

Identifizierung einer Versican  $V_2$ -basierten Splicevariante als  
IB<sub>4</sub>-bindenden Oberflächenmarker nozizeptiver,  
nicht-peptiderger C-Faserneurone

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde des  
Fachbereiches Biologie, Chemie, Pharmazie der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von Oliver Bogen  
aus Grefrath (NRW)

2005

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ferdinand Hucho (AG Neurochemie) am Institut für Chemie und Biochemie des Fachbereichs Biologie, Chemie und Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ferdinand Hucho
2. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Multhaup

Disputation am 03.05.2006

Meinen Eltern Ingeborg und Otto Renda gewidmet

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>4</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>7</b>
1.1. Proteoglykane.....	7
1.2. Versican.....	8
1.3. Lektine.....	9
1.3.1. Das Isolektin B <sub>4</sub> und die IB <sub>4</sub> -Reaktivität .....	10
1.4. Nozizeptoren .....	12
1.4.1. Peptiderge und nicht-peptiderge Nozizeptoren .....	14
1.5. IB <sub>4</sub> -Reaktivität und neuropathischer Schmerz .....	15
1.6. Aufgabenstellung .....	16
<b>2. Ergebnisse .....</b>	<b>17</b>
2.1. Analyse IB <sub>4</sub> -bindender Glykoproteine im Westernblot .....	17
2.1.1. Lassen sich die IB <sub>4</sub> -bindenden Glykoproteine durch eine Synaptosomen-Präparation anreichern? .....	18
2.1.2. Analyse der IB <sub>4</sub> -Bindungsspezifität .....	19
2.1.3. Ist das IB <sub>4</sub> -bindende Glykokonjugat tatsächlich ein Glykoprotein ?.....	21
2.2. Experimente zur Identifizierung von Versican als IB <sub>4</sub> -bindendes Kandidatenprotein .	22
2.2.1. Lässt sich das IB <sub>4</sub> -bindende Glykokonjugat über eine Affinitätschromatographie isolieren? .....	23
2.2.2. Massenspektrometrisch-basierte Datenbankanalyse zur Identifizierung des IB <sub>4</sub> -bindenden Glykoproteins.....	25
2.3. Experimente zur Verifizierung von Versican als IB <sub>4</sub> -bindendes Glykoprotein.....	30
2.3.1. Lässt sich Versican über eine Synaptosomen-Präparation anreichern? .	32
2.3.2. Weder die beiden $\beta$ -Ketten des Laminins noch eines der drei Proteine der Neurofilament-Triade sind für die IB <sub>4</sub> -Reaktivität im Hyaluronidase-Extrakt verantwortlich .....	34
2.3.3. Immunpräzipitation mit dem anti-GHAP Antikörper.....	35
2.4. Untersuchungen zur neuronalen Expression des Versicans .....	37
2.4.1. IB <sub>4</sub> -Reaktivität im Ratten-Rückenmark.....	38
2.4.2. Lassen sich Versican-Transkripte im DRG nachweisen?.....	39
2.4.3. <i>In situ</i> -Hybridisierung an DRG-Neuronen .....	40
2.4.4 Kolokalisation in der Immunfluoreszenz.....	42

2.5. Versuche zur Identifizierung der IB <sub>4</sub> -bindenden Versican-Splicevariante .....	44
2.5.1. Analyse der GAG-Domänenstruktur des IB <sub>4</sub> -bindenden Versicans.....	45
2.5.2. Analyse der Exonstruktur von Versican-Transkripten aus dem Hinterwurzelganglion .....	49
<b>3. Diskussion.....</b>	<b>52</b>
3.1. Versican-Splicevarianten: Der offene Leserahmen.....	52
3.2. Versican-Splicevarianten: Die Exons 7a und 8a .....	55
3.2.1. Das nicht-codierende Exon 8a .....	55
3.2.2. Das nicht-codierende Exon 7a .....	57
3.3. Ausblick auf zu untersuchende Fragestellungen .....	61
3.3.1. Nachweis der neuronalen Expression des IB <sub>4</sub> -bindenden Versicans V <sub>2</sub> `61	
<b>4. Zusammenfassung / Summary .....</b>	<b>63</b>
<b>5. Material und Methoden .....</b>	<b>65</b>
5.1. Präparationen.....	65
5.1.1. Präparation von leichten Membranen und Synaptosomen (Phelan und Gordon-Weeks, 1997) .....	65
5.1.2. Hyaluronidase-Extraktion nicht-löslicher Bestandteile subzellulärer Fraktionen .....	67
5.1.3. Neurofilament-Präparation (Hayes et al., 1997).....	67
5.2. Proteinbestimmung.....	69
5.2.1. Proteinbestimmung nach Schaffner und Weissmann (Schaffner und Weissmann, 1973) .....	69
5.2.2. Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976).....	71
5.3. Gelelektrophorese.....	72
5.3.1. Diskontinuierliche SDS-PAGE (Laemmli, 1970) .....	72
5.3.2. Coomassie Färbung von Acrylamidgelen (Hames, 1990).....	73
5.4. Westernblotting .....	74
5.4.1. Westernblotting mit dem Semidry-Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984)	74
5.4.2. Ponceau S – Färbung von geblotteten Proteinen (Salinovich und Montelaro, 1986).....	75
5.4.3. Analyse der IB <sub>4</sub> -Reaktivität im Westernblot .....	75
5.4.4. Analyse der Versican Immunreaktivität im Westernblot <i>Unter Verwendung des monoklonalen Maus anti-GHAP Antikörpers</i> .....	76

5.5. Affinitätschromatographie .....	77
5.6. MALDI-Massenspektrometrie .....	79
5.6.1. Tryptischer Verdau von Proteinen in Polyacrylamidgelen (Rosenfeld et al., 1992).....	79
5.6.2. Probenvorbereitung für die MALDI-Messungen .....	81
5.6.3. Durchführung der MALDI-Messungen.....	82
5.6.4. Massenspektrometrisch basierte Datenbank-Recherche zur Identifizierung von Versican .....	83
5.7. <i>In situ</i> - Hybridisierung .....	84
5.7.1. RNA-Präparation aus Ratten-DRG`s.....	84
5.7.2. cDNA-Synthese (RT-PCR) .....	84
5.7.3. PCR.....	85
5.7.4. Herstellung der Präparate für die <i>in-situ</i> Hybridisierung .....	85
5.7.5. Herstellung der Sonden für die <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	86
5.7.6. <i>in vitro</i> Transkription.....	87
5.7.7. Bestimmung der DIG-Markierung .....	87
5.7.8. <i>In situ</i> -Hybridisierung.....	89
<b>6. Materialien- und Gerätenachweis .....</b>	<b>92</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>95</b>
<b>8. Eigene Veröffentlichungen .....</b>	<b>101</b>
8.1. Originalarbeiten.....	101
8.2. Tagungsbeiträge .....	101
<b>9. Curriculum vitae .....</b>	<b>103</b>
<b>10. Danksagungen.....</b>	<b>104</b>

---

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AA	Acrylamid
Ab	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS, aa	Aminosäure
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indoylphosphat-p-Toluidinsalz
Bis	Bisacrylamid
BSA	Rinder-Serumalbumin
CS	Chondroitinsulfat
CSPG	Chondroitinsulfat-Proteoglykan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHB	Dihydroxybenzoesäure
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	DNA-Kopie
DRG	Hinterwurzelganglion
DS	Dermatansulfat
DTT	1,4 Dithio-D,L-threitol
ECL	Verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N,N-tetraacetat
EHS	Englebreth Holm-Swarm
g	Erdbeschleunigung
GAG	Glykosaminoglykan
Gal	Galaktose
GalNac	N-Acetylgalaktosamin
GDNF	Glia-derivatisierter neurotrophischer Faktor
GHAP	Glia-Hyaluronan-bindendes Protein
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HS	Heparansulfat
IB <sub>4</sub>	Isolektin B <sub>4</sub>

---

kD	Kilodalton
KS	Keratansulfat
L	Liter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
M	Molar
mA	Milliampère
MALDI	Matrix-assistierte Laserdesorptions-Ionisation
mg	Milligramm
min.	Minute
mmol	Millimol
Mw	Molekulargewicht
m/z	Masse/Ladung
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>x</sub> H <sub>x</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NC	Nitrocellulose
NF	Neurofilament
NGF	Nervenwachstumsfaktor
nmol	Nanomol
nt	Nucleotide
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ORF	offener Leserahmen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PFA	Paraformaldehyd
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PO	Meerrettichperoxidase
PSD	Zerfall nach Verlassen der Quelle
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	Boten-RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute



RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunde
SSC	Natriumchlorid-haltiges Natriumcitrat
TBS	Tris-gepufferte Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TOF	Flugzeit
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen