieben (Gettings et al., 2021).

In der vorliegenden Arbeit wurden allerdings aufgrund des Umfangs zunächst nur vereinzelte Gewebe genauer untersucht. Da zahlreiche weitere Gewebe bisher nicht genauer erforscht wurden, stehen in der weiteren Forschung einige Analysen aus. Somit steht die genaue Erforschung des Gens *MXRA5* und des daraus kodierten Proteins ganz am Anfang. Mit *Cavia porcellus*, dem Hausmeerschweinchen, hat sich ein geeignetes Tier gefunden, das für die Forschung gut nutzbar zur Verfügung stünde. Gerade bezogen auf *MXRA5*, ein „unterforschtes“ klinisch relevantes Gen, steht die Forschung ganz am Anfang und könnte am Meerschweinchenmodell gezielt weitergeführt werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Al-Mubarak, B., Abouelhoda, M., Omar, A., AlDhalaan, H., Aldosari, M., Nester, M., Alshamrani, H. A., El-Kalioby, M., Goljan, E., Albar, R., Subhani, S., Tahir, A., Asfahani, S., Eskandrani, A., Almusaiab, A., Magrashi, A., Shinwari, J., Monies, D., & Al Tassan, N. (2017). Whole exome sequencing reveals inherited and de novo variants in autism spectrum disorder: a trio study from Saudi families. *Scientific reports*, 7(1), 5679.
2. Bouchareb, R., Guauque-Olarte, S., Snider, J., Zaminski, D., Anyanwu, A., Stelzer, P., & Lebeche, D. (2021). Proteomic Architecture of Valvular Extracellular Matrix: FNDC1 and MXRA5 Are New Biomarkers of Aortic Stenosis. *JACC. Basic to translational science*, 6(1), 25–39.
3. Chen, J. F., Lu, F., Chen, S. S., & Tao, S. H. (2006). Significant positive correlation between the recombination rate and GC content in the human pseudoautosomal region. *Genome*, 49(5), 413–419.
4. de Harven, E., Leung, R., & Christensen, H. (1984). A novel approach for scanning electron microscopy of colloidal gold-labeled cell surfaces. *The Journal of cell biology*, 99(1 Pt 1), 53–57. <https://doi.org/10.1083/jcb.99.1.53>
5. Enkhbayar, P., Kamiya, M., Osaki, M., Matsumoto, T., & Matsushima, N. (2004). Structural principles of leucine-rich repeat (LRR) proteins. *Proteins*, 54(3), 394–403.
6. Eskelinen, S., & Peura, R. (1988). Location and identification of colloidal gold particles on the cell surface with a scanning electron microscope and energy dispersive analyzer. *Scanning microscopy*, 2(3), 1765–1774.
7. Flaquer, A., Rappold, G. A., Wienker, T. F., & Fischer, C. (2008). The human pseudoautosomal regions: a review for genetic epidemiologists. *European journal of human genetics : EJHG*, 16(7), 771–779.
8. Filatov D. A. (2004). A gradient of silent substitution rate in the human pseudoautosomal region. *Molecular biology and evolution*, 21(2), 410–417.
9. Freeman, S. C., & Sonthalia, S. (2022). Histology, Keratohyalin Granules. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

10. Galtier, N., & Lobry, J. R. (1997). Relationships between genomic G+C content, RNA secondary structures, and optimal growth temperature in prokaryotes. *Journal of molecular evolution*, 44(6), 632–636. <https://doi.org/10.1007/pl00006186>
11. Galtier N. (2004). Recombination, GC-content and the human pseudoautosomal boundary paradox. *Trends in genetics : TIG*, 20(8), 347–349.
12. Gettings, S. M., Maxeiner, S., Tzika, M., Cobain, M., Ruf, I., Benseler, F., Brose, N., Krasteva-Christ, G., Vande Velde, G., Schönberger, M., & Althaus, M. (2021). Two Functional Epithelial Sodium Channel Isoforms Are Present in Rodents despite Pronounced Evolutionary Pseudogenization and Exon Fusion. *Molecular biology and evolution*, 38(12), 5704–5725.
13. Graves, J. A., Wakefield, M. J., & Toder, R. (1998). The origin and evolution of the pseudoautosomal regions of human sex chromosomes. *Human molecular genetics*, 7(13), 1991–1996.
14. Graves J. (2016). Why sex?. *The lancet. Diabetes & endocrinology*, 4(9), 727–729.
15. Huang, S. W., Friedman, R., Yu, N., Yu, A., & Li, W. H. (2005). How strong is the mutagenicity of recombination in mammals?. *Molecular biology and evolution*, 22(3), 426–431.
16. Jia, C., Zhang, F., Zhu, Y., Qi, X., & Wang, Y. (2017). Public data mining plus domestic experimental study defined involvement of the old-yet-uncharacterized gene matrix-remodeling associated 7 (MXRA7) in physiopathology of the eye. *Gene*, 632, 43–49.
17. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6096), 816–821.
18. Kanojia, D., Nagata, Y., Garg, M., Lee, D. H., Sato, A., Yoshida, K., Sato, Y., Sanada, M., Mayakonda, A., Bartenhagen, C., Klein, H. U., Doan, N. B., Said, J. W., Mohith, S., Gunasekar, S., Shiraishi, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Miyano, S., Myklebost, O., ... Koeffler, H. P. (2015). Genomic landscape of liposarcoma. *Oncotarget*, 6(40), 42429–42444.

19. Karamanos, N. K., Theocharis, A. D., Neill, T., & Iozzo, R. V. (2019). Matrix modeling and remodeling: A biological interplay regulating tissue homeostasis and diseases. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*, 75-76, 1–11.
20. Kiflemariam, S., Ljungström, V., Pontén, F., & Sjöblom, T. (2015). Tumor vessel up-regulation of INSR revealed by single-cell expression analysis of the tyrosine kinome and phosphatome in human cancers. *The American journal of pathology*, 185(6), 1600–1609.
21. Lee, K. J., Lee, S. H., Yadav, B. K., Ju, H. M., Kim, M. S., Park, J. H., Jeoung, D., Lee, H., & Hahn, J. H. (2012). The activation of CD99 inhibits cell-extracellular matrix adhesion by suppressing $\beta(1)$ integrin affinity. *BMB reports*, 45(3), 159–164.
22. Li, S., & Xu, W. (2019). Mining TCGA database for screening and identification of hub genes in kidney renal clear cell carcinoma microenvironment. *Journal of cellular biochemistry*, 10.1002/jcb.29511.
23. Löhn, M., Dubrovskaja, G., Lauterbach, B., Luft, F. C., Gollasch, M., & Sharma, A. M. (2002). Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(9), 1057–1063.
24. Maxeiner, S., Benseler, F., Krasteva-Christ, G., Brose, N., & Südhof, T. C. (2020). Evolution of the Autism-Associated Neuroligin-4 Gene Reveals Broad Erosion of Pseudoautosomal Regions in Rodents. *Molecular biology and evolution*, 37(5), 1243–1258.
25. Maxeiner, S., Gebhardt, S., Schweizer, F., Venghaus, A. & Krasteva-Christ, G. 2021. Of Mice and Men – and Guinea Pigs?
26. Nie, M., Xu, H., Chen, R., Mao, J., Wang, X., Xiong, S., Zheng, J., Yu, B., Cui, M., Ma, W., Huang, Q., Zhang, H., & Wu, X. (2017). Analysis of genetic and clinical characteristics of a Chinese Kallmann syndrome cohort with *ANOS1* mutations. *European journal of endocrinology*, 177(4), 389–398.
27. Ning, J., Shen, Y., Wang, T., Wang, M., Liu, W., Sun, Y., Zhang, F., Chen, L., & Wang, Y. (2018). Altered expression of matrix remodelling associated 7 (MXRA7) in psoriatic

- epidermis: Evidence for a protective role in the psoriasis imiquimod mouse model. *Experimental dermatology*, 27(9), 1038–1042.
28. Noonan, D. M., Fulle, A., Valente, P., Cai, S., Horigan, E., Sasaki, M., Yamada, Y., & Hassell, J. R. (1991). The complete sequence of perlecan, a basement membrane heparan sulfate proteoglycan, reveals extensive similarity with laminin A chain, low density lipoprotein-receptor, and the neural cell adhesion molecule. *The Journal of biological chemistry*, 266(34), 22939–22947.
29. Poveda, J., Sanz, A. B., Fernandez-Fernandez, B., Carrasco, S., Ruiz-Ortega, M., Cannata-Ortiz, P., Ortiz, A., & Sanchez-Niño, M. D. (2017). MXRA5 is a TGF- β 1-regulated human protein with anti-inflammatory and anti-fibrotic properties. *Journal of cellular and molecular medicine*, 21(1), 154–164.
30. Raudsepp, T., & Chowdhary, B. P. (2015). The Eutherian Pseudoautosomal Region. *Cytogenetic and genome research*, 147(2-3), 81–94.
31. Roth, J., & Binder, M. (1978). Coloidal gold, ferritin and peroxidase as markers for electron microscopic double labeling lectin techniques. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 26(3), 163–169.
32. Schleifenbaum, J., Köhn, C., Voblova, N., Dubrovskaya, G., Zavarirskaya, O., Gloe, T., Crean, C. S., Luft, F. C., Huang, Y., Schubert, R., & Gollasch, M. (2010). Systemic peripheral artery relaxation by KCNQ channel openers and hydrogen sulfide. *Journal of hypertension*, 28(9), 1875–1882.
33. Schneider, K. U., Sabherwal, N., Jantz, K., Röth, R., Muncke, N., Blum, W. F., Cutler, G. B., Jr, & Rappold, G. (2005). Identification of a major recombination hotspot in patients with short stature and SHOX deficiency. *American journal of human genetics*, 77(1), 89–96.
34. Theocharis, A. D., Manou, D., & Karamanos, N. K. (2019). The extracellular matrix as a multitasking player in disease. *The FEBS journal*, 286(15), 2830–2869.
35. Wang, G. H., Yao, L., Xu, H. W., Tang, W. T., Fu, J. H., Hu, X. F., Cui, L., & Xu, X. M. (2013). Identification of MXRA5 as a novel biomarker in colorectal cancer. *Oncology letters*, 5(2), 544–548.

36. Weller, P. A., Critcher, R., Goodfellow, P. N., German, J., & Ellis, N. A. (1995). The human Y chromosome homologue of XG: transcription of a naturally truncated gene. *Human molecular genetics*, 4(5), 859–868.
37. Weng, T. Y., Wang, C. Y., Hung, Y. H., Chen, W. C., Chen, Y. L., & Lai, M. D. (2016). Differential Expression Pattern of THBS1 and THBS2 in Lung Cancer: Clinical Outcome and a Systematic-Analysis of Microarray Databases. *PloS one*, 11(8), e0161007
38. Xiao, H., Jiang, Y., He, W., Xu, D., Chen, P., Liu, D., Liu, J., Wang, X., DiSanto, M. E., & Zhang, X. (2020). Identification and functional activity of matrix-remodeling associated 5 (MXRA5) in benign hyperplastic prostate. *Aging*, 12(9), 8605–8621.
39. Xiong, D., Li, G., Li, K., Xu, Q., Pan, Z., Ding, F., Vedell, P., Liu, P., Cui, P., Hua, X., Jiang, H., Yin, Y., Zhu, Z., Li, X., Zhang, B., Ma, D., Wang, Y., & You, M. (2012). Exome sequencing identifies MXRA5 as a novel cancer gene frequently mutated in non-small cell lung carcinoma from Chinese patients. *Carcinogenesis*, 33(9), 1797–1805.
40. Yakovchuk, P., Protozanova, E., & Frank-Kamenetskii, M. D. (2006). Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucleic acids research*, 34(2), 564–574. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj454>
41. Yu, T., Lu, Q., Ou, X., Cao, D., & Yu, Q. (2014). Association of sedentary behavior with the expression levels of biomarkers in colorectal cancer: clinical analysis of 228 patients. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 232(3), 167–176
42. Zhang, R., Kim, A. S., Fox, J. M., Nair, S., Basore, K., Klimstra, W. B., Rimkunas, R., Fong, R. H., Lin, H., Poddar, S., Crowe, J. E., Jr, Doranz, B. J., Fremont, D. H., & Diamond, M. S. (2018). Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. *Nature*, 557(7706), 570–574.
43. Zhang, R., Earnest, J. T., Kim, A. S., Winkler, E. S., Desai, P., Adams, L. J., Hu, G., Bullock, C., Gold, B., Cherry, S., & Diamond, M. S. (2019). Expression of the Mxra8 Receptor Promotes Alphavirus Infection and Pathogenesis in Mice and Drosophila. *Cell reports*, 28(10), 2647–2658.e5.
44. Zhou, Z., Shen, Y., Yin, J., Xi, F., Xu, R., Lin, D., Saijilafu, Chen, J., & Wang, Y. (2019). Matrix remodeling associated 7 promotes differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells toward osteoblasts. *Journal of cellular physiology*, 234(10), 18053–18064.

7. Anhang

7.1 Posterbeitrag für 115th Annual Meeting Innsbruck (2021)

Of mice and men – and guinea pigs! Assessing expression and localization of enigmatic MXRA5

Frederick Schweizer, Gabriela Krasteva-Christ, and Stephan Maxeiner

Introduction:

The human *MXRA5* gene is located on the X-chromosome immediately adjacent to the pseudoautosomal region present on both sex chromosomes. Bioinformatical analysis assigns *MXRA5* a role as a potential extracellular matrix protein. Sparse information is available about its function due to its absence in laboratory rodents (mice/rats). We have previously shown that this is owed to its peculiar genomic localization. Genomic association studies suggest its involvement in several pathologies, e.g., tumor metastasis. *MXRA5* is present in guinea pigs. We aim at determining its tissue and cellular expression pattern as a first step to further elucidate its role underlying clinical pathologies.

Methods:

We employed a wide range of DNA cloning and RNA quantification techniques to identify all *MXRA5* exons and its genomic organization. Transcript levels in over twenty selected tissues have been assessed by qRT-PCR. Means of immunodetection (IB/IF) were applied comparing the antigenicity of human and guinea pig *MXRA5* in cell culture using commercial *MXRA5* antibodies prior to IF analyses on frozen tissue sections.

Results:

The transcriptional start of *MXRA5* and the sequence of its seven exons were experimentally determined. *MXRA5* transcripts were present in a range of tissues peaking highest in the kidney. Immunofluorescent staining demonstrates extracellular localization, prominently around distinct layers of pseudo-/stratified epithelia.

Conclusion:

Absence of *MXRA5* in favored rodent research models has hampered elucidating its function as well as its role in clinical pathologies. Using guinea pigs, we have successfully established a toolkit in a rodent research model to further assess its function and potential role in human pathologies.



Of mice and men – and guinea pigs! Assessing expression and localization of enigmatic *MXRA5*

Frederick Schweizer, Gabriela Krasteva-Christ and Stephan Maxeiner.

Introduction

The human *MXRA5* gene is located on the X-chromosome immediately adjacent to the pseudoautosomal region present on both sex chromosomes.

Bioinformatical analysis assigns *MXRA5* a role as a potential extracellular matrix protein. Sparse information is available about its function due to its absence in laboratory rodents (mice/rats) [1]. We have previously shown that this is owed to its peculiar genomic localization.

Genomic association studies suggest its involvement in several pathologies, e.g., tumor metastasis. *MXRA5* is present in guinea pigs. We aim at determining its tissue and cellular expression pattern as a first step to further elucidate its role underlying clinical pathologies.

Figure 1

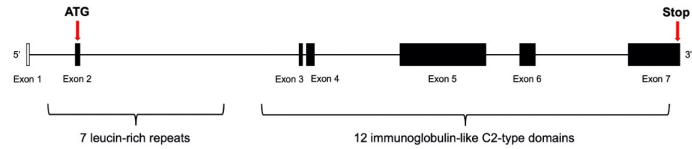
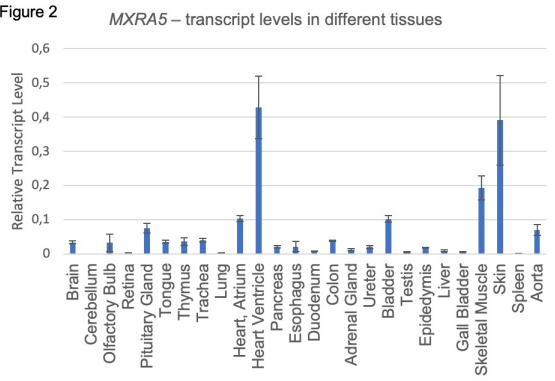


Figure 1 - The coding region of human *MXRA5* is composed of 7 exons, which in total consist of about 7000 base pairs. This codes for a 2828 amino acid extracellular matrix protein that includes the following domains:

- ATG as start codon on Exon 2
- 7 leucin-rich repeats on the first third n-terminal → contribute to an α/β -horseshoe
- 12 immunoglobulin-like C2-type domains → possible receptor

Figure 2



Methods

We employed a wide range of DNA cloning and RNA quantification techniques to identify all *MXRA5* exons and its genomic organization. Transcript levels in over twenty selected tissues have been assessed by qRT-PCR. Means of immunodetection (IB/IF) were applied comparing the antigenicity of human and guinea pig *MXRA5* in cell culture using commercial *MXRA5* antibodies prior to IF analyses on frozen tissue sections.

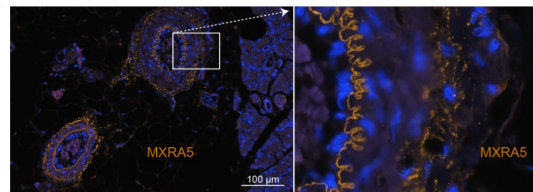


Figure 3 – arterial vessels in duodenum (guinea pig)

Results – quantitative RT-PCR

Using the partially known *MXRA5* sequence of the neighboring species *Cavia tschudii*, we succeeded in experimentally determining the sequence in the guinea pig (*Cavia porcellus*) and the transcriptional start of *MXRA5*.

After sequencing and cloning the gene, a suitable assay for the following qRT-PCR was determined spanning exon 4/5. Relative transcript levels were set in relation to the ubiquitous *ACTINB*.

Figure 2 shows the high expression in more compact tissues such as the skin or the cardiac ventricle peaking highest in the kidney (14-fold of *ACTINB*, not shown). In contrast, it is hardly detectable in neuronal tissues such as the cerebellum and the retina.

Immunofluorescence (I)

After testing a commercial *MXRA5* antibody in immunoblot and cell culture, we applied it on different guinea pig tissues.

Results – Immunfluorescence (II)

Immunofluorescent staining demonstrates already extracellular localization, prominently around distinct layers of pseudo-/stratified epithelia and in connective tissue.

As shown in Figure 3, e.g., there is a clear signal in the region of the *lamina elastica interna* in arterial vessels. In addition, staining can also be seen in the adventitia.

Figure 4 shows the staining of MXRA5 in the guinea pig bladder urothelium. There is a clear signal in the upper layers with isolated granules in deeper urothelial layers.

The localization in the tissue suggests that *MXRA5* could contribute to stability, which could also explain various pathologies. However, the more precise function is still part of further research.

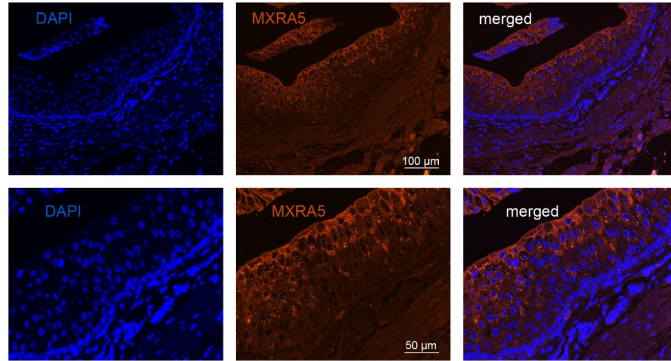


Figure 4 – bladder urothelium (guinea pig)

Conclusion

Absence of *MXRA5* in favored rodent research models has hampered elucidating its function as well as its role in clinical pathologies. Using guinea pigs, we have successfully established a toolkit in a rodent research model to further assess its function and potential role in human pathologies.

Reference

[1] MAXEINER S, Gebhardt S, Schweizer F, Venghaus AE, Krasteva-Christ G (2021) Of mice and men - and guinea pigs? Ann Anat. 238:151765

7.2 Final ermittelte Nukleotidsequenz von *MXRA5* (*Cavia porcellus*)

Die Exons sind durch Absätze voneinander getrennt. Gelb markiert sind Start- (ATG) und Stoppcodon (TGA), grau unterlegt ist 5' untranslatierter Bereich.

In Exon 5 ist zu Beginn ein Teil dunkelgrün eingefärbt. Hier wurde der Primer vom Intron abgeleitet, da es stromaufwärts keine Information genomischer DNA gab. In hellgrün wurden die für die Sequenzierung verwendeten Primer hervorgehoben. In Klammern stehen die vorläufigen Bezeichnungen, die von NCBI nach Einreichung vergeben wurden.

mMXRA5 *Cavia porcellus*

>Exon 2 (OP925066)

```
CGCAGTAGCACTTTGACAGCTGGGGACTGAGGAACAGTTTCTCCAAAATGGTTTTCTGAGGTTGTTTTCAAAC
TCAAACACACACACGGATTCTGCTTTGCTGTTTCGAAAGCAGTGAAGGATTTTCAGGGGCTCAGCCGCCAGCAC
CCTCCGTCACCACCCTGCCCTCCTCGTCCCTCCCCACGTCCTGTCTCTGCACGTCCTGTCTCTGCACCTCC
CCTGGGCTTGTCTCTTGCACGCTGATCTTGCACAGTACGACCCAGCGAGATGCCCGAACCTCCTATCCTAGTC
GAAGCAGAAAACCCGGTTGTGTCCACGAGTTGAGGCTGGTTTGCAGAGGTGACCCACCGTGCCGAGTTTCTGTG
TTTCTCAGGCCACGGTTTAGGCGCCCGTGGGGTCTCGCAGCAGCTGCCAGTTGGCATGCGGTGCCAGGCGG
GAGCCCGCAGGCCCGGGCCCGGCCCCAGGAGGAGCTACCGTGCCCTTCTCCCGCAGGTCCTCTGAGCTT
CGAACCCGGACACCATGAGAGCAGGCGGTGCCCTGGGGGGCGCTCTCCCGGCTGCTGATCGTCATCTGGGGCC
ACCCGCGAGTGGCCCGGCTGTCCCAACCGTGTGCTGCTACGTGCCAGCGAGGTCCACTGCACCTTCCGGT
CCCTGCCTGCCGTGCCCGGGCATCTCCAAACAGGTGGAGAGGATCAACTTGGG
```

>Exon 3 (OP925066)

```
GTTCACAGCATCCAGGCCATCTCGGAGACGTCCCTTTCAGGGCTGAGCAAGCTGGAGCTGCTTATGATCCACGG
CAATGACATTCACAGCATCCCCGACCGAGCCTTGAGGGACCTCAGCTCCCTGCAG
```

>Exon 4 (OP925066)

```
GTCTTCAAATTCAGCTACAACAAGCTGCGCGTGGTCCACGGGGAAACCTTCCGGGGCCTGTGCGGGCTGGTGGCG
CTGCACGTGGACCACAACCAGATCGAGTTCGTGCACCCGCACGCCCTTCGAGGGGCTGCTGTGCTGCGGCTGCTG
CAGCTGGAGGGGAACCGCTGCACCAGCTGCACCCGGCCACCTTTCGCACGGTCAGCTTCTGGGGCTTTCGGC
CTGTCCACGCTGCGGCACCTTACCTGGCCGAGAACGCGTGCAGGGGGCTGCCGGACGGGGTCTGCACGCCATG
CCGCTACTGGAGACCTTACCTGCACGGGAACCCCTGGGCTGCGACTGCACCTGCGCTGGCTCCTGGACTGG
GCCGCCAGGAACAAAG
```

>Exon 5 (OP925067)

```
GGATCCTCAAGTGTAA GAAGGACAAAAGCCTACGAGGGTGGCCAGTGGTGCCTGGCGTGTCTGCTCTCCCGGGACT
TGGAGCCCGGGAGCTGCTCGGGCTGACCGCAGTCCCTTGCCTGAAGCCGTCCATCGCGTCCCTCTGAGACAGA
GCCTGAGCTTCTCGGACAGGAGGACGAGGACGAGAAGGACAAGGAGGACGAGGAGGACAGTGACTCCGACGAGC
ACGATGGGGACGAGGAGGACGGGCTCGGGGGCTGCAGGACGCGTCCCTCGTCCCTCGGGCTGGAACGTGTCTT
TCAAACCTGACGGACGAGCACGGGAACCGGGTGTCTCTGCCGTGCGGCATCAGGAGGCCAGAGGCGTCCGCAGCG
TCCACCTCAACCAGACCGACGCCCCGAGGTCCACCTCAACGCCACCATCGCGTGGACTTGGCTGCCCTGTGA
CGCGGGACACCTACGAGAGGCTCTGGAAGCTCATCGCTACTACAGCGAGGTCCCGTCAAGCTGACCCGGGAGG
CTGCGCGGGGCGGTGGCCGAGCTATCGGTACCGCCAGGCGGCCGCCGACGACGCGCCCTGTATTACACCGGCGTCC
GCGCCCAGATCGCGGCCCGGCCGAGTGGTCTTGCAGAGCTCCGTGTCCATCCAGCTGGACCGGGCGCCGGAGCA
CGGCCAGCAGGGTCTGCTGTCTACACGGCCAGTACTCGCAGACCATCTCGGCCGCGGACGCCCACGGGCCAG
CTCGCGGCACAAGCTGGGTTCATGATCGAGCCCGGGGACGGGCAGCACCGAGCCCTGACCTGCTGGAAGGGGAGC
CCGGCCAGCTGAGCTGCCGCGTGAAGGCCCTCCGAGAGCCCGGCCATCTCTGGGTGCTGCCGACGGCTCTGTGC
TCAGGGCGCCCGGGCAGGGGACGGGCGGCCGGCTGTGCGGCTCAGCGGCGGTGGCTGAAGATCAGGGCCCGCC
AGCCGGCCGACTCCCGGCTTACCAGTGCCTGCGGAGGAGTGGAGGACGAGGTGGACAGATGGCCTTACAGGTCG
TGGTGCAGGCGCCCGGCCCTTCCCTGGAGAGCTCCATGGTACCCTGGAGAAGGACGCCGGGGAGCCCGTGTG
CGCTGCCCTGTGCGGCTCTGCGCTCCAGAAAGCCACGTCAGCTGGATTCTCCCAATAAAAGGATCTTGATG
GCTCGGCCAACGCTCCACGCATACATGCTGGCCGACGGCACGCTGTCCATCCCGAGCGCAGGCCGCGCACAC
GCGGCGAGTACAGATGTGTGGCCGTCAACCTGCAAGCGCGCTGACCACTTCTCCGTGGCGTCTCCGTGAGGAGGA
CGGGGGCCGGCCGGGCGGGGAAGAGAGGACAGGCGCCCGGGGGCCAGGCCCGGCTCGGGGACCCACGGCCACGTGG
CGGAGGACGGGAAGGCTCCGGCTGGCAGACCAGGAGACCCGGCCGGGAAGGGCTTCTCCCAAGGACCAAG
AGGCGGCCCTTCTCCAAGCGGAGGACGAGGGGGCCCGGGGAGCAGGACCCGAAGAAGAAGAAGCAGGCCAGGA
GGAAGCTTAAAGTGTGGAAGCCCTCGCGGAAGGAGCCGGACAGCAGCAGCGTGGCCGAGGGCCGACGGGCGTTCC
AGTCCAGGCGCAGGGTCAACGTGGCCAGCAAGCAGATCAACCCCGCGCGCTGGGCGGACATCTGGCCAGGGTGC
```

GGGGCGGGAAGGCTCTCCCAAGGCCAGCGAGGCGCCCGGGAAGCCACCACCCTGCGCCTCAAGCCAGGAGTC
 CGGAGGGGGCGCCCCCGTCCCCCGCAATGGCTCCCCACCCGGGTCCCCACCCAGGGAGCCCCGGATCTGGAGG
 AGGCATCCGCACAGGCGCCTCTCTTCGTGGAGGAAGAACAAGGCTCCAGCACCAGCTCCTCCCCGGGGATGGAGC
 ACGAAGGTGGCCACGGAGAAGGCGGCCACGGAGAAGGCGGCCACGGAGGAGGCGGCCACGGAGGAGGCGGCCACG
 GAGGAGGCGGCCACGGAGGAGGCGCCGCTCTCCCCGAGCCCCAAGTGTCCGGCCCCCTCTGCATGAGGAAGGCC
 CTGGTGGTACTTTCTGGAGAAAGCCGAGGCTCCGCTCTCCAGCCGGCTCTGAGCTGGACTGGGAGCTGACCCGCG
 TCCCCGGGCCGGATGCCCTCGGGCAGTGAATCTGTGGACCCAGAGGACACCACGGATGACCAGACGGCCACAA
 GTGCTCGGCCTGCACCCGGTAGAACCCGTGACACGACCCAGGAGGAAGCAGGAAAAGCCCCCGTTGGGTGCCAGCC
 CCTCCGCTGAGCCCCAGACTGTGAAGCACGCCACCCAGATGGACAGAATAACACACTCCTGGACGTGCAGACGG
 CTCCCGAAACCGAGCTGCCACGGCGAGCTCGGGGGTCTCCAGTGTGCCAAGTCTGTTTGGAAATTCCTCTTTAG
 GGAAGCAAGAGATGTCAGCCTGGTACACCGGACAAGGAAGACCAGGCGGTGCCCTGCCGCTGGGAAATAGTGTGG
 CCACTGCACGGGCTCCAGCTAGGAAGAAAGCCCTGGAAGACGGGGTTTTGGGGGAGACGCCACGTCCAGATCCC
 CTGAGGGCGCAGGGGAAGACGTCACACCTGAAGCCCCATTACACAGGCCGGGAGGTGCCCCCTGGGGAGGAAC
 CGGGCAGAGGCGTACCCAGGAGCAGAGGCCACAGCAAGCCACGCGGCCACTCGGCCGCCACACTGTCGCCCC
 CGTCCACCCGAAGGAGACCCGGGGCAGGAGGCGGCCGCGCCCCACAAATCTCGGCACCGCCAGAAAACAAATCC
 CCCCAGACCCCTCTGCCCTGTGAGGGCGCCTCCAACCCACCTTCTGCAGAAAAGGGGATCCCGAAGCCTGCGC
 AGAGCTCCCCGGCTCCACCTCTTGGGGAGACACCACGGTCCCTGTCCCTGAGCGGCCGGACGCAGAGAAAACAG
 CGGAATCCGCATCCAGGGGACCGCACGGAGGAGAAAAGGGAAAAGGCCCCACAGACACCGAGCTGGCGCCGCCA
 CCCCAGCTCAAAGACTCCGTGCCACGCCGGTGTCTCCCCGAAAAGTACGCCGAGCCAGCCCTCACTGCCCG
 GGGCACAAACTGCACCCCACTGACAGAAACGGGAGCCACAGGCGGGGTGACAGACTGGAAGATGATGTCACAG
 CTGCCCCCAGGCCCCAGGGCCTCATCGTACAGTCCAGGAGACGGTTCCTGGGCACGCAGCAGCCCGAAGCAGATC
 CAGAGGGAACCACGGATCCACAAGGAGCCACGGGTCACAAAGGAGCCACGGGTCCACACGGAGCCATAAGTCCAC
 AAGGAACCATGGGTCCACAAGGAGCCACGGGTCCACAAGGAGCCATAAATCCACAAGGAGCCACGAATCCACAAG
 AAACCACGAGTCCACAAGGAGCCACGAGTCCACAAGGAGCCACGAATCCACAAGGAACCACGAGTACACAAGGAG
 CCACAGGTCCACAAGGTACCATGGGTCCACAAGGAGCCACGAGTCCACAAGGAGCCATGAATCCACAAGGAGCCA
 CGAGTCCACAAGGAGCCATGAATCCACAAGGAACCACGAGTACACAAGGAGCCACGAGTCCACAAGGAGCCACGA
 ATCCACAAGGAGCCATGAATCCACAAGGAGCCACGAGTCCACAAGGAGCCAGGAATCCACAAGGAACGACGAGTC
 CACAAGGAGCCACGGGTCCACAAGGAGCCACGGATCGTGGGATCGCCACGCAAGCGGTCTTGGAGACGGCGCGG
 GGCTCTCTGGCCAGCTGGATGCTGATGAGCCATCAACGGCTCGCCCCTCGGTGTCCAGCGCAGGGCAGCCCAAGG
 CCGAGGCGCTCTGCAAGGGATCTGGGAATCCAGGCTGGCATCACCCAGGACAGCCAGCCAGGGGCCACCAG
 CCACACGGTCTCTGGCGTCCACTTAGAGGAGGACATCACAGACTTTTGTCTTTCAGAGAGCTGGAGGCCAGAG
 AGGCCACTCTCCGCCATCACCCGCTGTACACGCTGGAGTACAGGGCCACGGGGAGATGCTTGGCCCCCGACG
 CCTCCCCCAGCGCAGGGCTGGAGCCATCTTTAGGGCAGTCGAGAGGCGCCACCGGGGCCCGGATGGCGGGCAA
 GCACGGTGGTGGTGCCGTCCTTGCTGAAACCACACCGGAGAGTCCCATGCCACCGTGGCCCGGGGGGAGGACC
 CGGCCACCTCCTCCTCCCAAGGACTCCTCGGACCTCAGCAGTGACCCCCACGAAGCTGTGGCCAGCCTCTGCCG
 GCGCATTGCCCGGTGGCCCGAGCCACGGGAAAGGTTTTCTCCAGCTGGGCGGGAAACCCAGAGACCACGGCAC
 CCACAGAGGACAGAGACCCGCTTGTGCAGCAGTGGACACCCGAGGAGCTGTCCACTCTGGCTCCCCGCCGGGACG
 GATGGAACGTTTCTGCCAAGCCGGGTGGTGGACGGCAGGACGGGAAACAGCTTACCGCGTGGTCCGGACGGCC
 ACCTCCATCGTGGGGAGGTCCAGCCGGCGGGGTACCCCGCAGAGGCCACCCCGCCGAGGGGATCCGAGAGGCCGC
 CTCTCCGAACCTCACAAGGCCCGTGAGACACTTTGTGACTTTCCAGCCACCGCGCGGTTCACCCAGAAAACCGG
 AGACGACCACGCGTCCCTCCAGGGTCTGGCTGCAGGGCAAACAGCTCACGACCCCCGGGCCCCAGCACCTCGA
 CTCCCGGCGCACAGACCCCGGGCACACCCCGCTCCCAAGGAGTCCCGGACCAAGATCGAACCACAGTACGCG
 GCTACTCCAGAGCCCTGGGGAACAACATCCCGGAGCAGGGGAGCCCCGTCGGGAGCTCCAAAGCCAGCCCTC
 CTTACGCCCCCGCTTCCGTTCCCCACCGGACCTTTGCTTTTCCCGCTCCAGAGTACACCCCAAAGCCCC
 CCTCGGCCACCTCCCCAGCCCCAGGAGCCAGACAAAGAAAAGCCGCTCTCTGGCCCCACAGCAGGTTCCCGCCCC
 AGGGCTTCCCGTATGTGGATCTGGGGCCCCGGCACCCCCAATACCTCACTTTGCCCCGACTGCCACCCCTTTC
 ACAACGGCCCCCTGGCGTACCCACCCGGAGCTCCAGCCCTTCTGACGCCCCCGGCCAGTCCCCCGGGGTT
 CCCGTGACGTGACACCAAGATCTTCATCCGAGGGCTCCTGCCCCCCAGTTCTGGACGCCCCGAGAAAAACCCC
 AGATTATCAGCAAAATCCCCCAGACGCTGTCCGTACCCGCGAATCGGACGTGATGTTCCCGTGCAGGGCAGCC
 GCGAACCCCGCCTTTCATCACCTGGACCAAGGTCTCCACAG

>Exon 6 (OP925068)

GAGCCCTGATGACCCCCAACACCCGGCTCCCGCGCTTCGAGGTCTTGAAGAACGGGACCCCTGCTCATCCGCAGGG
 CGCAGGTTCAAGACCGCGGCCAGTACCTGTGCACCGCCAGCAACCCGCACGGCGTGGACAAGACGGGGGTGCTGC
 TGACCCGTCAAGGCCAGCAGCCCCGGATCCTGACGTCCTCCCTACCAGGACGTCACGGTCTACCTGGGGACACCG
 TCGCCGTTGAGTCCCTGGCAAGGGCACCCCGCAGCACCAGATCTCCTGGGTCTTCCCGGACGGCCGCGTCTGGC
 ACTCGGCGTCCCCGCCGAGGGCAGGGTCAACCTGCACCCCAACAGGACCCTGACCATCAGGGACGCGTCTTTCG
 CTGACCGCGGCGTGTACAAGTGTGTGGCCAGCAACACGGCGGGCGCGGACAGCCTGGCCATCCGGCTGCACGTGG
 CCGCGCTGCCCCGGTCAATCGGCCAGCAGAAGGCCGAGAATCTCTGCTGCCCCCGGGCCTGAGCGTCCACATCC
 ACTGCTCGGTACGGCGGGCGCCCCGGCCAGCCTGCGCTGGGTGCTGCCCCAGGGCGCCACATCCGGCCCTCAC
 AGTTCTGCACGAAACCTCTTTGTCTTCCCCAACGGGACGCTCTACATCCGCAACCTGGCGCCCAAGGACAGCG
 GCCGCTACGACTGCGTGGCCACCAACTCCGTGGGCTCGGCGCGCAGGGCCGTGCAGCTCAGCGTCCAGCGCACAG
 CGCCCCACGCGCATCACCCGCGCTCGCCCCGACACCCGACGCTCCGGTACGGGGGACCCCTGCGGCTGGACT

7.4 Verwendete Primer

In der folgenden Tabelle sind alle für die Versuche verwendeten Primer aufgeführt, mitsamt ihrer Sequenz, der Länge in Nukleotiden und dem jeweiligen Ziel. Rot markiert sind die Primer, welche die letztendliche Sequenzierung von *MXRA5* erzielt haben.

Name	Sequenz	Länge	Ziel
MX19780	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGT GGTATCAACGCAGAGT	45	cloning of RACE products
MX19789	GATTACGCCAAGCTTCCTCGTAGGCTTTG TCCTTC	35	5'RACE Mxra5 reverse exon 5
MX19790	GATTACGCCAAGCTTCGATGGACGGCTTC ACGCAG	35	5'RACE Mxra5 reverse exon 5
MX19795	CCTTTGCCTGGAGCACACCTCACC	24	amplification of Mxra5 exon 7
MX19796	CGTGCATCCTTGACGTCTGCAAAGC	25	amplification of Mxra5 exon 7
MX19797	AGAAGTCAGATGCCTTGAGTCATCG	25	amplification of Mxra5 exon 6
MX19798	AGCCCCAGACCGCAGAAGTCGG	22	amplification of Mxra5 exon 6
MX19799	GCTGTCTTTCAGGGATCCTCAAGTGTAAG	29	amplification of Mxra5 exon 5
MX19800	CTGTGACATCATCTTCCAGTCTG	25	amplification of Mxra5 exon 5
MX19801	CAGACTGGAAGATGATGTCACAG	24	amplification of Mxra5 exon 5
MX19802	TTACAGAGCAGCTTGCGCGTCTCAC	26	amplification of Mxra5 exon 5
MX19803	AAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAG	25	amplification of pRACE vector backbone
MX19804	AGTGAGTCGTATTAGGAATTCACTG	25	amplification of pRACE vector backbone
MX19805	CTAATACGACTCACTGCTGTCTTTCAGGG ATCCTC	35	amplification of Mxra5 exon 5
MX19806	GATTACGCCAAGCTTTTACAGAGCAGCTT GCG	32	amplification of Mxra5 exon 5
MX19808	CGTCTGACTGAACctGCGCAGAAGCCGG CCTTC	33	amplification of Mxra5 exon 7 antibody test epitope
MX19809	CTCGCCCTTGCTCACGTAGACGTGGACG TAGGTGAC	36	amplification of Mxra5 exon 7 antibody test epitope
MX19810	GGCTGTCTCCCACCAACAAG	20	sequencing oligo exon 7
MX19811	GTCTTCAAATTCAGCTACAACAAG	24	test for potential 5'RACE product

MX19812	CGTGCAGGTAGAGGGTCTCCAG	22	test for potential 5'RACE product
MX19813	GACAACGCCCTGTATTACAC	20	sequencing oligo exon 5
MX19814	GCGCTGACCACTTCTCCGTG	20	sequencing oligo exon 5
MX19815	CTGGTGGGTACTTTCTGGAG	20	sequencing oligo exon 5
MX19816	ACACCTGAAGCCCCATTAC	20	sequencing oligo exon 5
MX19817	AGGCGATCCTGGGAATCCAG	20	sequencing oligo exon 5
MX19818	CTAATACGACTCACTGCTGTCTTTCAGGG ATCCTCAAGTGTAAAG	44	MX20799 plus pRACE linker
MX19819	GATTACGCCAAGCTTTTACAGAGCAGCTT GCGCGTCTCAC	40	MX20802 plus pRACE linker

7.5 Verwendete Antikörper

Nachfolgend sind alle für die Versuche verwendeten Antikörper aufgeführt. Der einzige primäre Antikörper ist rot markiert, bei den anderen handelt es sich um sekundäre Antikörper.

Bezeichnung	Verwendung	Referenz
Matrix Remodelling Associated Protein 5 (MXRA5) Antibody	Immunfluoreszenz, Western Blot	Abbexa, England
Cy3 Donkey α -rabbit IgG (#AP182c)	Immunfluoreszenz	Merck Millipore, Darmstadt
POX α -rabbit IgG (#A6154)	Western Blot	Sigma-Aldrich, Steinheim
Alexa Fluor™ 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)	Immunfluoreszenz	ThermoFisher Scientific, USA

Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei all denen bedanken, ohne deren Hilfe und Unterstützung ein Zustandekommen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Gabriela Krasteva-Christ für ihre Unterstützung und die Bereitschaft, mich als Doktorand in ihrem Labor zu betreuen. Allen voran danke ich herzlichst dem Betreuer meiner Arbeit, Herrn Dr. Stephan Maxeiner, der mich jederzeit kompetent und ausführlich unterstützt hat, zu jeder Gelegenheit für Fragen und Tipps zur Verfügung stand und mir somit eine außergewöhnliche Betreuung bot.

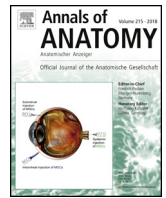
Für die tatkräftige Unterstützung während meiner experimentellen Phase, die Organisation des Labors und die Vorbereitung der Versuche danke ich besonders Frau Andrea Rabung und Frau Aline Herges. Zudem danke ich auch allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Instituts für Anatomie, Zellbiologie und Entwicklungsbiologie für jegliche Form der Unterstützung, das angenehme Arbeitsklima und die schöne Zeit, sowie bei allen Kooperationspartnern für ihre Hilfe.

Von Herzen danke ich meiner Familie für die liebevolle und tatkräftige Unterstützung sowie Rücksichtnahme während der gesamten Arbeit. In diesem Rahmen gilt besonderer Dank Lukas und Josephine für ihren außerordentlichen Einsatz.

Danke für eure Unterstützung, ohne die ich das Alles so nicht erreicht hätte!

Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.



SPECIAL ISSUE REVIEW

Of mice and men – and guinea pigs? ☆

Stephan Maxeiner*, Selina Gebhardt¹, Frederick Schweizer¹, Agnes E. Venghaus¹,
Gabriela Krasteva-Christ

Institute for Anatomy and Cell Biology, Saarland University, Homburg, Germany



ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 March 2021
Received in revised form 28 April 2021
Accepted 29 April 2021
Available online 14 May 2021

Keywords:

Pseudoautosomal region
NLGN4
Gametolog
Guinea pig
Genome

ABSTRACT

This year marks the twentieth anniversary of the publication of the first draft of the human genome and its broad availability to the scientific community. In parallel, the annotation of the mouse genome led to the identification and analysis of countless genes by means of genetic manipulation. Today, when comparing both genomes, it might surprise that some genes are still seeking their respective homologs in either species. In this review, we aim at raising awareness for the remarkable differences between the researcher's favorite rodents, i.e., mice and rats, when it comes to the generation of rodent research models regarding genes with a particular delicate localization, namely the pseudoautosomal region on both sex chromosomes. Many of these genes are of utmost clinical relevance in humans and still miss a rodent disease model giving their absence in mice and rats or low sequence similarity compared to humans. The abundance of rodents within mammals prompted us to investigate different branches of rodents leading us to the re-discovery of the guinea pig as a mammalian research model for a distinct group of genes.

© 2021 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	2
2. Rodents in scientific research	2
3. The human and rodent genomes	2
4. Peculiarities of the pseudoautosomal region	2
4.1. Development of the mammalian PAR	4
4.2. Shifting of PAR boundaries	4
4.3. Origin of gametologous gene pairs	4
5. Clinical implications of the PAR	4
5.1. ANOS1	5
5.2. MXRA5	5
5.3. NLGN4	5
5.4. SHOX	6
6. Gene studies in mice	6
7. Rodent alternatives	6
8. Conclusion	7
Declaration of interests	7
Ethical statement	7
Acknowledgements	7
References	7

☆ This paper belongs to the special issue Vertebrates diversity.

* Corresponding author.

E-mail address: stephan.maxeiner@uni-saarland.de (S. Maxeiner).

¹ All authors contributed equally to this work, authors are listed in alphabetical order.

1. Introduction

When John Steinbeck published his famous novel *Of Mice and Men* in 1937, he was not able to foresee to which extent the title of his book would foreshadow the close and successful relationship geneticist would develop with this particular group of rodents over the decades to follow. Mice from the species *Mus musculus* have been and are still widely used in research, in particular those deriving from Abbie Lathrop's colony of fancy mice. These include, e.g., the descendants of her "Black 6" strain from cage 57 ("C57BL/6j") (Steensma et al., 2010). Together with rats, hamsters and guinea pigs, mice represent by number the most popular rodents employed in biomedical research. Several reasons account for this success, some of which follow scientific, others logistical reasons. Within the class of mammals, rodents, lagomorphs and primates are the most closely related orders (Murphy et al., 2001), hence, suggesting a higher degree of likeness regarding physiological processes, behavior and development. Eventually, techniques have been developed to manipulate and change the mouse genome in order to study almost any gene of interest by the generation of mutated mice (Bouabe and Okkenhaug, 2013). The scientific value of this ability was finally acknowledged in 2007 by awarding the Nobel Prize in Physiology or Medicine to Mario R. Capecchi, Martin J. Evans and Oliver Smithies "for their discoveries of principles for introducing specific gene modifications in mice by the use of embryonic stem cells" (www.nobelprize.org). Now, almost four decades into the manipulation of mouse genomes and with the ever-growing availability of sequenced, assembled and annotated genomes, scientists may easily overestimate what we actually know, and consequently, ignoring the presence of remaining *terrae incognitae* within publicly available genomic information.

This review focusses primarily on recent findings on the erosion of the pseudoautosomal region, PAR, which is one of those regions with incomplete sequence information particularly within the clade Eumuroida (Maxeiner et al., 2020). Eumuroida includes many popular rodent species, which are used in biomedical research, e.g., mice, rats and hamsters (Steppan et al., 2004; Steppan and Schenk, 2017; Maxeiner et al., 2020). The latter observation prompted us to evaluate whether any rodent species outside Eumuroida, e.g., the guinea pig, could be useful to study those genes of the ancestral PAR gene cluster with the goal to establish new approaches to address underlying human pathologies in particular genes. We will focus more closely on four of these genes for different reasons. These genes include *ANOS1* and *SHOX*, which both are of significant clinical interest regarding the etiology of Kallmann syndrome and Turner syndrome, respectively; *NLGN4*, which substantially differs in its protein sequence in mice and humans (Bolliger et al., 2008; Maxeiner et al., 2020), and *MXRA5*, an under-studied gene tied to the development of cancer.

2. Rodents in scientific research

Rodents, in particular mice and rats, have been part of scientific research for countless years mostly owed to logistical reasons: low feeding and maintenance costs, big litter sizes and short generation sequences (the latter one highly appreciated by graduate students and postdocs). For biological reasons it is noteworthy that mice and rats as rodents are more closely related to primates, including humans, than they are to cats, dogs or pigs. This judgment, however, is solely based on the phylogeny of their respective genomes rather than on physiological parameters sometimes demanding a comparison emphasizing different aspects such as, for instance, organ sizes. The most popular rodent species are mice, rats, hamsters and guinea pigs. Within the last fifty years there has been a shift regarding the preference of which rodents are used in biomedical

research (Fig. 1). All four species follow a different pattern. The preference of the guinea pig was the highest in the early seventies thereafter steadily decreasing, whereas the preference for mice increased peaking most recently (Fig. 1A). The interest in using hamsters increased to a peak around the millennium but sharply declined within the last decade. The demand for rats was comparably stable within the last thirty years. It should be pointed out, however, that the overall contribution of all four species to the published literature was not distributed evenly: mice and rats jointly share the majority of the published literature (>90%) in our analysis (Fig. 1B), hamsters and guinea pigs share less than 10%. The success of mice as rodent research animals is reflected in a sharp upward trend starting in the late 1990s. Although the manipulation of the mouse genomes to generate mutated mouse lines for broad research applications was already available to many labs in the early 90ies; this sharp uptick is likely due to the reduction of costs and the commercialization of "mouse making" in biomedical research further fueled by the publication and availability of the mouse genome sequence (Mouse Genome Sequencing Consortium et al., 2002).

3. The human and rodent genomes

Two decades ago, the human genome was published as an effort of public and private aspirations (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001), soon the publication of the mouse genome followed (Mouse Genome Sequencing Consortium et al., 2002). Continuously, updates on the genomic drafts have been published intending to close gaps of notoriously difficult sequences, such as GC-rich sequences or stretches with tandem repeats (e.g., in mouse: Church et al., 2009). Based on both preliminary drafts, interests have emerged regarding subtle differences of relatively closely related animals, such as, for instance, between different (laboratory) mouse strains (Lilue et al., 2018; Thybert et al., 2018). In order to determine the whereabouts of any gene of interest in mammals, their respective genomic localization and potential sequence variation the Zoonomia Consortium, 2020 has analyzed 240 genomes representing 80% of all mammalian families (2020). Individual groups that have research interests regarding particular species have contributed independently to this gain of knowledge and have deposited this information in public databases (e.g., GenBank, NCBI). As an example, the search terms "*actb* and Rodentia" (*actb*: beta actin gene) on the website of NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene) results in a list of twenty-six annotated rodent genomes. The number of genomes that were sequenced, but yet lack full annotation and assembly, are deposited with GenBank and are accessible using the blastn suite provided by NCBI. This approach is a useful alternative if a known sequence of interest of a closely (or not so closely) related species is available. Some of the older annotated genomes within rodents, such as that of the domestic guinea pig (*Cavia porcellus*) was assembled and submitted to the database in 2008 (Cavpor3.0, Broad Institute, MIT, Cambridge, MA, USA) and still contains substantial sequence gaps. Although it cannot be ruled out that annotations are still added to the deposited sequence information, it appears that sequencing gaps are not to be closed by further sequencing efforts beyond the initial undertaking. In parallel, exploration of closely related genomes, such as the genome of the Brazilian guinea pig, *Cavia apera*, might be useful and should be considered, which is accessible using the blastn suite (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4. Peculiarities of the pseudoautosomal region

Evolutionarily, the pseudoautosomal region, PAR, is a subtelomeric region on both sex chromosomes in mammals comprising a

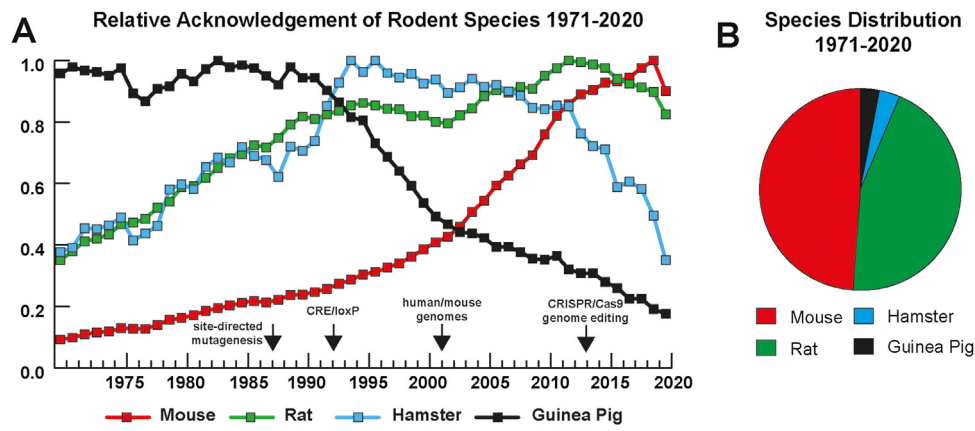


Fig. 1. The use of rodent species in biomedical research.

The relative use of four popular rodents in biomedical research, i.e., mice, rats, hamsters and guinea pigs, has been assessed by the comparison of publications found in PubMed (NCBI) using the species name as a search term. A. The relative use within the last fifty years was plotted using the highest in that course for every species, respectively, as the denominator for each other year. The highest number for mice, for instance, was in 2019. Arrows indicated pivotal milestones: site-directed mutagenesis (Thomas and Capecchi, 1987); CRE/loxP (Orban et al., 1992); CRISPR/Cas (Cong et al., 2013; Doudna and Charpentier, 2014). B. Relative distribution among all four species plotted in a pie diagram using the sum of each mentioned species within the last fifty years, starting 1971.

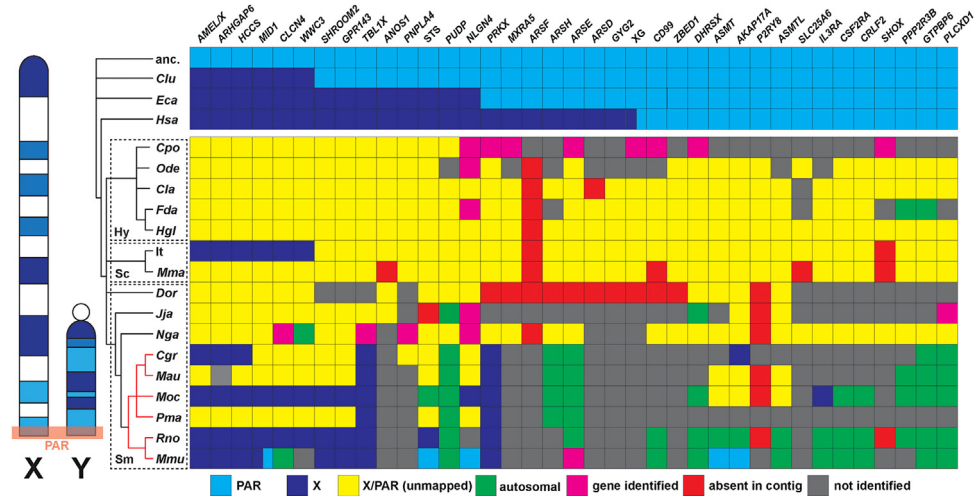


Fig. 2. The PAR gene cluster in rodents and selected mammals.

On the left side, ideograms of both sex chromosomes from mouse are depicted and the sub-telomeric localization of the pseudoautosomal region (PAR) is highlighted. The schematic is an update of a previous overview of the PAR gene cluster emphasizing changes that have happened to its gene content in some rodent lineages now including *AMEL/X*, *ARHGAP6*, *HCCS* (Maxeiner et al., 2020). The upper rows exemplify three species in which the pseudoautosomal boundary has been experimentally determined; blue, PAR genes; indigo, flanking X-specific region; dog, *Clu*, *Canis lupus*; horse, *Eqa*, *Equus caballus*; *Hsa*, *Homo sapiens*. Information of the following sixteen rodent genomes were incorporated: in the suborder Hystricomorpha, *Hy* (*Cpo*, *Cavia porcellus*); *Ode*, *Octodon degus*; *Clu*, *Chinchilla lanigera*; *Fda*, *Fukomys damarensis*; *Hgl*, *Heterocephalus glaber*; suborder Sciuromorpha, *Sc* (*Itr*, *Ictidomys tridecemlineatus*; *Mma*, *Marmota marmota*), suborder Supramyomorpha, *Sm* (*Cgr*, *Cricetulus griseus*; *Dor*, *Dipodomys ordii*; *Jja*, *Jaculus jaculus*; *Mau*, *Mesocricetus auratus*; *Mmu*, *Mus musculus*; *Moc*, *Microtus ochrogaster*; *Nga*, *Nannospalax galili*; *Pma*, *Peromyscus maniculatus*; *Rno*, *Rattus norvegicus*). Bars on the left side indicate relative evolutionary relationship (not drawn to scale). Red bars highlight species within the suborder Supramyomorpha that establish the clade Eumuroida. PAR mapped, these genes have been shown to be present in the PAR region by genomic comparison or from the literature; X/PAR unmapped, these genes are on contigs but are lacking any association that might be indicative for autosomal translocation.

cluster of some thirty genes (below referred to as “ancestral” PAR genes). Based on our curiosity regarding the sequence differences between human and mouse neuroligin-4 genes, we previously assembled a heatmap indicating the fate of each ancestral PAR gene during rodent diversification (cf. suppl. material in Maxeiner et al., 2020). Some genes of the ancestral cluster have been subject to, for instance, gene loss or autosomal translocation. Here, we present an updated version of this map starting with *amelogenin* and any gene downstream thereof. The *amelogenin* gene marks the start of the ancestral PAR gene cluster extending to the telomer end (Fig. 2) (Iwase et al., 2003).

Notably, during mammalian diversification the localization of the PAR boundary, i.e., the border between the PAR and the sex chromosome specific sequences happens to shift towards the

telomer (cf. Raudsepp and Chowdhary, 2015). This boundary still awaits to be determined in many species since sequence information in databases predominately derives from female organisms. The absence of knowledge regarding the male-specific region of the Y-chromosome impedes ascertaining this boundary. Many mammalian species retain the entire ancestral gene cluster on their respective X-chromosomes and display solely a shift of the PAR boundary (Raudsepp and Chowdhary, 2015). To date, only the rodent suborder (Supra-) Myomorpha, or more specifically, the clade Eumuroida, display major changes including gene loss, translocation events to autosomes or the recombination to X-specific regions. Some changes do also affect the remaining PAR genes in their coding sequence (e.g., mouse *Nlgn4*, Maxeiner et al., 2020). To understand the clinical relevance and the distinct features

of this particular region in mammalian genomes, several characteristics are further discussed in more detail below.

4.1. Development of the mammalian PAR

The development of the PAR is closely related to and, consequently, being part of the development of the generation of separate sex chromosomes. It has been hypothesized that originally two proto-X-chromosomes existed, on which *SOX3* diverged into what is now the *SRY*, sex determining region on Y-gene (Graves, 1998). The ability of *SRY* protein to induce the development of a male organism has led to the erosion of most of the homologous, second proto-X-chromosome eventually evolving into the Y-chromosome (cf. Graves, 2016). The erosion was further facilitated by a lack of recombination between X- and Y- during male meiosis. Just a little stretch of DNA, the PAR, at the telomer end retained the ability to align and recombine (Burgoyne, 1982; Flaquer et al., 2008). Since the boundaries between PAR and X- and Y-chromosome specific regions appeared to shift ultimately towards the telomer, it was necessary to “add” genetic content including genes from autosomes to the telomers in order to retain a minimal pseudoautosomal region (Graves, 2016). In most mammals, this stretch of DNA including its gene content happens to be preserved; a shift of the pseudoautosomal boundary, however, seems to be unavoidable and is not conserved among the different branches within mammals.

This rarely resulted in the generation of gametologs of genes, which are discussed below. Some thirty genes are considered to belong to an ancestral PAR commencing with amelogenin (cf. Fig. 2). This gene content though is not chiseled into stone; evolution brought new genes into existence, e.g., *VCX* genes in humans (Lahn and Page, 2000). Recently, genomic comparison within rodents revealed that many of the ancestral canonical PAR genes have entirely disappeared, recombined to autosomes or X-specific regions, or have suffered from eroding forces (Maxeiner et al., 2020). For the sake of completion it should be noted that in humans there is a second PAR (PAR2) at the opposite sub-telomer region on both sex chromosomes. Its existence is debatable in other primates or even outside this order in other mammals, therefore, we entirely refer to human PAR1 as the pseudoautosomal region in this analysis (Fig. 2).

4.2. Shifting of PAR boundaries

The boundaries separating the PAR from X-specific, or the PAR from the male-specific regions on the Y-chromosome, respectively, appear to move independently towards the direction of the telomer on different branches during mammal evolution (cf. upper part in Fig. 2) (Raudsepp and Chowdhary, 2015). In dogs and cats of the order Carnivora, for instance, the pseudoautosomal boundary, PAB, is located between the X-specific *WWC3* gene and pseudoautosomal *SHROOM2* gene. Horses of the order Perissodactyla, however, retain the PAB immediately downstream of *NLGN4X*. In humans the number of PAR genes is further reduced to fourteen, in which the PAB is located within the *XG* gene (Weller et al., 1995). The shift of the PAB compares to a zipper, which was once able to fully close (i.e., retain the ability to recombine) on a stretch of subtelomeric DNA encompassing the ancestral amelogenin to the most distally located *PLCXD1*.

4.3. Origin of gametologous gene pairs

Homologous genes share the same phylogenetic roots. Among these, orthologs are homologs that diverge upon specification into different species; paralogs develop upon gene duplication into different genes such as, for instance, different members of a gene

family. Gametologs, however, can be considered as a mixture between both, orthologs and paralogs. A gametolog is an X-linked gene with a functional homolog on the Y chromosome. Both genes diverged from one ancestral gene, which might have been a PAR gene or a gene already present on the precursors of the sex chromosome (Iwase et al., 2003; Wilson Sayres and Makova, 2013). They happen to be the result of a shift of the pseudoautosomal boundary, PAB, which eventually leaves copies of ancestral PAR genes on either the X-specific part of the X-chromosome and the male-specific part of the Y-chromosome. Whereas the gene content of the X-specific part of the X-chromosome is constantly able to perform homologous recombination during female meiosis, and therefore, is able to tightly control potentially harmful changes to its gene content and gene sequences, the male-specific part has lost this ability, hence, leaving any gene proximal to the PAB subject to the accumulation of mutations, decay and often pseudogenization. Only a limited number of genes have been identified that yet escaped the eroding forces of the male-specific part of the Y-chromosomes suggesting that they still retain a fair share in contributing to the function of the organism.

The first identification of a pair of gametologs is dating back roughly three decades and was named *AMELX* and *AMELY* both deriving from an ancestral amelogenin gene (Lau et al., 1989; Iwase et al., 2007), which is considered to mark the beginning of the original, ancestral cluster of PAR genes (Fig. 2). Amelogenin is a protein present in tooth enamel, and mutations in *AMELX* lead to *amelogenesis imperfecta*, a disease resulting in yellowish looking teeth (Lagerström et al., 1991). Transcript levels of *AMELX* are ten times more abundant than those of *AMELY* (Salido et al., 1992). Despite its surprisingly low expression *AMELY* gene function appears to be still retained functional in most mammals. The accumulation of indels, i.e., length polymorphisms based on insertions or deletions between both genes visible by sequence alignment and the presence of SNPs (single nucleotide polymorphisms) enables both genes to be extraordinarily useful in forensic genetics as well as strategic live-stock breeding (Akane et al., 1991; Hasegawa et al., 2000; Pfeiffer and Brenig, 2005; Fontanesi et al., 2008; Yan et al., 2013). The underlying concept is that gametologs serve indirectly as useful indicators for the presence of either sex chromosome, which can be detected easily by means of PCR techniques in single-tube applications rather than by time-consuming metaphase chromosome staining techniques. Compared to approaches identifying solely the *SRY* gene on the Y-chromosome, a two-primer approach in a single PCR reaction aiming at the detection of both amelogenin genes should always result in at least one band for the X-specific version, *AMELX*, serving as an internal control for correct sample loading. Hence, an additional second band for the *AMELY* gene allows to infer the presence of both, X- and Y-chromosomes, in males (Akane et al., 1991). This testing does not account for recombination events or forms of aneuploidy that are also found in humans. The method of “sex-typing” is one of many ways to assess DNA donor characteristics but has nothing to do with the complexities regarding gender identity in humans.

Besides amelogenin gametologs *AMELX/Y* and zinc finger protein gametologs *ZFX/Y* (Mutter and Pomponio, 1991; Murakami et al., 2001), we recently reported the successful application of PCR strategies employing neurologin-4 gametologs *NLGN4X/Y* as target genes in humans and horses (Maxeiner et al., 2019; Zaffalon et al., 2019).

5. Clinical implications of the PAR

Clinical implications of the ancestral PAR gene cluster (whether still on PAR or X-specific in humans) are plentiful and deserve an independent, thorough review. Mutations in or complete loss of

some of these genes result in numerous diseases or are part of syndromes with different clinical pathologies. Four of these genes will be described below in more detail: *ANOS1*, *MXRA5*, *NLGN4X*, and *SHOX*. Mutations in or loss of some of the other genes result in the following pathologies or diseases: *amelogenesis imperfecta* (*AMELX*; Lagerström et al., 1991), microphthalmia with linear skin defects (*HCCS*; Prakash et al., 2002), Opitz BBB/G-Syndrome (*MID1*; Schweiger and Schneider, 2003), X-linked ocular albinism type 1 (*GPR143*; Bassi et al., 1995), X-linked chondrodysplasia punctata (*ARSE*; Franco et al., 1995), X-linked ichthyosis (*STS*; Müller et al., 1980). A fusion of *P2RY8* with *CRLF2* has been identified to contribute to the onset of acute lymphoblastic lymphoma (Palmi et al., 2012) (cf. Fig. 2 for localization of genes).

5.1. *ANOS1*

The underlying genetic causes of Kallmann syndrome are diverse and complex. Various mutations have been found in autosomes and on the X-chromosome (Hardelin and Dodé, 2008). The first gene that was linked to Kallmann syndrome was *ANOS1*. Initially, based on the name of the disease it was referred to as *KAL1*. In humans, *ANOS1* is located on the short arm of the X-chromosome (Xp22.3) and encodes for an extracellular matrix glycoprotein ANOSMIN-1. The structure has parallels to neuronal cell adhesion molecules and serine protease inhibitors (Franco et al., 1991; Legouis et al., 1991). The phenotype of Kallmann syndrome has two main characteristics, (a) anosmia, the inability to smell, and (b) hypogonadotropic hypogonadism (Kallmann et al., 1944). Frequently, a correlation with additional symptoms has been reported; these include inter alia synkinesia (mirror movements), malformations of the visual and auditory system, abnormalities of the lips, jaw, palate and teeth and unilateral renal agenesis (Hardelin et al., 2008).

The presumptive cause of Kallmann syndrome is a defective embryonic development and migration of certain neurons. In case of anosmia, for instance, patients show absence of the olfactory bulb and its neurons. The migration failure of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) producing neurons of the hypothalamus and, consequently, an insufficient production of GnRH leads to the development of hypogonadotropic hypogonadism. Both groups of neurons have their origin in the olfactory placode (Schwanzel-Fukuda et al., 1989).

Studies in human tissues and animal models, such as chicken, fruit fly, zebrafish and worm have revealed the importance of *ANOS1* in relation to neuronal cell adhesion, neurite outgrowth and axon guidance (Soussi-Yanicostas et al., 1996; Lutz et al., 1993; MacColl et al., 2002; Bülow et al., 2002; Ardouin et al., 2000). Additionally, its interaction with FGFR1, fibroblast growth factor receptor 1, seems to play a crucial role (Murcia-Belmonte et al., 2010). However, the exact functionality of *ANOS1* has yet not been clarified conclusively. Research on *ANOS1* is difficult because a genetic homolog has yet not been found in mice and rats. A few studies with antibodies raised against human *ANOS1* showed a questionable presence of the protein in rats (Ayari and Soussi-Yanicostas, 2007). But that conflicts with phylogenetic studies that *ANOS1* and its adjacent genes on the pseudoautosomal region of the X-chromosome have been lost in mice and rats (Maxeiner et al., 2020). Based on these findings and the lack of a suitable rodent model demonstrate the importance to identify alternative research animals, such as potentially the guinea pig or squirrels, in which *ANOS1* is still present.

5.2. *MXRA5*

The matrix-remodeling-associated 5 gene (*MXRA5*), initially described as *adlcan*, encodes for a presumptive extracellular

matrix protein (ECM-protein), but its function remains elusive because it is absent in laboratory animals such as rats or mice. High transcript levels of *MXRA5* mRNA, for instance, were found in human kidney tissue (Poveda et al., 2017), further associations with carcinomas and metastasis were reported repeatedly suggesting a possible clinical relevance.

Xiong et al. (2012) described *MXRA5* protein as a possible tumor suppressor claiming that mutations could promote or lead to tumor development, such as non-small-cell lung carcinoma (NSCLC). In addition, patients with NSCLC and higher expression levels of *MXRA5* had a worse prognosis and an overall survival rate (Weng et al., 2016). Similar results were observed in patients with liposarcoma (Kanojia et al., 2015). These oncogenic functions could identify *MXRA5* as a target in diagnosis and treatment of certain types of cancers.

In another observation, *MXRA5* protein has been associated with colorectal carcinoma (Wang et al., 2013). There were some significant differences of *MXRA5* expression between colorectal carcinoma and healthy tissue reported. Its absence or low expression in healthy tissue compared to an increased expression in later tumor stages enforces its possible role as a strong biomarker (Yu et al., 2014). As a potential marker of some cancer forms, *MXRA5* might be an attractive target molecule by pharmacology combating certain types of cancers. Recently, highly upregulated *MXRA5* protein was reported to be present in biopsies of patients with benign prostate hyperplasia (Xiao et al., 2020). Its diagnostic value as a biomarker for the calcification of aortic valves is further discussed because mutations of some ECM proteins such as *MXRA5* could result in an instability of the valvular architecture (Bouchareb et al., 2021). *MXRA5* might be of importance in neuronal function and development as well since mutations of the gene have been identified in three families with autism spectrum disorder (Al-Mubarak et al., 2017). Its expression and functional relevance in neurons, however, needs to be determined.

Taken together a variety of clinical aspects make *MXRA5* a fascinating protein for future studies but it needs to be investigated more thoroughly regarding its expression pattern and localization, work that has been hampered given its absence in model rodent organism such as mice and rats.

5.3. *NLGN4*

Neuroigin-4 is a member of the neuroigin family, which belongs to the group of synaptic cell adhesion molecules, CAMs, present at neuronal synapses (Südhof, 2008). Neuroigins are localized at the postsynaptic side and have been shown to interact with neuroligins that are expressed at the presynaptic side. Guided by an elaborate splicing behavior leading to a plethora of different neuroigin and neuroligin combinations including different members of either gene families are considered together with other trans-synaptic cell adhesion molecules to be essential modulators of synapse formation, restructuring, and elimination (Südhof, 2018). These functions are suggestive for a fundamental role in shaping circuit wiring of the brain leading to the assumption that mutations might result in neurological/neurodevelopmental disorders (Südhof, 2008). As addressed earlier, due to shifts of the pseudoautosomal boundary the human version of the neuroigin-4 gene happens to be a pair of gametologs resulting in genes specific to the X-chromosome, *NLGN4X*, and the male-specific region of the Y-chromosome, *NLGN4Y*, respectively. To which extend shifts of the PAB in other mammalian orders occur remains to be determined since many deposited genomes in the curated databases are from female organisms. Outside the primate suborder, a pair of neuroigin-4 gametologs has to date only been reported in horses (Raudsepp and Chowdhary, 2015; Zaffalon et al., 2019). In lab-

oratory mice, however, *Nlgn4* happens to be pseudoautosomal (Maxeiner et al., 2020).

A landmark observation by Jamain et al. (2003) has sparked considerable interest in neuroligin research. They identified mutations in human *NLGN3* and *NLGN4X* genes that were associated with cases of autism spectrum disorders, ASD. Since this fundamental observation many other mutations have been identified including *NLGN1* and *NLGN2* with *NLGN4X* mutations prevailing (Nakanishi et al., 2017; Parente et al., 2017). The association between neuroligins and ASD has been addressed successfully in several approaches employing the generation of *Nlgn3* and *Nlgn4* mutated mice (Tabuchi et al., 2007; Rothwell et al., 2014; Jamain et al., 2008). The role of human *NLGN4Y* protein, in contrast, remains elusive. Previously, maternal immune responses against *NLGN4Y* have been discussed as a cause of male homosexuality (Bogaert et al., 2018). We have recently shown that neuroligin-4 genes have been substantially challenged (e.g., accepting repetitive sequences within the coding region, and, likely, still maintaining protein function) in the clade Eumuroida in rodents comprising roughly two thirds of all rodents and over a quarter of all mammals (Maxeiner et al., 2020). These challenges are likely credited to forces leading to an erosion of the PAR accompanied by an increase of GC bases and the accumulation of repetitive stretches.

5.4. SHOX

SHOX is a homeobox-containing gene discovered in studying Ullrich–Turner syndrome genetics, originally described in 1997 as *PHOG* for “pseudoautosomal homeobox-containing osteogenic gene” (Ellison et al., 1997). Shortly thereafter, Rao et al. (1997) suggested the name *SHOX* for “short stature homeobox-containing gene”, which has been kept ever since. *SHOX* is located within human PAR1 on Xp22.33 or Yp11.32 and covers approximately 40 kb with its seven exons. Splice variants have been reported resulting in different isoforms, the main ones translated into the proteins *SHOXa* with 292 and *SHOXb* with 225 amino acids, respectively (Rao et al., 1997; Marchini et al., 2016). *SHOXb* shows the same homeodomain as *SHOXa* but lacks the C-terminal portion and the protein activating domain, thus acting as a potentially negative regulator of *SHOXa* (Marchini et al., 2016). Looking at the overall expression of *SHOX*, it has been found in many fetal and adult tissues, especially in the placenta, skeletal muscle, bone marrow (fibroblasts), and adipose tissue (Ellison et al., 1997; Durand et al., 2011), and to a lesser extent in neuronal tissues such as in fetal and adult brain regions including the cerebellum, thalamus, and basal ganglia (Durand et al., 2011). Its expression pattern during embryonic development in the limb as well as in the first and second pharyngeal arches correlate with the associated disease phenotype such as short stature (Clement-Jones et al., 2000).

SHOX is thought to be present in most vertebrate species except rodents, where it was lost through evolution (Gianfrancesco et al., 2001). As a result, other models are in use for research purposes such as chicken and zebrafish, in which similar expression patterns occur as in humans (Tiecke et al., 2006; Sawada et al., 2015). *SHOX* has several essential functions as a paired-related homeodomain transcription factor. In bone metabolism, it shows several effects as a regulator of chondrocyte hypertrophy as it is expressed in the growth plate, influencing *FGFR3* signaling and impacting several other signaling pathways (Decker et al., 2011; Baron et al., 2015). It further modulates cell proliferation and apoptosis (Marchini et al., 2004). Due to its function in bone metabolism, different diseases are linked to mutations or deficiency of *SHOX*. These include its participation in Turner syndrome, which is caused by the haploinsufficiency of the X-chromosome, resulting in the typical short stature phenotype (Rao et al., 1997). Mutations in the *SHOX* gene itself cause Léri-Weill dyschondrosteosis, defined by a

heterozygous defect in *SHOX* leading to mesomelic short stature and Madelung deformity. In contrast, Langer mesomelic dysplasia, which is defined by its homozygous loss, leads to extreme short stature and skeletal dysplasia (Shears et al., 1998). Due to its involvement in various pathologies, there is a demand for a suitable mammalian research model given its absence in mouse and rats.

6. Gene studies in mice

The accessibility of the mouse genome and the refined abilities to introduce stable mutations (null and point mutations) as well as artificial DNA fragments into the mouse genome has been dominating modern biomedical research since the late 1980s. The ever-growing range of means to delete any gene of interest, whether in distinct cell types or tissues, constitutively, upon induction or temporally applied, has fueled our understanding of countless genes and their products (Bouabe and Okkenhaug, 2013). Many of these findings have benefitted from an ever-increasing genetic toolbox, in particular creating conditional recombination employing means of the *CRE/loxP*- and *FLP/frt* recombination system (Branda and Dymecki, 2004). The disease relevance of genes has been established and the unique or shared features of single members of gene families have been elucidated. A general notion has emerged without saying that any human gene with clinical implications or disease relevance is mirrored by and, consequently, could be translated into a respective mouse model employing means of genetic manipulation. This notion, however, is not the case when it comes to disease modelling of PAR genes. The absence of *ANOS1*, *MXRA5*, *SHOX*, for instance, in a subset of rodents, to which hamsters, rats and mice belong, makes it impossible to study these genes in well-established rodent disease models.

Generally, the genes of the ancestral PAR are predestined to experience the following evolutionary fate: (a) they are retained in the PAR, or on the X-chromosome, (b) they translocate to an autosome, (c) they accumulate within their coding region mutations at an accelerated pace due to the eroding forces within the clade Eumuroida, or (d) they are lost (Maxeiner et al., 2020). The loss of a particular gene does not necessarily mean that it is of less importance to humans or other mammals that retain this gene, such as *SHOX* or *ANOS1*, for instance, but it appears that for this subset of rodents the overall functions might be dispensable and/or replaced by the activity of another gene, which, of course, needs to be determined. A comparison of publications of those genes that are inaccessible in mice and which, therefore, could have only been studied in human cell cultures *in vitro* or human tissue samples *in situ*, were seeking alternative species, e.g., such as the musk shrew, a mouse-like carnivore, to study *ANOS1* (Dellovade et al., 2003). The lack of appropriate reference species is likely the reason why many genes of the PAR are under-studied with a limited number of publications (Table 1). Among the ancestral PAR gene cluster, only *CD99* happens to be mentioned frequently, possibly due to its role as a marker, e.g., of Ewing sarcoma in histopathology (Kovar et al., 1999; Manara et al., 2018).

7. Rodent alternatives

Since approximately half of the ancestral PAR genes are of clinical interest, it is crucial to develop alternative approaches to study these genes and to seek out potential rodent species in which these genes are still present. Among those are the Sciuromorpha (the squirrel-like rodents) and the Hystricomorpha (the porcupine-like rodents) (Table 2). Most but not all of the Supramyomorpha disqualify in this comparison owed to the recombination events leading to the erosion of the PAR (cf. Fig. 2 and Maxeiner et al., 2020). Aiming at establishing an alternative rodent animal model for

Table 1
Number of publications on pseudoautosomal genes.

Number of publications	Gene name
Up to 10	AKAP17A, DHRSX, GTPBP6, PLCXD1, PPP2R3B, PUDP
11–50	ARHGAP6, ARSD, ARSE, ASMTL, CLCN4, GYG2, MXRA5, PNPLA4, SHROOM2, SLC25A6, WWC3, ZBED1
51–100	CSF2RA, P2RY8, PRKX, TBL1X
101–500	AMELX, ANOS1, ASMT, CRLF2, GPR143, IL3RA, MID1, NLGN4, SHOX, XG
Over 500	CD99

The individual numbers of publications on each gene starting from its first listing were retrieved from PubMed (March 2021) and clustered into different brackets accordingly (left). The respective genes within one bracket are listed alphabetically (right). The following gene names retrieved additional search results that could not be separated properly, therefore, they could not be placed accordingly: *ARSF*, *ARSH*, *HCCS*, *STS*.

Table 2
Species count and relative distribution of primates, rodents and rodent suborders among mammalian species.

Mammalia Order	Species	Percentage
Rodentia	2552	39,3%
Primates	518	8,0%
Rodentia Suborder	Species	Percentage
Hystricomorpha	308	12,1%
Supramyomorpha	1916	75,1%
Sciuromorpha	328	12,8%

The species count and the relative distribution of primates and rodents within the class of mammals (top) as well as the three major suborders within the rodent order are listed (bottom). This list is based on the species' numbers published previously by Burgin et al. (2018). The classification of rodents followed recent considerations, in which previously separate suborders Myomorpha, Anomaluromorpha and Castorimorpha (Wilson and Reeder, 2005) were combined to one suborder, the suborder Supramyomorpha (D'Elia et al., 2019). Eumuroida comprise 88,8% of Supramyomorpha, 66,7% of rodents, and 26,2% of mammals.

biomedical research, it is important to consider the feasibility of its handling, litter sizes, physiology and behavior, and finally its commercial availability. Naked moles (*Heterocephalus glaber*) have been found to be extremely interesting regarding their endurance facing cancer challenges (Shepard and Kissil, 2020), but their eusocial system is quite elaborate making them less attractive when it comes to animal housing and caretaking (Bromham and Harvey, 1996). Most recently, Yagishita-Kyo et al. (2021) assessed neuroligin-4 function using its homolog from *Octodon degu*, which shares comparably high sequence identity with human *NLGN4X* and which is closely related to the naked mole. At the current state it appears that guinea pigs are the only rodents among those not affected by the PAR erosion that are commercially available, feasible to house and maintain. Guinea pigs, for instance, are discussed to serve as suitable models for filial attachment and depression-like behavior (Hennessy et al., 2019; Hennessy, 2014), and therefore, might be suitable models for studying brain circuits formation and underlying gene expression. As precocial species, guinea pigs are neurodevelopmentally more akin to human infants at birth (Safa et al., 2021). Additionally, guinea pigs have frequently been used reliably for research related to asthma and COPD (Canning and Chou, 2008). The pitfall, however, is the inconsistent coverage of its genome, which has not been updated by closing sequencing gaps since its publication in 2008. Our own analyses have shown that this knowledge gap can be compensated for by immediate comparison of its genome to those of the Brazil guinea pig and the mountain guinea pig, which have yet not been fully assembled and annotated. It will be exciting to further explore the before-mentioned genes,

such as *ANOS1*, *MXRA5* and *SHOX*, in an alternative rodent research model. Once any of the guinea pig genomes are fully released, they might lead us to a new understanding whether the intersection of human, mouse and guinea pig is revealing even more genes that deserve further investigation in a rodent model other than what has been possible in mice and rats.

8. Conclusion

Two decades into the availability of the human and mouse genomes it might occur as a surprise that not all human genes with clinical implications have yet been matched to their counterpart on the mouse genome (or vice versa). Given the incredible abundance of rodents (over a quarter of all mammals, see Table 2) and the increasing number of available genomes, the whereabouts of “missing” genes might now be traceable in unprecedented ways opening new research avenues to tackle open questions. Despite the unbroken rise of publications reporting results from research employing genetically modified mice, novel research applications and genetic tools could make different genetically modified rodents available. Roughly a decade ago, genetic tools employing modified versions of the CRISPR/Cas system have entered the field of genome editing and genome engineering (Doudna and Charpentier, 2014), now allowing to introduce genetic changes in monkeys or other large animals such as pigs, dogs and cattle (Zhao et al., 2019). To which number human genes are present in, e.g., guinea pigs, that are absent in mice, needs to be determined conclusively awaiting an improved update on the guinea pig genome in the future.

Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Ethical statement

This work does not involve any research on humans and animals.

Acknowledgements

All authors wrote the article, SM and GKC edited the article. SM received funding from the Medical School of Saarland University (HOMFOR17-19); GKC receives funding from the DFG (SFB-TR152/P22).

References

- Akane, A., Shiono, H., Matsubara, K., Nakahori, Y., Seki, S., Nagafuchi, S., Yamada, M., Nakagome, Y., 1991. Sex identification of forensic specimens by polymerase chain reaction (PCR): two alternative methods. *Forensic Sci. Int.* 49, 81–88.
- Al-Mubarak, B., Abouelhoda, M., Omar, A., Aldhalaan, H., Aldosari, M., Nester, M., Alshamrani, H.A., El-Kalioby, M., Goljan, E., Albar, R., et al., 2017. Whole exome sequencing reveals inherited and de novo variants in autism spectrum disorder: a trio study from Saudi families. *Sci. Rep.* 7, 5679.
- Ardouin, O., Legouis, R., Fasano, L., David-Watine, B., Korn, H., Hardelin, J., Petit, C., 2000. Characterization of the two zebrafish orthologues of the KAL-1 gene underlying X chromosome-linked Kallmann syndrome. *Mech. Dev.* 90, 89–94.
- Ayari, B., Soussi-Yanicostas, N., 2007. FGFR1 and anosmin-1 underlying genetically distinct forms of Kallmann syndrome are co-expressed and interact in olfactory bulbs. *Dev. Genes Evol.* 217, 169–175.
- Baron, J., Säwendahl, L., De Luca, F., Dauber, A., Phillip, M., Wit, J.M., Nilsson, O., 2015. Short and tall stature: a new paradigm emerges. *Nat. Rev. Endocrinol.* 11, 735–746.
- Bassi, M.T., Schiaffino, M.V., Renieri, A., De Nigris, F., Galli, L., Bruttini, M., Gebbia, M., Bergen, A.A., Lewis, R.A., Ballabio, A., 1995. Cloning of the gene for ocular albinism type 1 from the distal short arm of the X chromosome. *Nat. Genet.* 10, 13–19.
- Bogaert, A.F., Skorska, M.N., Wang, C., Gabriele, J., MacNeil, A.J., Hoffarth, M.R., VanderLaan, D.P., Zucker, K.J., Blanchard, R., 2018. Male homosexuality and maternal

- immune responsiveness to the Y-linked protein NLGN4Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 302–306.
- Bolliger, M.F., Pei, J., Maxeiner, S., Boucard, A.A., Grishin, N.V., Südhof, T.C., 2008. Unusually rapid evolution of neuroligin-4 in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 6421–6426.
- Bouabe, H., Okkenhaug, K., 2013. Gene targeting in mice: a review. *Methods Mol. Biol.* 1064, 315–336.
- Bouchareb, R., Guaque-Olarte, S., Snider, J., Zaminski, D., Anyanwu, A., Stelzer, P., Lebeche, D., 2021. Proteomic architecture of valvular extracellular matrix: FNDC1 and MXRA5 are new biomarkers of aortic stenosis. *JACC Basic Transl. Sci.* 6, 25–39.
- Branda, C.S., Dymecki, S.M., 2004. Talking about a revolution: the impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev. Cell* 6, 7–28.
- Bromham, L., Harvey, P.H., 1996. Naked mole-rats on the move. *Behavioural ecology. Curr. Biol.* 6, 1082–1083.
- Bülow, H.E., Berry, K.L., Topper, L.H., Peles, E., Hobert, O., 2002. Heparan sulfate proteoglycan-dependent induction of axon branching and axon misrouting by the Kallmann syndrome gene *kal-1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6346–6351.
- Burgin, C.J., Colella, J.P., Kahn, P.L., Upham, N.S., 2018. How many species of mammals are there? *J. Mammal.* 99, 1–14.
- Burgoyne, P.S., 1982. Genetic homology and crossing over in the X and Y chromosomes of mammals. *Hum. Genet.* 61, 85–90.
- Canning, B.J., Chou, Y., 2008. Using guinea pigs in studies relevant to asthma and COPD. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 21, 702–720.
- Church, D.M., Goodstadt, L., Hillier, L.W., Zody, M.C., Goldstein, S., She, X., Bult, C.J., Agarwala, R., Cherry, J.L., DiCuccio, M., Mouse Genome Sequencing Consortium, et al., 2009. Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse. *PLoS Biol.* 7, e1000112.
- Clement-Jones, M., Schiller, S., Rao, E., Blaschke, R.J., Zuniga, A., Zeller, R., Robson, S.C., Binder, G., Glass, I., Strachan, T., et al., 2000. The short stature homeobox gene *SHOX* is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 9, 695–702.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., Zhang, F., 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819–823.
- D'Elia, G., Fabre, P.H., Lessa, E., 2019. Rodent systematics in an age of discovery: recent advances and prospects. *J. Mammal.* 1000, 852–871.
- Decker, E., Durand, C., Bender, S., Rödelberger, C., Glaser, A., Hecht, J., Schneider, K.U., Rappold, G., 2011. *FGFR3* is a target of the homeobox transcription factor *SHOX* in limb development. *Hum. Mol. Genet.* 20, 1524–1535.
- Dellovade, T.L., Hardelin, J.P., Soussi-Yanicostas, N., Pfaff, D.W., Schwanzel-Fukuda, M., Petit, C., 2003. Anosmin-1 immunoreactivity during embryogenesis in a primitive eutherian mammal. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 140, 157–167.
- Doudna, J.A., Charpentier, E., 2014. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346, 1258096.
- Durand, C., Roeth, R., Dweep, H., Vlatkovic, I., Decker, E., Schneider, K.U., Rappold, G., 2011. Alternative splicing and nonsense-mediated RNA decay contribute to the regulation of *SHOX* expression. *PLoS One* 6, e18115.
- Ellison, J.W., Wardak, Z., Young, M.F., Gehron Robey, P., Laig-Webster, M., Chiong, W., 1997. *PHOG*, a candidate gene for involvement in the short stature of Turner syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 6, 1341–1347.
- Flaquer, A., Rappold, G.A., Wienker, T.F., Fischer, C., 2008. The human pseudoautosomal regions: a review for genetic epidemiologists. *Eur. J. Hum. Genet.* 16, 771–779.
- Fontanesi, L., Scotti, E., Russo, V., 2008. Differences of the porcine amelogenin X and Y chromosome genes (*AMELX* and *AMELY*) and their application for sex determination in pigs. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 1662–1668.
- Franco, B., Guioli, S., Pragliola, A., Incerti, B., Bardoni, B., Tonlorenzi, R., Carozzo, R., Maestrini, E., Pieretti, M., Taillon-Miller, P., et al., 1991. A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules. *Nature* 353, 529–536.
- Franco, B., Meroni, G., Parenti, G., Levilliers, J., Bernard, L., Gebbia, M., Cox, L., Maroteaux, P., Sheffield, L., Rappold, G.A., et al., 1995. A cluster of sulfatase genes on Xp22.3: mutations in chondrodysplasia punctata (CDPX) and implications for warfarin embryopathy. *Cell* 81, 15–25.
- Gianfrancesco, F., Sanges, R., Esposito, T., Tempesta, S., Rao, E., Rappold, G., Archidiacono, N., Graves, J.A., Forabosco, A., D'Urso, M., 2001. Differential divergence of three human pseudoautosomal genes and their mouse homologs: implications for sex chromosome evolution. *Genome Res.* 11, 2095–2100.
- Graves, J.A., 1998. Interactions between *SRY* and *SOX* genes in mammalian sex determination. *Bioessays* 20, 264–269.
- Graves, J.A., 2016. Evolution of vertebrate sex chromosomes and dosage compensation. *Nat. Rev. Genet.* 17, 33–46.
- Hardelin, J.P., Dodé, C., 2008. The complex genetics of Kallmann syndrome: *KAL1*, *FGFR1*, *FGF8*, *PROKR2*, *PROK2*, et al. *Sex. Dev.* 2, 181–193.
- Hasegawa, T., Sato, F., Ishida, N., Fukushima, Y., Mukoyama, H., 2000. Sex determination by simultaneous amplification of equine *SRY* and amelogenin genes. *J. Vet. Med. Sci.* 62, 1109–1110.
- Hennessy, M.B., 2014. Filial attachment and its disruption: insights from the guinea pig. *Dev. Psychobiol.* 56, 1747–1754.
- Hennessy, M.B., Schiml, P.A., Berberich, K., Beasley, N.L., Deak, T., 2019. Early attachment disruption, inflammation, and vulnerability for depression in rodent and primate models. *Front. Behav. Neurosci.* 12, 314.
- Iwase, M., Satta, Y., Hirai, Y., Hirai, H., Imai, H., Takahata, N., 2003. The amelogenin loci span an ancient pseudoautosomal boundary in diverse mammalian species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 5258–5263.
- Iwase, M., Kaneko, S., Kim, H., Satta, Y., Takahata, N., 2007. Evolutionary history of sex-linked mammalian amelogenin genes. *Cells Tissues Organs* 186, 49–59.
- Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., Råstam, M., Colineaux, C., Gillberg, I.C., Soderstrom, H., Giros, B., Leboyer, M., Gillberg, C., Bourgeron, T., Paris Autism Research International Sibpair Study, 2003. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins *NLGN3* and *NLGN4* are associated with autism. *Nat. Genet.* 34, 27–29.
- Jamain, S., Radyushkin, K., Hammerschmidt, C., Granon, S., Boretius, S., Varoqueaux, F., Ramanantsoa, N., Gallego, J., Ronnenberg, A., Winter, D., et al., 2008. Reduced social interaction and ultrasonic communication in a mouse model of monogenic heritable autism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 1710–1715.
- Kallmann, F.J., Schoenfeld, W.A., Barrera, S.E., 1944. The genetic aspects of primary eunuchoidism. *Am. J. Mental Deficiency* 48.
- Kanojia, D., Nagata, Y., Garg, M., Lee, D.H., Sato, A., Yoshida, K., Sato, Y., Sanada, M., Mayakonda, A., Bartenhagen, C., et al., 2015. Genomic landscape of liposarcoma. *Oncotarget* 6, 42429–42444.
- Kovar, H., Aryee, D., Zoubek, A., 1999. The Ewing family of tumors and the search for the Achilles' heel. *Curr. Opin. Oncol.* 11, 275–284.
- Lagerström, M., Dahl, N., Nakahori, Y., Nakagome, Y., Bäckman, B., Landegren, U., Pettersson, U., 1991. A deletion in the amelogenin gene (*AMG*) causes X-linked amelogenesis imperfecta (*AIH1*). *Genomics* 10, 971–975.
- Lahn, B.T., Page, D.C., 2000. A human sex-chromosomal gene family expressed in male germ cells and encoding variably charged proteins. *Hum. Mol. Genet.* 9, 311–319.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., International Human Genome Sequencing Consortium, et al., 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921.
- Lau, E.C., Mohandas, T.K., Shapiro, L.J., Slavkin, H.C., Snead, M.L., 1989. Human and mouse amelogenin gene loci are on the sex chromosomes. *Genomics* 4, 162–168.
- Legouis, R., Hardelin, J.P., Levilliers, J., Claverie, J.M., Compain, S., Wunderle, V., Milasseau, P., Le Paslier, D., Cohen, D., CATERINA, D., et al., 1991. The candidate gene for the X-linked Kallmann syndrome encodes a protein related to adhesion molecules. *Cell* 67, 423–435.
- Lilue, J., Doran, A.G., Fiddes, I.T., Abrudan, M., Armstrong, J., Bennett, R., Chow, W., Collins, J., Collins, S., Czechanski, A., et al., 2018. Sixteen diverse laboratory mouse reference genomes define strain-specific haplotypes and novel functional loci. *Nat. Genet.* 50, 1574–1583.
- Lutz, B., Rugarli, E.I., Eichele, G., Ballabio, A., 1993. X-linked Kallmann syndrome. A neuronal targeting defect in the olfactory system? *FEBS Lett.* 325, 128–134.
- MacColl, G., Bouloux, P., Quinton, R., 2002. Kallmann syndrome: adhesion, afferents, and anosmia. *Neuron* 34, 675–678.
- Manara, M.C., Pasello, M., Scotlandi, K., 2018. CD99: a cell surface protein with an oncojanus role in tumors. *Genes (Basel)* 9, 159.
- Marchini, A., Marttila, T., Winter, A., Caldeira, S., Malanchi, I., Blaschke, R.J., Häcker, B., Rao, E., Karperien, M., Wit, J.M., et al., 2004. The short stature homeodomain protein *SHOX* induces cellular growth arrest and apoptosis and is expressed in human growth plate chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 37103–37114.
- Marchini, A., Ogata, T., Rappold, G.A., 2016. A track record on *SHOX*: from basic research to complex models and therapy. *Endocr. Rev.* 37, 417–448.
- Maxeiner, S., Sester, M., Krasteva-Christ, G., 2019. Novel human sex-typing strategies based on the autism candidate gene *NLGN4X* and its male-specific gametologue *NLGN4Y*. *Biol. Sex Differ.* 10, 62.
- Maxeiner, S., Benseler, F., Krasteva-Christ, G., Brose, N., Südhof, T.C., 2020. Evolution of the Autism-associated neuroligin-4 gene reveals broad erosion of pseudoautosomal regions in rodents. *Mol. Biol. Evol.* 37, 1243–1258.
- Mouse Genome Sequencing Consortium, 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, 520–562.
- Müller, C.R., Westerveld, A., Migl, B., Franke, W., Ropers, H.H., 1980. Regional assignment of the gene locus for steroid sulfatase. *Hum. Genet.* 54, 201–204.
- Murakami, M., Fujise, H., Lee, Y.S., Matsuba, C., Fujitani, H., 2001. Reliable sex identification of dogs by modified PCR/RFLP analysis. *J. Vet. Med. Sci.* 63, 679–681.
- Murcia-Belmonte, V., Esteban, P.F., García-González, D., De Castro, F., 2010. Biochemical dissection of Anosmin-1 interaction with *FGFR1* and components of the extracellular matrix. *J. Neurochem.* 115, 1256–1265.
- Murphy, W.J., Eizirik, E., O'Brien, S.J., Madsen, O., Scally, M., Douady, C.J., Teeling, E., Ryder, O.A., Stanhope, M.J., et al., 2001. Resolution of the early placental mammal radiation using Bayesian phylogenetics. *Science* 294, 2348–2351.
- Mutter, G.L., Pomponio, R.J., 1991. Molecular diagnosis of sex chromosome aneuploidy using quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 19, 4203–4207.
- Nakanishi, M., Nomura, J., Ji, X., Tamada, K., Arai, T., Takahashi, E., Bučan, M., Takumi, T., 2017. Functional significance of rare neuroligin 1 variants found in autism. *PLoS Genet.* 13, e1006940.
- Orban, P.C., Chui, D., Marth, J.D., 1992. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 6861–6865.
- Palmi, C., Vendramini, E., Silvestri, D., Longinotti, G., Frison, D., Cario, G., Shochat, C., Stanulla, M., Rossi, V., Di Meglio, A.M., et al., 2012. Poor prognosis for *P2RY8-CRLF2* fusion but not for *CRLF2* over-expression in children with intermediate risk B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 26, 2245–2253.
- Parente, D.J., Garriga, C., Baskin, B., Douglas, G., Cho, M.T., Araujo, G.C., Shinawi, M., 2017. Neuroligin 2 nonsense variant associated with anxiety, autism, intellectual disability, hyperphagia, and obesity. *Am. J. Med. Genet. A* 173, 213–216.
- Pfeiffer, I., Brenig, B., 2005. X- and Y-chromosome specific variants of the amelogenin gene allow sex determination in sheep (*Ovis aries*) and European red deer (*Cervus elaphus*). *BMC Genet.* 6, 16.

- Poveda, J., Sanz, A.B., Fernandez-Fernandez, B., Carrasco, S., Ruiz-Ortega, M., Cannata-Ortiz, P., Ortiz, A., Sanchez-Niño, M.D., 2017. *MXRA5* is a TGF- β 1-regulated human protein with anti-inflammatory and anti-fibrotic properties. *J. Cell. Mol. Med.* 21, 154–164.
- Prakash, S.K., Cormier, T.A., McCall, A.E., Garcia, J.J., Sierra, R., Haupt, B., Zoghbi, H.Y., Van Den Veyver, I.B., 2002. Loss of holocholesterol c-type synthetase causes the male lethality of X-linked dominant microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 11, 3237–3248.
- Rao, E., Weiss, B., Fukami, M., Rump, A., Niesler, B., Mertz, A., Muroya, K., Binder, G., Kirsch, S., Winkelmann, M., et al., 1997. Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat. Genet.* 16, 54–63.
- Raudsepp, T., Chowdhary, B.P., 2015. The Eutherian Pseudoautosomal Region. *Cytogenet. Genome Res.* 147, 81–94.
- Rothwell, P.E., Fuccillo, M.V., Maxeiner, S., Hayton, S.J., Gokce, O., Lim, B.K., Fowler, S.C., Malenka, R.C., Südhof, T.C., 2014. Autism-associated neuroigin-3 mutations commonly impair striatal circuits to boost repetitive behaviors. *Cell* 158, 198–212.
- Safa, A., Lau, A.R., Aten, S., Schilling, K., Bales, K.L., Miller, V.A., Fitzgerald, J., Chen, M., Hill, K., Dzwigalski, K., Obrietan, K., Phelps, M.A., Sadee, W., Oberdick, J., 2021. Pharmacological prevention of neonatal opioid withdrawal in a pregnant guinea pig model. *Front. Pharmacol.* 11, 613328.
- Salido, E.C., Yen, P.H., Koprivnikar, K., Yu, L.C., Shapiro, L.J., 1992. The human enamel protein gene amelogenin is expressed from both the X and the Y chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.* 50, 303–316.
- Sawada, R., Kamei, H., Hakuno, F., Takahashi, S., Shimizu, T., 2015. In vivo loss of function study reveals the short stature homeobox-containing (*shox*) gene plays indispensable roles in early embryonic growth and bone formation in zebrafish. *Dev. Dyn.* 244, 146–156.
- Schwanzel-Fukuda, M., Bick, D., Pfaff, D.W., 1989. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 6, 311–326.
- Schweiger, S., Schneider, R., 2003. The MID1/PP2A complex: a key to the pathogenesis of Opitz BBB/G syndrome. *Bioessays* 25, 356–366.
- Shears, D.J., Vassal, H.J., Goodman, F.R., Palmer, R.W., Reardon, W., Superti-Furga, A., Scambler, P.J., Winter, R.M., 1998. Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene *SHOX* cause Leri-Weill dyschondrosteosis. *Nat. Genet.* 19, 70–73.
- Shepard, A., Kissil, J.L., 2020. The use of non-traditional models in the study of cancer resistance—the case of the naked mole rat. *Oncogene* 39, 5083–5097.
- Soussi-Yanicostas, N., Hardelin, J.P., Arroyo-Jimenez, M.M., Ardouin, O., Legouis, R., Leveillier, J., Traincard, F., Betton, J.M., Cabanié, L., Petit, C., 1996. Initial characterization of anosmin-1, a putative extracellular matrix protein synthesized by definite neuronal cell populations in the central nervous system. *J. Cell. Sci.* 109, 1749–1757.
- Steensma, D.P., Kyle, R.A., Shampo, M.A., 2010. Abbie Lathrop, the mouse woman of Granby: rodent fancier and accidental genetics pioneer. *Mayo Clin. Proc.* 85, e83.
- Steppan, S.J., Schenk, J.J., 2017. Muroid rodent phylogenetics: 900-species tree reveals increasing diversification rates. *PLoS One* 12, e0183070.
- Steppan, S., Adkins, R., Anderson, J., 2004. Phylogeny and divergence-date estimates of rapid radiations in muroid rodents based on multiple nuclear genes. *Syst. Biol.* 53, 533–553.
- Südhof, T.C., 2008. Neuroigins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature* 455, 903–911.
- Südhof, T.C., 2018. Towards an understanding of synapse formation. *Neuron* 100, 276–293.
- Tabuchi, K., Blundell, J., Etherton, M.R., Hammer, R.E., Liu, X., Powell, C.M., Südhof, T.C., 2007. A neuroigin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. *Science* 318, 71–76.
- Thomas, K.R., Capecchi, M.R., 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51, 503–512.
- Thybert, D., Roller, M., Navarro, F.C.P., Fiddes, I., Streeter, I., Feig, C., Martin-Galvez, D., Kolmogorov, M., Janoušek, V., Akanni, W., et al., 2018. Repeat associated mechanisms of genome evolution and function revealed by the *Mus caroliand Mus paharigenomes*. *Genome Res.* 28, 448–459.
- Tiecke, E., Bangs, F., Blaschke, R., Farrell, E.R., Rappold, G., Tickle, C., 2006. Expression of the short stature homeobox gene *Shox* is restricted by proximal and distal signals in chick limb buds and affects the length of skeletal elements. *Dev. Biol.* 298, 585–596.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., et al., 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304–1351.
- Wang, G.H., Yao, L., Xu, H.W., Tang, W.T., Fu, J.H., Hu, X.F., Cui, L., Xu, X.M., 2013. Identification of *MXRA5* as a novel biomarker in colorectal cancer. *Oncol. Lett.* 5, 544–548.
- Weller, P.A., Critcher, R., Goodfellow, P.N., German, J., Ellis, N.A., 1995. The human Y chromosome homologue of XG: transcription of a naturally truncated gene. *Hum. Mol. Genet.* 4, 859–868.
- Weng, T.Y., Wang, C.Y., Hung, Y.H., Chen, W.C., Chen, Y.L., Lai, M.D., 2016. Differential expression pattern of THBS1 and THBS2 in lung cancer: clinical outcome and a systematic-analysis of microarray databases. *PLoS One* 11, e0161007.
- Wilson, D.E., Reeder, D.M., 2005. *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference*, 3rd ed. Johns Hopkins University Press.
- Wilson Sayres, M.A., Makova, K.D., 2013. Gene survival and death on the human Y chromosome. *Mol. Biol. Evol.* 30, 781–787.
- Xiao, H., Jiang, Y., He, W., Xu, D., Chen, P., Liu, D., Liu, J., Wang, X., DiSanto, M.E., Zhang, X., 2020. Identification and functional activity of matrix-remodeling associated 5 (*MXRA5*) in benign hyperplastic prostate. *Aging (Albany NY)* 12, 8605–8621.
- Xiong, D., Li, G., Li, K., Xu, Q., Pan, Z., Ding, F., Vedell, P., Liu, P., Cui, P., Hua, X., et al., 2012. You M. Exome sequencing identifies *MXRA5* as a novel cancer gene frequently mutated in non-small cell lung carcinoma from Chinese patients. *Carcinogenesis* 33, 1797–1805.
- Yagishita-Kyo, N., Ikai, Y., Uekita, T., Shinohara, A., Koshimoto, C., Yoshikawa, K., Maruyama, K., Yagishita, S., 2021. Testosterone interrupts binding of Neurexin and Neuroigin that are expressed in a highly socialized rodent, *Octodon degus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 551, 54–62.
- Yan, S., Bai, C., Li, Y., Li, Y., Hou, J., Zhao, Z., Han, W., 2013. Sex identification of dog by PCR based on the differences in the *AMELX* and *AMELY* genes. *Anim. Genet.* 44, 606.
- Yu, T., Lu, Q., Ou, X., Cao, D., Yu, Q., 2014. Association of sedentary behavior with the expression levels of biomarkers in colorectal cancer: clinical analysis of 228 patients. *J. Exp. Med.* 232, 167–176.
- Zaffalon, S., Latz, A., Krasteva-Christ, G., Maxeiner, S., 2019. Sex identification in horses (*Equus caballus*) based on the gene pair *NLGN4X/NLGN4Y*. *Anim. Genet.* 50, 551.
- Zhao, J., Lai, L., Ji, W., Zhou, Q., 2019. Genome editing in large animals: current status and future prospects. *Nat. Sci. Rev.* 6, 402–420.
- Zoonomia Consortium, 2020. A comparative genomics multitool for scientific discovery and conservation. *Nature* 587, 240–245.