
2. ERGEBNISSE

2.1. Analyse IB₄-bindender Glykoproteine im Westernblot

Die beiden Laminae 1 und 2 im Hinterhorn des Rückenmarks sind Regionen mit außergewöhnlich hoher IB₄-Bindungskapazität. Man weiß - unter anderem - aufgrund von elektronenmikroskopischen Aufnahmen und der immunhistochemischen Analyse mit Enzym-konjugiertem IB₄, dass beide Laminae verhältnismäßig viele chemische Synapsen unter Beteiligung präsynaptischer Endigungen nicht-peptiderger C-Faserneurone enthalten (Ralston und Ralston, 1979; Light et al., 1979; Streit et al., 1985). Wir hatten deshalb vermutet, dass die vielen IB₄-Bindungsstellen dieser Region auf glykosylierte Membranproteine in den präsynaptischen Endigungen nicht-peptiderger, nozizeptiver C-Faserneurone zurückgeführt werden können.

Im Hinterhorn des Rückenmarks befindet sich die höchste Dichte an IB₄-Bindungsstellen. Es war deshalb naheliegend, Rückenmark als Ausgangsmaterial für unsere Versuche zur Identifizierung der IB₄-bindenden Glykoproteine zu verwenden. Da sich die IB₄-Reaktivität offensichtlich auf die chemischen Synapsen zwischen nicht-peptidergen C-Fasern und Projektions- sowie Interneuronen konzentriert, hatten wir uns überlegt, die IB₄-bindenden Glykoproteine über eine Präparation von Synaptosomen anzureichern. Synaptosomen sind vom Axon abgerissene, wiederverschlossene synaptische Nervenendigungen partikelförmiger Gestalt (Gray und Whittaker, 1962). Sie enthalten das abgeschnürte präsynaptische Axonterminal inklusive intrazellulärer Organellen wie Mitochondrien und synaptischer Vesikel, die synaptische Verbindung sowie Teile der postsynaptischen Membran und der fest mit ihr assoziierten postsynaptischen Dichte. Da Synaptosomen alle molekularen Komponenten besitzen, die für die Signalübertragung an einer intakten chemischen Synapse erforderlich sind, lassen sie sich auch - zumindest näherungsweise - als isolierte chemische Synapsen betrachten (Tom Dieck und Gundelfinger, 2000).

Um den Erfolg bzw. Misserfolg unserer Bemühungen zu kontrollieren, hatten wir uns vorgenommen, ein Protokoll zur Detektion von IB₄-bindenden Glykoproteinen im Westernblot auszuarbeiten. Alle dazu notwendigen Reagenzien, insbesondere Peroxidase-konjugiertes IB₄ und CaCl₂, waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit bereits kommerziell erhältlich. Ein Protokoll zum Nachweis von IB₄-bindenden Glykoproteinen konnte als geeignet betrachtet werden, wenn die damit erhaltenen Ergebnisse in sich konsistent und reproduzierbar sind und darüber hinaus sichergestellt ist, dass die im Blot auftretenden

Signale auf eine spezifische Interaktion zwischen dem IB₄ und seinen Epitopen am IB₄-bindenden Glykoprotein zurückgeführt werden können.

2.1.1. Lassen sich die IB₄-bindenden Glykoproteine durch eine Synaptosomen-Präparation anreichern?

Aus pragmatischen Gründen (Menge und Verfügbarkeit) hatten wir uns dazu entschieden, Schweinerückenmark für die Synaptosomen-Präparation zu verwenden.

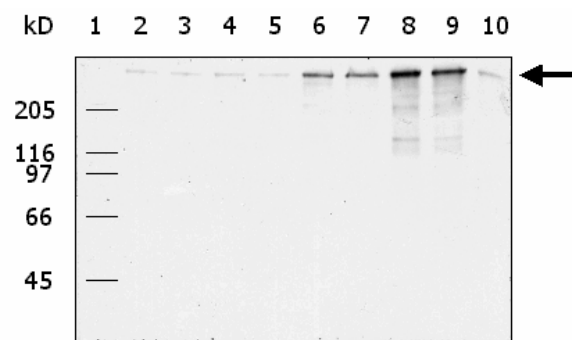


Abb. 2.1: Anreicherung der IB₄-Reaktivität im Verlauf einer Synaptosomen-Präparation. Jeweils 30 µg Protein aus verschiedenen Fraktionen einer Synaptosomen-Präparation wurden zunächst in der SDS-PAGE (7.5 % iges Trenngel) aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose (NC) - Membran geblottet. Zur Visualisierung IB₄-bindender Glykokonjugate wurde die Membran mit Meerrettichperoxidase-konjugiertem IB₄ inkubiert und unter Verwendung eines chemilumineszierenden Substrats entwickelt. Spur 1: Markerproteine, Spur 2: Homogenat (H), Spur 3: Überstand 1 (S1), Spur 4: Pellet 1 (P1), Spur 5: Überstand 2 (S2), Spur 6: Pellet 2 (P2), Spur 7: Myelin, Spur 8: leichte Membranen, Spur 9: Synaptosomen, Spur 10: Mitochondrien. Die maximale IB₄-Reaktivität (Pfeil) befindet sich in den Fraktionen der leichten Membranen und Synaptosomen.

Deutlich erkennbar ist die Anreicherung eines einzelnen IB₄-reaktiven Signals im fortschreitenden Verlauf der Präparation. Die maximale IB₄-Reaktivität befindet sich in den Fraktionen der so genannten leichten Membranen* und Synaptosomen (Spuren 8 und 9). Das apparente Molekulargewicht des entsprechenden IB₄-bindenden Glykoproteins liegt bei > 250 kD (siehe Pfeil).

Um uns zu vergewissern, dass die im Westernblot detektierten Signale auf eine spezifische Bindung zwischen dem IB₄ und seinen Epitopen am Glykoprotein zurückgeführt werden können, wollten wir nun die Spezifität der Bindung analysieren.

* Leichte Membranen enthalten Fragmente der Plasma- bzw. Axonmembran von Neuronen aber auch Membranfragmente von Gliazellen und zellulärer Organellen wie des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates.

2.1.2. Analyse der IB₄-Bindungsspezifität

Generell existieren zwei Möglichkeiten die IB₄-Bindungsspezifität zu überprüfen:

- Man kann versuchen, die Bindung zwischen den terminalen α -Galaktosiden des Glykoproteins und dem IB₄ durch den Zusatz eines Zuckers, der ebenfalls freie terminale α -Galaktoside besitzt, zu kompetieren.
- Man kann die terminalen α -Galaktoside des Glykoproteins durch die enzymatische Behandlung mit einer spezifischen Glykosidase entfernen.

In beiden Fällen wird die Anzahl möglicher Bindungen zwischen dem IB₄ und seinen Epitopen am IB₄-bindenden Glykoprotein reduziert.

Melibiose (6- α -D-Galaktopyranosyl-D-glucose) ist ein Disaccharid mit einer freien, terminalen α -D-Galaktopyranose. Es war bereits bekannt, dass Melibiose durch IB₄ gebunden wird (Hayes und Goldstein, 1974). Wir haben Melibiose deshalb dazu verwendet, die Bindungsspezifität zu untersuchen. Dazu wurden jeweils gleiche Mengen geblotteten, synaptosomalen Proteins in Gegenwart steigender Mengen Melibiose mit Peroxidase-konjugiertem IB₄ inkubiert. Bei einer spezifischen Bindung zwischen dem IB₄ und seinen Epitopen am Glykoprotein sollte sich die IB₄-Reaktivität im Westernblot in Gegenwart steigender Mengen an Melibiose - also dosisabhängig - kompetieren lassen. Das Ergebnis der Kompetition ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

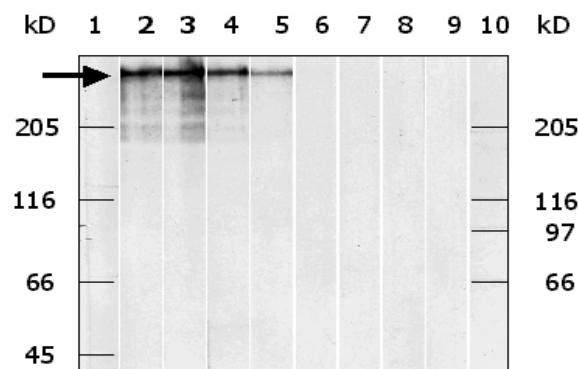


Abb. 2.2: Kompetition mit Melibiose. Jeweils 30 μ g synaptosomales Protein pro Gelspur wurden in der SDS-PAGE (7.5 % Trenngel) aufgetrennt und auf eine NC-Membran geblottet. Die Membran wurde mit Ponceau S gefärbt, um die Proteinauftrennung abzubilden und entsprechend dem Verlauf der einzelnen Gelspuren mit einem Skalpel durchtrennt. Die resultierenden Membranstreifen wurden in eine Streifenbox überführt und in Gegenwart steigender Mengen Melibiose mit Peroxidase-konjugiertem IB₄ inkubiert. Spuren 1 und 10: Marker, Spur 2: ohne Melibiose, Spur 3: 10 μ M Melibiose, Spur 4: 50 μ M Melibiose, Spur 5: 100 μ M Melibiose, Spur 6: 250 μ M Melibiose, Spur 7: 500 μ M Melibiose, Spur 8: 1mM Melibiose, Spur 9: 2 mM Melibiose. Der Pfeil zeigt die Lage der IB₄-Reaktivität im Westernblot.

Wie erwartet lässt sich die Bindung zwischen den freien α -Galaktosiden des Glykoproteins und dem IB₄ mit Melibiose kompetieren. Da jede Gelspur mit der gleichen Menge an synaptosomalem Protein beladen wurde, ist zu erwarten, dass sich auch vergleichbare Mengen des IB₄-bindenden Glykoproteins auf der Oberfläche sämtlicher Membranstreifen befinden. Da außerdem alle Streifen mit der gleichen Menge an Peroxidase-konjugiertem IB₄ inkubiert wurden, ist der einzige Unterschied zwischen den Ansätzen die Menge an Melibiose, die jedem Ansatz beigefügt wurde. Daher muss sich die dosisabhängige Reduktion der Signalintensität mit der Absättigung von Bindungsstellen am IB₄ erklären. Umso mehr Bindungsstellen am IB₄ mit Melibiose besetzt sind, desto weniger Bindungsstellen stehen für die Detektion der α -Galaktoside des IB₄-bindenden Glykoproteins zur Verfügung.

Wie einleitend erwähnt, hatten wir vermutet, dass es sich bei dem IB₄-bindenden Zielmolekül um ein glykosyliertes Membranprotein handelt. Es besteht jedoch auch die - zumindest theoretische - Möglichkeit, dass die IB₄-bindenden Epitope an einem Glykolipid oder Glykan gebunden sind. Wir hatten uns deshalb vorgenommen als Nächstes die chemische Natur des IB₄-bindenden Glykokonjugates zu analysieren.

2.1.3. Ist das IB₄-bindende Glykokonjugat tatsächlich ein Glykoprotein ?

Wenn das IB₄-bindende Glykokonjugat ein Protein ist, sollte es sich durch eine Protease hydrolysieren lassen. Proteinase K ist eine unspezifische Protease, die nahezu alle bekannten Proteine verdaut. Wir haben das Enzym deshalb dazu verwendet, herauszufinden, ob es sich bei dem IB₄-bindenden Glykokonjugat um ein Glykoprotein handelt oder nicht. Dazu wurden in verschiedenen Ansätzen jeweils gleiche Mengen Protein aus der leichten Membran-Fraktion über unterschiedlich lange Zeiträume mit der jeweils gleichen Menge an Proteinase K inkubiert. Der Verlauf der enzymatischen Proteolyse wurde von uns sowohl in der SDS-PAGE als auch im Westernblot analysiert. Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

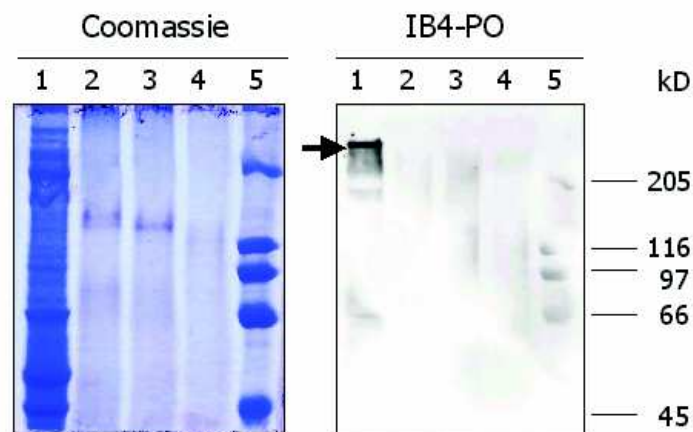


Abb. 2.3: Proteinase K Verdau. Jeweils 40 µg Protein pro Ansatz wurden mit jeweils 0.1 mg/ml Proteinase K in 100 mM Na_xH_xPO₄, pH 8 über unterschiedlich lange Zeiträume inkubiert. Jeder einzelne Verdau wurde durch die Zugabe von vierfach konzentriertem Probenpuffer und einer 10 minütigen Inkubation bei 95°C gestoppt. Alle Ansätze wurden in der SDS-PAGE (7.5% Trenngel) aufgetrennt. Eine Hälfte des Gels wurde mit Coomassie gefärbt, die andere Gelhälfte zunächst auf eine NC-Membran geblottet und im Anschluß daran auf ihre IB₄-Reaktivität im Westernblot analysiert. Spuren 1: Native leichte Membranen (LM), Spuren 2: LM nach einer 2 minütigen Inkubation mit Proteinase K, Spuren 3: LM nach 5 minütiger Inkubation, Spuren 4: LM nach 15 minütiger Inkubation, Spuren 5: Marker. Der Pfeil zeigt die Lage der IB₄-Reaktivität im Westernblot.

Deutlich erkennbar ist die enorme Effektivität des Enzyms. Schon nach einer 2 minütigen Inkubation mit Proteinase K sind kaum noch Proteinbanden im Acrylamidgel zu sehen (linke Seite, Spur 2). Auch die IB₄-Reaktivität im Westernblot geht verloren. Damit haben wir zweifelsfrei gezeigt, dass das IB₄-bindende Glykokonjugat ein Glykoprotein ist.

2.2. Experimente zur Identifizierung von Versican als IB₄-bindendes Kandidatenprotein

Wir hatten erfolgreich ein Protokoll zur Analyse der IB₄-Reaktivität im Westernblot etabliert. Außerdem hatten wir gezeigt, dass es möglich ist, ein IB₄-bindendes Glykoprotein über die subzelluläre Fraktionierung von Schweine-Rückenmark anzureichern. Deshalb konnten wir uns nun im Folgenden darauf konzentrieren, das IB₄-bindende Glykoprotein zu identifizieren. Die beiden subzellulären Fraktionen unserer Synaptosomen-Präparation mit der höchsten IB₄-Reaktivität, die leichten Membranen und Synaptosomen, sind immer noch äußerst komplexe Proteingemische. So enthält selbst ein einzelnes Synaptosom noch annähernd 1000 verschiedene Proteine in höchst unterschiedlicher Kopienzahl (Langnaese et al., 1996; Schrimpf et al., 2005). Wir mussten deshalb nach einer Methode fahnden, die es uns ermöglicht, die Probenkomplexität - unter gleichzeitiger Anreicherung des IB₄-bindenden Glykoproteins - zu reduzieren.

Die geeignetste Methode für die selektive Anreicherung einzelner Proteine aus komplexen Proteingemischen ist die Affinitätschromatographie. Sie basiert auf der spezifischen und im Allgemeinen reversiblen Interaktion von Proteinen mit einem matrixgebundenen Liganden. Wir hatten uns daher überlegt, den Versuch zu unternehmen, das IB₄-bindende Glykoprotein über eine Affinitätschromatographie mit biotinyliertem IB₄ und Streptavidin-Agarose zu isolieren.

Um das IB₄-bindende Glykoprotein selektiv aus komplexen Proteingemischen zu präzipitieren, mussten sowohl die IB₄-bindenden Epitope als auch das Protein, das durch die IB₄-Bindungsepitope modifiziert ist, vollständig solubilisiert sein. Um herauszufinden, mit welchem Detergenz sich das IB₄-bindende Glykoprotein am effektivsten aus den subzellulären Fraktionen extrahieren ließ, hatten wir verschiedene Detergenz-Extrakte im Westernblot auf ihre IB₄-Reaktivität untersucht. Dabei haben wir festgestellt, dass sich das IB₄-bindende Glykoprotein ausschließlich in Gegenwart von 1 % SDS solubilisieren ließ (Ergebnis nicht gezeigt).

Da das IB₄ ein homotetrameres und höchstwahrscheinlich allosterisches Protein ist, bestand natürlich die Gefahr, dass es in Gegenwart von SDS in seine Untereinheiten dissoziiert oder gar vollständig denaturiert (Ketis et al., 1980). Um den Einfluß von SDS auf die Bindungseigenschaften des IB₄ zu analysieren, hatten wir deshalb zunächst geblottete Proteine aus den leichten Membranen in Gegenwart unterschiedlicher SDS-Konzentrationen

auf ihre IB₄-Reaktivität untersucht. Falls durch SDS die strukturelle Integrität des IB₄ beeinträchtigt wird, sollten sich seine Bindungseigenschaften verändern.

Überraschenderweise ließ sich jedoch in keinem der Ansätze eine Abnahme in den Signalintensitäten beobachten (Ergebnis nicht gezeigt). Das SDS scheint deshalb auch keinen negativen Einfluß auf die Bindungseigenschaften des IB₄ auszuüben. Obwohl uns die Ursache dafür unbekannt ist, hatten wir uns natürlich dazu entschlossen, die Durchführung einer Affinitätschromatographie in Gegenwart von SDS zu erproben.

2.2.1. Lässt sich das IB₄-bindende Glykokonjugat über eine Affinitätschromatographie isolieren?

Wir hatten festgestellt, dass sich das IB₄-bindende Glykoprotein ausschließlich mit SDS aus den leichten Membranen extrahieren lässt. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass die Detektion des IB₄-bindenden Glykoproteins im Westernblot durch die Gegenwart von SDS nicht beeinträchtigt wird, aber Ca²⁺-abhängig ist. Deswegen hatten wir uns dazu entschieden, die Affinitätschromatographie in Gegenwart von SDS und Ca²⁺-Ionen durchzuführen. Das Ergebnis des Experiments ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

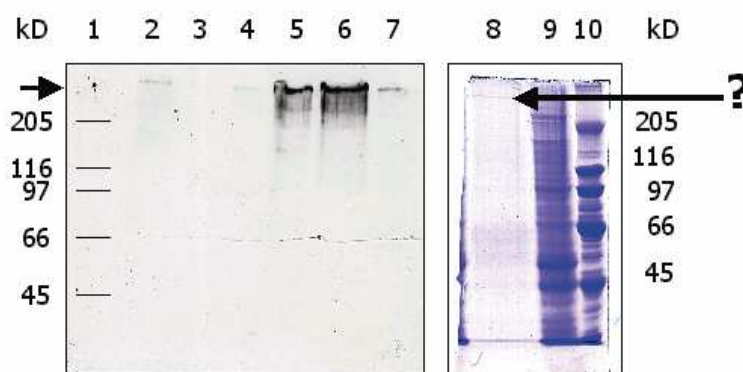


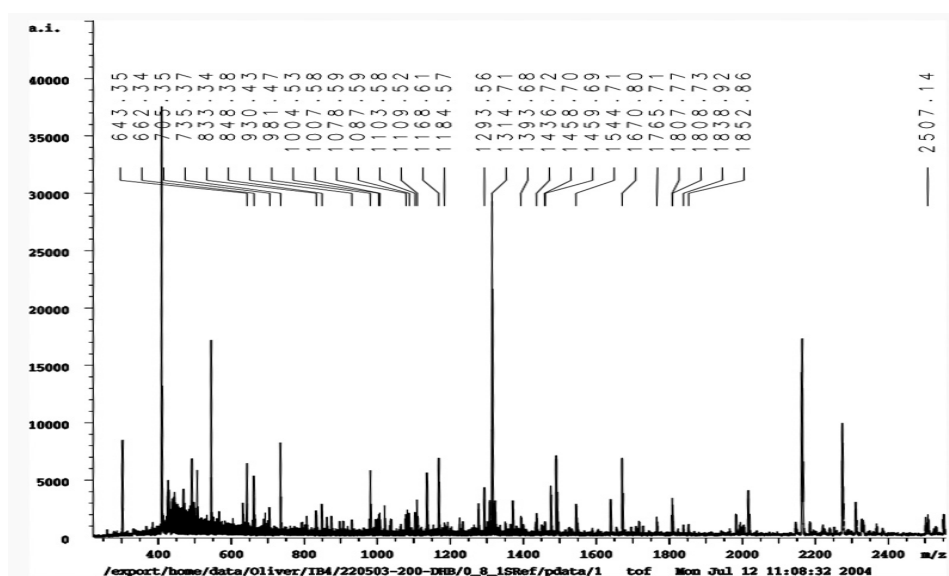
Abb. 2.4: Affinitätschromatographie mit IB₄-Biotin und Streptavidin-Agarose. Mit SDS extrahierte IB₄-bindende Glykokonjugate wurden mit IB₄-Biotin und Streptavidin-Agarose präzipitiert. Spezifisch an das IB₄ gebundene Moleküle wurden unter Ca²⁺-Entzug eluiert (Spuren 6 und 8), unspezifisch an die Agarose gebundene Proteine durch die Inkubation mit vierfach konzentriertem Probenpuffer (Spuren 7 und 9). Alle konzentrierten Fraktionen wurden in der SDS-PAGE (7.5 % iges Trenngel) aufgetrennt. 2/3 des Gels wurden geblottet, 1/3 mit Coomassie gefärbt. Der Blot wurde mit IB₄-PO auf seine IB₄-Reaktivität untersucht. Spur 1: Marker, Spur 2: 15 µl des SDS-Extraktes, Spur 3: 15 µg Protein aus den extrahierten leichten Membranen, Spur 4: 15 µg ungebundene d. h. nicht präzipitierte Proteine aus dem SDS-Extrakt, Spur 5: kombinierte Waschschritte, Spur 6: die Hälfte aller unter Ca²⁺-Entzug eluierten Proteine, Spur 7: die Hälfte aller mit Probenpuffer eluierten Proteine, Spur 8: die Hälfte der unter Ca²⁺-Entzug eluierten Proteine, Spur 9: die Hälfte der mit Probenpuffer eluierten Proteine; Spur 10: Marker. Die Pfeile zeigen die Lage des IB₄-bindenden Glykoproteins im Westernblot und dem dazu korrespondierenden Protein im mit Coomassie gefärbten Acrylamidgel.

Im Westernblot ist deutlich die Anreicherung eines einzelnen IB₄-reaktiven Signals zu erkennen. Das Molekulargewicht des korrespondierenden Glykoproteins beträgt > 250 kDa. Im mit Coomassie gefärbten Teil des Gels ist ebenfalls nur eine einzige deutlich sichtbare Proteinbande erkennbar. Das apparente Molekulargewicht des entsprechenden Proteins liegt ebenfalls bei > 250 kDa. Da beide Spuren mit jeweils der Hälfte des Proteins beladen wurden, das unter Ca²⁺-Entzug eluiert wurde, kann man davon ausgehen, dass die IB₄-Reaktivität im Westernblot und die mit Coomassie gefärbte Proteinbande auf ein und dasselbe Protein zurückgeführt werden können.

Um herauszufinden, um welches Protein es sich handelt, haben wir die Coomassie Bande ausgeschnitten und für eine massenspektrometrische Analyse präpariert.

2.2.2. Massenspektrometrisch-basierte Datenbankanalyse zur Identifizierung des IB₄-bindenden Glykoproteins

Die mit Coomassie angefärbte Proteinbande (s. Abb.2.6, Spur 6) auf Höhe des IB₄-reaktiven Signals im korrespondierenden Westernblot (s. Abb. 2.6, Spur 8) wurde zunächst mit Trypsin verdaut und die daraus resultierenden Peptide anschließend in einem Matrix-Assistierten-Laser-Desorptions-Ionisations (MALDI)- Flugzeit (Time Of Flight, TOF)-Massenspektrometer unter kontinuierlicher Extraktion analysiert. Das aufgenommene Molekülmassenspektrum ist in der folgenden Abbildung dargestellt.



konnte und die dabei erhaltene Sequenz der für diese Peptidmasse vorhergesagten Sequenz aus dem zugeordneten Protein entsprach.

Wir haben insgesamt drei verschiedene Peptide aus dem Molekülmassenspektrum des affinitätsgereinigten IB₄-bindenden Glykoproteins ausgewählt** und über die Aufnahme von Fragmentationenspektren (Post Source Decay, PSD) sequenziert. Die Sequenzen aller drei ausgewählten Peptide stimmten mit den für diese Peptidmasse vorhergesagten Sequenzen aus dem humanen Versican überein (s. Abb. 2.9, 2.10, 2.11). Zwei der drei Sequenzen konnten darüber hinaus auch durch Sequenzen des porcinen Versicans verifiziert werden (Datenbank-Eintrag AAF19155.1). Wir konnten deshalb davon ausgehen, dass das affinitätsgereinigte IB₄-bindende Glykoprotein tatsächlich Versican entspricht.

Aminoacids	Peptidemass [M+H] ⁺ (found)	Peptidemass (expected)	Peptidemass (calculated)	Difference	Sequence
229-233	643.35	642.34	642.31	0.03	TYGFR
1637-1641	705.34	704.34	704.32	0.02	WQESR
1573-1578	735.36	734.36	734.37	-0.01	DGFIQR
1334-1340	833.34	832.33	832.39	-0.05	TGPDRC
1435-1441	848.38	847.37	847.38	-0.01	TWDDAER
1422-1428	930.43	929.42	929.41	0.02	FQGQCYK
1478-1484	981.47	980.46	980.42	0.05	MFEHDFR
66-73	1004.53	1003.52	1003.53	-0.01	WSKIEWDK
1561-1568	1007.58	1006.57	1006.54	0.03	YEINSLIR
120-129	1078.59	1077.58	1077.58	0.00	LLASDAQLYR
313-323	1087.59	1086.58	1086.56	0.02	AQCGGGLLGVR
746-755	1168.61	1167.60	1167.62	-0.01	SDFPFLITK
161-170	1184.57	1183.56	1183.59	-0.02	YTLNFEAAQK
1435-1444	1293.56	1292.55	1292.56	-0.01	TWDDAERECR
277-288	1314.71	1313.70	1313.71	-0.01	LATVGLQLAAMR
1579-1590	1393.68	1392.67	1392.74	-0.07	HLPTIRCLGNR
1126-1139	1436.72	1435.71	1435.80	-0.09	IGPKVSLSPGPEQK
1384-1396	1458.70	1457.69	1457.64	0.06	NGATCVDGRNTR
512-524	1459.69	1458.68	1458.77	-0.09	EFVVTETPLVTAR
1465-1477	1544.71	1543.70	1543.74	-0.04	VGHYQWIGLNDK
156-170	1670.80	1669.79	1669.84	-0.05	AATSR YTLNFEAAQK
1445-1464	2310.19	2309.18	2309.16	0.02	LQGAHLTSLSHHEEQMFVNR
1465-1484	2507.14	2506.13	2506.15	-0.02	VGHYQWIGLNDKMFHDFR

Abb. 2.6: Liste von Peptidmassen des affinitätsgereinigten IB₄-bindenden Glykoproteins, die Peptiden aus der Aminosäuresequenz des humanen Versicans V₂ zugeordnet werden können (Datenbank-Eintrag AAA67565.1). Aus dem Molekülmassenspektrum (s. Abb. 2.7) wurden insgesamt 33 verschiedene Molekülmassen ausgewählt und Software-unterstützt mit den virtuell erzeugten Molekülmassen tryptischer Peptide von 221458 verschiedenen Sequenzeinträgen aus der NCBI-nr-Datenbank verglichen. Die humane Versican-Splicevariante V₂ ist das Protein, dessen virtuell generiertes Peptidmassenspektrum die höchste Übereinstimmung mit dem Molekülmassenspektrum des IB₄-bindenden Glykoproteins besitzt.

* bei interner Kalibrierung anhand von Peptiden aus dem tryptischen Eigenverdau und Proben die nach der FENC (Fast Evaporation/Nitrocellulose) -Methode für die MALDI-Messungen präpariert wurden.

** Die beiden Peptide mit der Molekülmasse von 1314.71 Da und 1670.80 Da wurden direkt aus dem in Abbildung 2.7. dargestellten Peptidmassenspektrum ausgewählt. Das Peptid mit der Molekülmasse 2015.91 Da trat erst nach einer zusätzlichen chromatographischen Aufreinigung der tryptischen Peptide im Zip-Tip im Peptidmassenspektrum auf (nicht gezeigt).

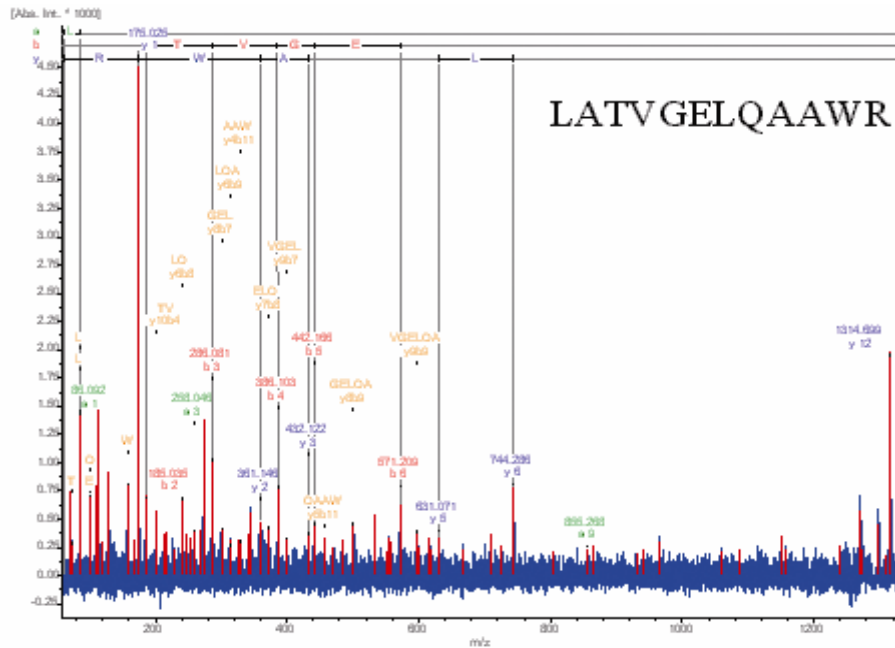


Abb. 2.7: Fragmentionen-Spektrum eines ausgewählten tryptischen Peptids aus dem Molekülmassenspektrum des IB_4 -bindenden Glykoproteins. Das Peptid mit einer Molekülmasse von 1314.71 Da und der Sequenz LATVGELQAAWR entspricht den Aminosäuren 277-288 aus der Sequenz des humanen Versicans. Die Sequenz stimmt außerdem mit der für diese Peptidmasse vorhergesagten Sequenz des porcinen Versicans überein (Datenbank-Eintrag AAF19155.1).

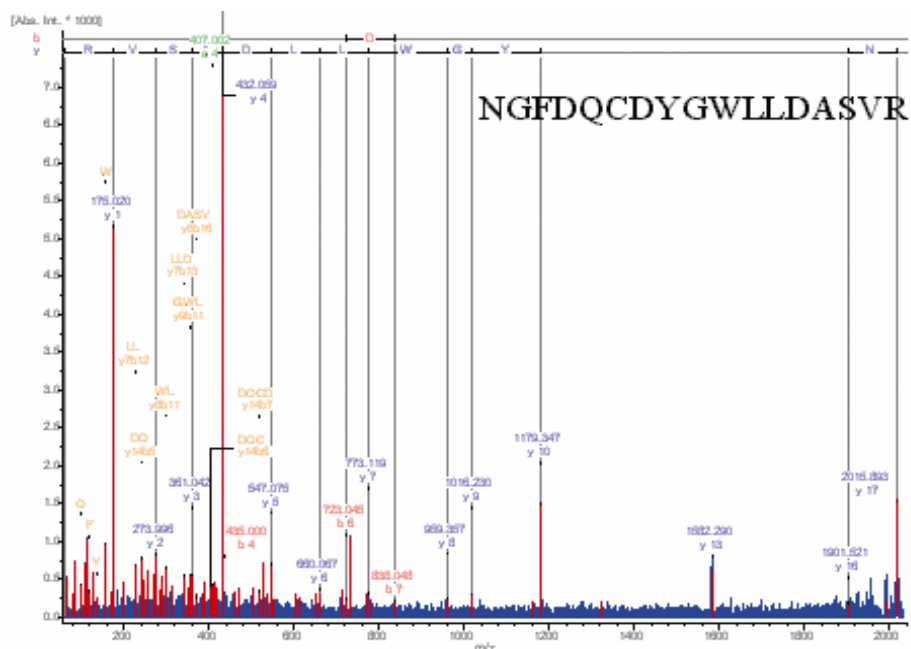


Abb. 2.8: Fragmentionen-Spektrum eines zweiten tryptischen Peptids aus dem Molekülmassenspektrum des IB_4 -bindenden Glykoproteins. Das Peptid mit der Molekülmasse von 2015.91 Da besitzt die Sequenz NGFDQCDYGWLLDASVR und umfasst die Aminosäuren 289-305 aus der Sequenz des humanen Versicans. Die Sequenz stimmt außerdem mit der für diese Peptidmasse vorhergesagten Sequenz des porcinen Versicans überein (Datenbank-Eintrag AAF19155.1).

```

1 MFINIKSILWMCSTLIVTHALHKVKVGKSPVVRGSLSGKVS L PCHF STMP TLP PPSYNTSE
61 FLRIKWSKIEVDKNGKDLKETTVLVAQNGNIKIGQDYKGRVSVPTHPEAVGDASLTVVKL
121 LASDAGLYRCDVMYGIEDTQDTVSLTVDGVVVHYRAATSRYTLNFEAAQKACLDVGVAVIA
181 TPEQLFAAYEDGFEQCDAGWLADQTVRYPIRAPRVGCYGDKMGKAGVRYTYGFRSPQETYD
241 VYCYVDHLDGDVDFHLTVPSKFTFEEAAKECENQDARLATVGELQAAWRNGFDQCDYGWLS
301 DASVRHPVTVARAQCGGLLGVRTLYRFENQTGFPPDSRFDAYCFKPKK EATTIDLSILA
361 ETASPSLSKEPQMVSDRTPPIIPLVDELPIVPTTEFPVGNIVSFEQKATVQPQAITDSL A
421 TKLPTPTGSTKKPMDMDDYSPSASGPLGKLDISEIKEEVLQSTTGVSHYATDSWDGVVED
481 KQTQESVTQIEQIEVGPLVTSMEILKHIPSKEFPVTETPLVTARMILESKTEKKMVSTVS
541 ELVTTGHYGF TLGEEDEDRTLTVGSDESTLIFDQIPEVITVSKTSEDTIHTHLEDLESV
601 SASTTVSPLIMPDNNGSSMDDWEERQTSGRITEEFLGKYLSTTPFPSQHRTEIELFPYSG
661 DKILVEGISTVIYPSLQTEMTHRRERTETLIPEMRTDTYTDEIQEEITKSPFMGKTEEEV
721 FSGMKLSTLSLEPIHVTESSVEMTKSDFPTLITKLSAEPTEVRDMEEDFTATPGTTKYD
781 ENITTVLLAHGTL SVEAATVSKWSWDEDNNTTSKPLESTEPSASSKLPPALLTVGMNGKD
841 KDIPSFTEDGADEF TLI PDSTQKQLEEVTDEDIAAHGKFTIRFQPTTSTGIAEKSTLRDS
901 TTEEKVPPITSTEGQVYATMEGSALGEVEDVDLSKPVSTVPQFAHTSEVEGLAFVYSST
961 QEPTTYVDS SHTIPLSVIPKTDWGVLPVSPVSEDEV LGEPSQDILVIDQTRLEATISPET
1021 MRTTKITEGTTQEEFPWKEQTAEKPV PALSSTAWTPKEAVTPLDEQEGDGSAYTVSEDEL
1081 LTGSERV PVLETPVGKIDHSVSYPPGAVTEHKVKTDEVVTLTPRIGPKVSLSPGPEQKY
1141 ETEGSSTTGFTSSLSPFSTHITQLM EETTTEKTSLEDIDLGSGLFEKPKATELIEFSTIK
1201 VTVPSDITTAFFSSVDR LH TTS AFKPSSAITKKPPLIDREPGEETSDMVIIGESTSHVPP
1261 TTLEDIVAKETETDIDREYFTTSSPPATQPTRPPTVEDKEAFGPQALSTPQP PASTKFHP
1321 DINVYIIIEVRENKTGPDRCKMNPCLNGGTCYPTETS YVCTCVPGYSGDQCELDFDECHSN
1381 PCRNGATCVDGFNTFRCLCLPSYV GALCEQDTE TCDYGWHKFQGQCYKYFAHRRTWDAAE
1441 RECRLQGAHLTSILSHEEQMFVNRVGHDYQWIGLNDKMFEHDFRWTDGSTLQYENWRPNQ
1501 PDSFFSAGEDCVV I IWHENGQWNDVPCNYHLTYTCKKGTVACGQPPVVENAKTFGKMKPR
1561 YEINSLIRYHCKDGFIQRHLPTIRCLGNGRWAIPKITCMNPSAYQRTYSMKYFKNSSAK
1621 DNSINTSKHHRWSRRWQESRR

```

Abb. 2.9: Aminosäuresequenz der humanen Versican Splicevariante V₂. Tryptische Peptide des affinitäts-gereinigten IB₄-bindenden Glykoproteins, deren Molekülmassen Sequenzen aus dem humanen Versican V₂ zugeordnet werden konnten, sind fett hervorgehoben. Peptide, deren Sequenz zusätzlich über Fragmentationsspektren verifiziert wurden, sind zusätzlich unterstrichen. Drei der im Molekülmassenspektrum auftretenden Peptidmassen können Peptiden aus der GAG α - Domäne zugeordnet werden. Peptidmassen, die mit Sequenzen tryptischer Peptide aus der GAG β -Domäne korrespondieren, wurden nicht identifiziert.

Bisher sind 4 verschiedene Splicevarianten vom Versican auf Proteinebene beschrieben (Wight, 2002). Alle vier Varianten V₀, V₁, V₂ und V₃ besitzen hoch konservierte N- und C-Termini, unterscheiden sich aber hinsichtlich der Größe ihres Kernproteins (der deglykosylierten Polypeptidkette) und der Anzahl an kovalent gebundenen Chondroitinsulfat-Seitenketten voneinander. Sowohl die Größe des Kernproteins als auch die Anzahl gebundener Chondroitinsulfate werden von der An- bzw. Abwesenheit so genannter Glykosaminoglykan (GAG) -Anheftungsdomänen im Versican bestimmt. V₀, die größte Splicevariante des Versicans, besitzt beide GAG-Domänen, die GAG α - und die GAG β -Domäne. V₁ besitzt nur die GAG β - Domäne, V₂ nur die GAG α - Domäne und V₃ keine einzige dieser Domänen.

Der Umfang dieser Domänen variiert zwischen 961 (Maus) und 988 (Mensch) Aminosäuren für die GAG α - Domäne und 1744 (Maus) und 1754 (Mensch) Aminosäuren für die GAG β - Domäne. Da die GAG α -Domäne über 5 bis 8 potentielle Chondroitinsulfat-Anheftungssequenzen, die GAG β -Domäne sogar über 12 bis 15 dieser Anheftungsmotive verfügt, können zwischen 17 und 23 Glykosaminogolykan-Seitenketten an V_0 gebunden sein. Damit wird jetzt auch verständlich, warum von dem Computer-Programm, das für den Abgleich der Molekülmassen mit den virtuell generierten Peptidmassen tryptischer Peptide aus der NCBI-Datenbank ausgerechnet V_2 als Kandidat für das affinitätsgereinigte Glykoprotein vorgeschlagen wurde. Obwohl die überwiegende Anzahl der Molekülmassen des IB_4 -bindenden Glykoproteins den konservierten amino- und carboxyterminalen Sequenzen des Versicans zugeordnet werden konnten, wurden drei der Molekülmassen aus dem Molekülmassenspektrum des IB_4 -bindenden Glykoproteins tryptischen Peptiden aus der GAG α -Domäne, aber kein einziges der GAG β -Domäne zugeordnet. Damit kam ausschließlich V_2 als Kandidat für das affinitätsgereinigte Glykoprotein in Frage.

2.3. Experimente zur Verifizierung von Versican als IB₄-bindendes Glykoprotein

Insgesamt 23 der 33 ausgewählten Molekülmassen aus dem Molekülmassenspektrum des affinitätsgereinigten Proteins ließen sich tryptischen Peptiden aus der Aminosäuresequenz des humanen Versicans V₂ zuordnen. Darüber hinaus konnten wir drei tryptische Peptide über die Aufnahme von Fragmentationenspektren sequenzieren. Alle drei Sequenzen stimmten mit den für diese Peptidmassen vorhergesagten Sequenzen aus dem humanen Versican überein. Zwei der drei Sequenzen ließen sich außerdem über einen Vergleich mit Sequenzen des porcinen Versicans verifizieren. Dass die dritte Sequenz nicht verifiziert werden konnte, lag vermutlich ausschließlich daran, dass vom porcinen Versican zum Zeitpunkt der Auswertung nur ein 104 Aminosäuren umfassender Abschnitt bekannt war und die Sequenz des dritten Peptids darin nicht enthalten ist. Es gab deshalb keinen Zweifel, dass es sich bei dem affinitätsgereinigten Protein tatsächlich um eine V₂-basierte Splicevariante handelt.

War es allerdings auch möglich, dass Versican das von uns gesuchte IB₄-bindende Glykoprotein ist? Es gab mindestens zwei Gründe dafür, dies ernsthaft in Erwägung zu ziehen. Der erste Grund betraf die Spezifität der durchgeführten Affinitätschromatographie. Da die IB₄-Bindung Ca²⁺-abhängig ist, hatten wir die Affinitätschromatographie auch in Gegenwart von Ca²⁺-Ionen durchgeführt. Die Ca²⁺-Abhängigkeit der IB₄-Bindung wurde dadurch bestätigt, dass die Fraktion, die unter Ca²⁺-Entzug eluiert wurde, von allen im Westernblot getesteten Fraktionen die höchste IB₄-Reaktivität besaß. In der Spur des Acrylamidgels, in der die andere Hälfte des unter Ca²⁺-Entzug eluierten Präzipitats analysiert wurde, ließ sich nur eine einzelne, mit Coomassie gefärbte Proteinbande eindeutig lokalisieren. Das apparente Molekulargewicht des Proteins entsprach exakt dem des IB₄-bindenden Glykoproteins im korrespondierenden Westernblot und war das Molekül, das wir mit Hilfe einer massenspektrometrisch-basierten Datenbank Analyse - unzweifelhaft - als Versican V₂ identifiziert hatten.

Ein weiterer Grund dafür, die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, dass Versican das Molekül ist, das für die von uns detektierte IB₄-Reaktivität verantwortlich ist, sind seine zwischen 17 (Maus V₀, Swiss-Prot: Q62059) und 23 (humanes V₀, Swiss-Prot: P13611) potentiellen N-Glykosylierungsstellen. Alle bisher eindeutig identifizierten IB₄-bindenden Glykoproteine, wie z. B. die β1- und β2- Ketten des Laminins, das Thyroglobulin und Fibrinogen, enthalten N-glykosidisch an Asparagin gebundene Oligosaccharide des komplexen Typs, mit freien

terminalen α -Galactosiden (Fujiwara et al., 1988; Thall und Galili, 1990). Diese Stellen könnten also auch beim Versican als Sitz potentieller IB₄-Bindungsstellen in Frage kommen. Der einzige Grund, der gegen Versican als potentiell IB₄-bindendes Glykoprotein nicht-peptiderger C-Faserneurone sprach, war der fehlende Hinweis auf eine neuronale Expression. So ist zwar bekannt, dass Versican V₂ gewebespezifisch im zentralen Nervensystem exprimiert wird; allerdings wird die Expression nicht Neuronen sondern Gliazellen zugeschrieben (Schmalfeld et al., 1998; Asher et al., 2002).

Dass noch niemand eine neuronale Expression von Versican beschrieben hat, bedeutet jedoch nicht zwangsläufig, dass Versican ausschließlich nicht-neuronalen Ursprunges ist. Für alle drei anderen zur Familie der so genannten Hyalactine zählenden Mitglieder Neurocan, Brevican und Aggrecan ist jedenfalls eine neuronale Expression belegt (Wang und Dow, 1997; Seidenbecher et al., 1998; Matthews et al., 2002). Es erschien deshalb äußerst wahrscheinlich, dass auch Versican durch Neuronen exprimiert wird.

Aufgrund der dargelegten Argumente bestand zumindest eine gewisse Wahrscheinlichkeit dafür, mit Versican tatsächlich dasjenige Molekül identifiziert zu haben, welches für die von uns detektierte IB₄-Reaktivität des Rückenmarks verantwortlich ist. Wir wollten uns deshalb im Folgenden darauf konzentrieren, herauszufinden, ob Versican tatsächlich das von uns gesuchte IB₄-bindende Glykoprotein ist.

2.3.1. Lässt sich Versican über eine Synaptosomen-Präparation anreichern?

Wenn Versican das IB₄-bindende Glykoprotein ist, sollte es sich - analog zur IB₄-Reaktivität - im Verlauf einer Synaptosomen-Präparation anreichern. Versican ist über seine Bindung an Hyaluronan mit der Plasmamembran von Zellen assoziiert (Lebaron et al., 1992). Deshalb sollte es sich über den spezifischen Abbau von Hyaluronan von Membranen freisetzen lassen. Um herauszufinden, ob auch Versican im Verlauf einer Synaptosomen-Präparation angereichert wird, haben wir sämtliche membranären Bestandteile in den verschiedenen Fraktionen der Synaptosomen-Präparation über eine ausreichend starke Zentrifugation pelletiert und mit Hyaluronidase inkubiert. Die daraus resultierenden Extrakte wurden im Westernblot unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen die hoch konservierte N-terminale GHAP-Domäne des Versicans analysiert (Asher et al., 1991). Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

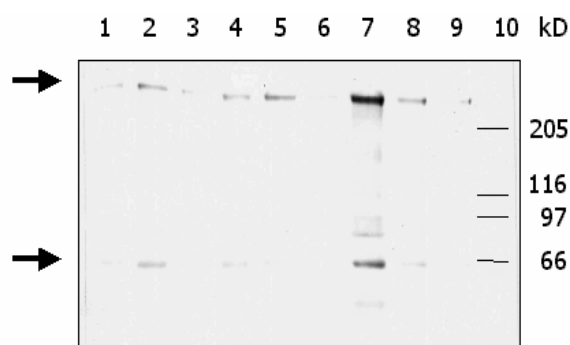


Abb. 2.10: Anreicherung von Versican im Verlauf einer Synaptosomen-Präparation. Jeweils 1 mg Protein pro Fraktion wurden durch eine 30 minütige Zentrifugation bei 436 000 g pelletiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden in 0.15 M NaCl und Protease Inhibitor haltigem 0.05 M Na_xH_xPO₄-Puffer, pH 5.3 resuspendiert. Jeweils 250 µg Protein aus jeder Fraktion wurden über 2 h bei 37 °C mit Hyaluronidase inkubiert. Von den abgetrennten und konzentrierten Extrakten wurden je 15 µg Protein pro Fraktion in der SDS-PAGE (7.5%) aufgetrennt und auf eine NC-Membran geblottet. Der Blot wurde unter Verwendung eines monoklonalen anti-GHAP Antikörpers entwickelt. Spur 1: Homogenat, Spur 2: Überstand 1, Spur 3: Pellet 1, Spur 4: Überstand 2, Spur 5: Pellet 2, Spur 6: Myelin, Spur 7: leichte Membranen, Spur 8: Synaptosomen, Spur 9: Mitochondrien, Spur 10: Marker. Der obere Pfeil deutet auf die Lage von Versican, der untere auf die von GHAP im Westernblot.

Der durch die Hyaluronidase katalysierte Abbau von Hyaluronan hat offenbar funktioniert. Versican (oberer Pfeil) lässt sich in fast allen Fraktionen der Präparation erfolgreich detektieren. Interessanterweise befindet sich die höchste Versican-Konzentration - analog zur Konzentration des IB₄-bindenden Glykokonjugates - in der Fraktion der leichten Membranen.

Die zusätzlich auftretenden Signale um 66 kDa (unterer Pfeil) dürften auf die Bindung des Antikörpers an GHAP, den N-Terminus von Versican, zurückzuführen sein (Perides et al., 1995; Westling et al., 2004).

Wenn Versican das IB₄-bindende Glykoprotein ist, sollte seine Membran-Freisetzung mit einer Freisetzung der IB₄-Reaktivität korrelieren. Deshalb haben wir den Westernblot zunächst gestrippt und anschließend mit Hilfe von IB₄-PO auf seine IB₄-Reaktivität untersucht. Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

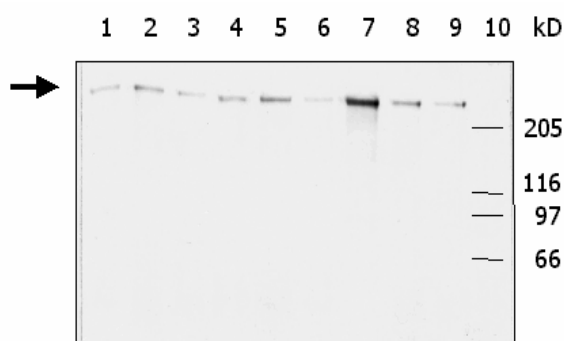


Abb. 2.11: Analyse der IB₄-Reaktivität in den Hyaluronidase-Extrakten. Der Westernblot aus Abb. 2.12. wurde zunächst unter leichtem Schütteln für 30 min. bei 40°C mit 2 % (w/v) SDS und 10 mM β -Mercaptoethanol haltigem 62.5 mM Tris-HCl-Puffer, pH 6.7 (Stripping Puffer) inkubiert und unter mehrmaligem Wechsel von TBS-T ausgiebig gewaschen. Anschließend wurde der Blot mit 1 % BSA haltigem TBS über Nacht blockiert und unter Verwendung von IB₄-PO auf seine IB₄-Reaktivität untersucht. Spur 1: Homogenat, Spur 2: Überstand 1, Spur 3: Pellet 1, Spur 4: Überstand 2, Spur 5: Pellet 2, Spur 6: Myelin, Spur 7: leichte Membranen, Spur 8: Synaptosomen, Spur 9: Mitochondrien, Spur 10: Marker. Der Pfeil zeigt die Lage der IB₄-Reaktivität.

Das IB₄-bindende Glykoprotein lässt sich offensichtlich nicht nur ebenfalls über den Abbau von Hyaluronan von Membranen freisetzen; wie man anhand eines Vergleichs der detektierten Immunreaktivitäten relativ leicht erkennen kann, entspricht sein apparentes Molekulargewicht auch exakt dem des Versicans (siehe dazu auch Abb. 2.12).

Die GHAP-Signale treten allerdings nicht mehr auf. Vermutlich weil GHAP keine IB₄-bindenden Epitope enthält.

2.3.2. Weder die beiden β -Ketten des Laminins noch eines der drei Proteine der Neurofilament-Triade sind für die IB₄-Reaktivität im Hyaluronidase-Extrakt verantwortlich

Während unserer Versuche, Versican als IB₄-bindendes Glykoprotein zu verifizieren, wurde eine Arbeit veröffentlicht, in der ihre Autoren behaupten, dass die IB₄-Reaktivität im Hinterwurzelganglion unter anderem auf das leichte und mittlere Neurofilament (NF-L und NF-M) sowie die β 2-Kette des Laminins zurückzuführen ist (Fullmer et al., 2004). Da diese Befunde alle unsere bisher erhaltenen Ergebnisse in Frage stellten, waren wir dazu gezwungen, das Gegenteil zu beweisen.

Um auszuschließen, dass eine der beiden β -Ketten des Laminins oder aber eines der drei Neurofilamente für die von uns detektierte IB₄-Reaktivität verantwortlich sind, haben wir das Hyaluronidase-Extrakt mit Antikörpern gegen diese Proteine untersucht. Als Positivkontrolle für die Immunreaktivität haben wir eine NF-Präparation aus dem Schweine-Rückenmark sowie kommerziell erhältliches Laminin 1 aus dem EHS-Sarkom verwendet. Das Ergebnis des Experiments ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

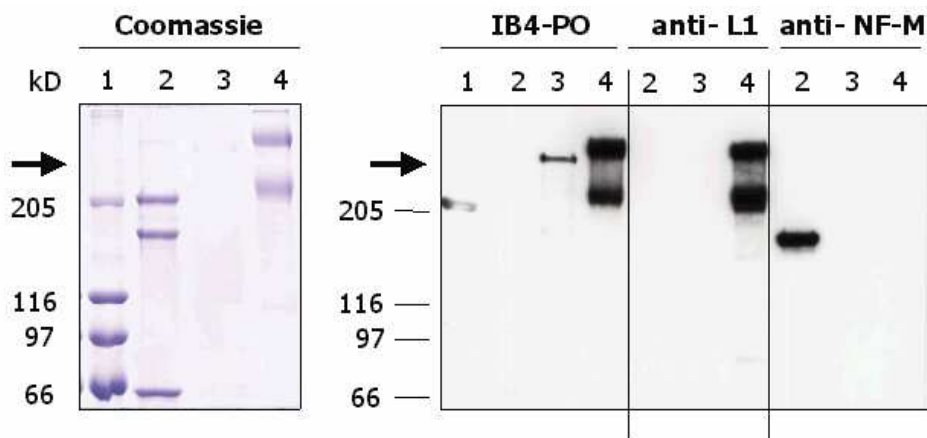


Abb. 2.12: Weder die beiden β -Ketten des Laminins noch eines der drei Polypeptide der Neurofilament-Triade ist für die IB₄-Reaktivität im Rückenmark verantwortlich. Links: 5 μ g Protein aus einer porcinen NF-Präparation (Spur 2, NF-L 66 = kDa, NF-M = 160 kDa, NF-H = 205 kDa), 10 μ g des Hyaluronidase-Extraktes (Spur 3) und 2.5 μ g kommerziell erhältliches Laminin 1 aus dem EHS-Sarkom (Spur 4, Mw: α -Kette > β 1-Kette > β 2-Kette) wurden in einem 5 - 7.5 % igen Gradientengel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Rechts: Entsprechend der Beladung des mit Coomassie gefärbten Acrylamidgels auf der linken Seite wurden Proteine aus der NF-Präparation (Spuren 2), des Hyaluronidase-Extraktes (Spuren 3) und Laminin 1 (Spuren 4) nach ihrer Auftrennung in der SDS-PAGE geblottet. Spuren 1 jeweils Marker. Die NC-Membran wurde mit Ponceau S gefärbt, um den Verlauf der Proteine abzubilden und mit einem Skalpel entlang der eingezeichneten vertikalen Linien gedreiteilt. Das erste Drittel des Blots wurde auf seine IB₄-Reaktivität analysiert, das zweite Drittel auf seine anti-Laminin und das dritte Drittel auf seine anti-NF-M Immunreaktivität untersucht.

Weder die beiden - bekanntermaßen IB₄-bindenden - β - Ketten des Laminins noch die drei Proteine der Neurofilament-Triade lassen sich in dem Hyaluronidase-Extrakt nachweisen. Sie können deshalb auch nicht für die von uns nachgewiesene IB₄-Reaktivität im Hyaluronidase-Extrakt verantwortlich sein.

2.3.3. Immunpräzipitation mit dem anti-GHAP Antikörper

Es bestand natürlich immer noch die Möglichkeit, dass die von uns detektierte IB₄-Reaktivität auf ein uns noch unbekanntes Glykoprotein zurückzuführen ist, welches dasselbe apparente Molekulargewicht wie Versican besitzt. Um dies zu untersuchen, haben wir die Proteine aus dem Hyaluronidase-Extrakt mit dem monoklonalen anti-GHAP Antikörper immunpräzipitiert und das Präzipitat im Westernblot auf seine IB₄-Reaktivität untersucht. Das Ergebnis des Experiments ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

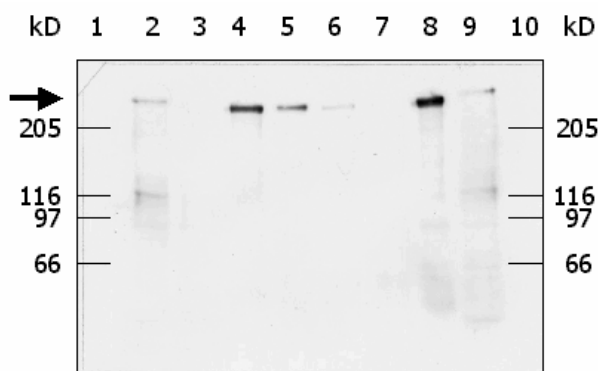


Abb. 2.13: Immunpräzipitation (IP) mit dem anti-GHAP Antikörper. 500 μ g Protein aus den leichten Membranen wurden mit Hyaluronidase extrahiert. Das Extrakt wurde mit einem gleichen Volumen von 0.15 M NaCl und Protease Inhibitor haltigem 0.2 M Tris-HCl-Puffer, pH 7.4 auf IP-Bedingungen eingestellt. Nach der Zugabe von 5 μ g des anti-GHAP Antikörpers wurde die Lösung zunächst für 30 min. unter Schütteln inkubiert. In der Zwischenzeit wurden etwa 50 μ g Protein G Sepharose auf die IP-Bedingungen äquilibriert und anschließend zur Lösung hinzugefügt. Die Suspension wurde unter ständiger Rotation über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Protein G Sepharose wurde zunächst zweimal für je 15 min. unter heftiger Vibration mit 0.15 M NaCl, 0.2% (w/v) Dodecylmaltosid und Protease Inhibitor haltigem 0.1 M Tris-HCl, pH 7.4 gewaschen und gebundene Proteine anschließend durch eine 30 minütige Inkubation bei RT in Probenpuffer eluiert. Alle gesammelten Fraktionen wurden konzentriert und in der SDS-PAGE (7.5 % iges Trenngel) aufgetrennt. Nach dem Blotten auf eine NC-Membran wurde die IB₄-Reaktivität unter Verwendung von IB₄-PO analysiert. Spuren 1 und 10: Marker, Spuren 2 und 9: 30 μ g Protein aus den leichten Membranen, Spur 3: 10 μ g Protein aus den extrahierten Membranen, Spur 4: 10 μ g Protein aus dem Hyaluronidase-Extrakt, Spur 5: 5 μ g nicht-präzipitierter Proteine, Spur 6: 5 μ g Protein aus dem ersten Waschschrift, Spur 7: 5 μ g Protein aus dem zweiten Waschschrift, Spur 8: die Hälfte des Volumens des Eluats. Der Pfeil zeigt die Lage der IB₄-Reaktivität im Westernblot.

Im Präzipitat (Spur 8) lässt sich nur ein einzelnes, IB₄-bindendes Glykoprotein detektieren. Das Molekulargewicht des Glykoproteins liegt bei >250 kDa. Da wir die Immunpräzipitation mit dem monoklonalen anti-GHAP Antikörper durchgeführt haben, können wir davon ausgehen, dass Versican das IB₄-bindende Glykoprotein ist.

2.4. Untersuchungen zur neuronalen Expression des Versicans

Wir haben porcines Rückenmark über eine Synaptosomen-Präparation subzellulär fraktioniert und dabei ein einzelnes IB₄-bindendes Glykoprotein angereichert. Wir konnten dieses Glykoprotein durch eine Affinitätschromatographie isolieren und über eine massenspektrometrische Analyse seiner tryptischen Peptide - eindeutig - als Versican identifizieren. Wir haben außerdem gezeigt, dass Versican - analog zum IB₄-bindenden Glykoprotein - im Verlauf einer Synaptosomen-Präparation angereichert wird und zusammen mit dem IB₄-bindenden Glykoprotein über einen spezifischen Abbau des Hyaluronans von Membranen freigesetzt werden kann. Durch die Immunpräzipitation mit einem monoklonalen Antikörper gegen die hoch konservierte, N-terminale GHAP-Domäne konnten wir sowohl Versican als auch die IB₄-Reaktivität isolieren. Wir hatten deshalb keinen Zweifel, dass Versican für die von uns detektierte IB₄-Reaktivität im Rückenmark verantwortlich ist.

Da wir mit unseren Westernblots nur einen Größenbereich von etwa 50 bis 400 kDa abdecken, besteht natürlich die Möglichkeit, dass wir weitere, potentiell existierende IB₄-bindende Glykoproteine nicht detektieren. Und natürlich besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass sich weitere IB₄-bindende Glykoproteine aufgrund ihres zu niedrigen Expressionslevels einem Nachweis im Westernblot entziehen. All diese Konjunktive ändern aber nichts daran, dass Versican das bisher erste eindeutig identifizierte IB₄-bindende Glykoprotein im Säugetier-Rückenmark ist (Bogen et al., 2005). Unter der Voraussetzung, dass Versican auch das einzige existierende IB₄-bindende Glykoprotein im Rückenmark ist, muss es neuronalen Ursprungs sein. Wir wollten uns deshalb im Folgenden auf die Analyse der neuronalen Expression von Versican konzentrieren.

Sollte sich herausstellen, dass Versican tatsächlich durch die nozizeptiven, nicht-peptidergen C-Fasern exprimiert wird, wäre es natürlich nur allzu naheliegend als Nächstes seine Funktion in verschiedenen experimentellen Schmerzmodellen zu untersuchen. Dazu benötigt man allerdings auch Tiere, mit denen man diese Versuche durchführen kann. Die Tiere müssen sich ohne allzu großen Aufwand operieren und über mehrere Wochen in einem Labor halten lassen, um sie verschiedenen etablierten Verhaltenstests zu unterziehen. Schweine sind dazu aus nahe liegenden Gründen natürlich ungeeignet. Wir waren deshalb dazu gezwungen, das Tiermodell zu wechseln. Da unsere Kooperationspartner von der Grünthal GmbH für ihre Verhaltensexperimente routinemäßig Ratten verwenden, und damit neben dem erforderlichen Know how auch die Möglichkeit besaßen, uns mit ausreichenden Mengen an Ratten-

Rückenmark und Hinterwurzelganglien zu versorgen, hatten wir uns dazu entschieden, unsere Versuche zur neuronalen Expression an Ratten durchzuführen.

2.4.1. IB₄-Reaktivität im Ratten-Rückenmark

Da wir das Tiermodell wechselten, mussten wir natürlich zunächst einmal zeigen, dass auch die IB₄-Reaktivität im Ratten-Rückenmark auf Versican zurückzuführen ist. Dazu haben wir über eine Synaptosomen-Präparation leichte Membranen und Synaptosomen isoliert, diese mittels Hyaluronidase extrahiert und das dabei von den Membranen freigesetzte Versican mit dem anti-GHAP Antikörper immunpräzipitiert. Das Präzipitat wurde von uns im Westernblot auf seine IB₄-Reaktivität analysiert. Das Ergebnis des Experiments ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

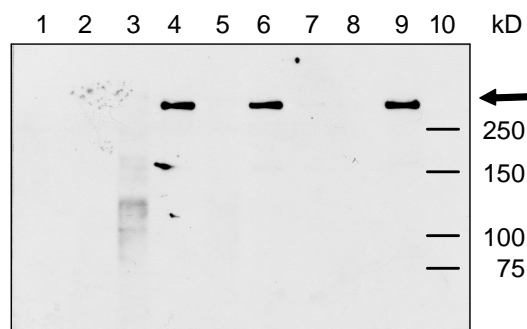


Abb. 2.14: IB₄-Reaktivität im Ratten-Rückenmark. Ratten-Rückenmark wurde über eine Synaptosomen-Präparation subzellulär fraktioniert. Die leichten Membranen und Synaptosomen wurden vereinigt, pelletiert und mit Hyaluronidase extrahiert, um Hyaluronan gebundene Proteine wie Versican freizusetzen. Das Extrakt wurde mit dem anti-GHAP Antikörper immunpräzipitiert, das Präzipitat anschließend in der SDS-PAGE (5 - 7.5 % Trenngel) aufgetrennt, geblottet und mit Hilfe von IB₄-PO auf seine IB₄-Reaktivität analysiert. Spur 1: 30 µg Protein aus den kombinierten leichten Membranen und Synaptosomen, Spur 2: 30 µg Protein aus dem Überstand der Ultrazentrifugation (UZ), Spur 3: 30 µg Protein aus den während der UZ pelletierten leichten Membranen und Synaptosomen, Spur 4: 30 µg Protein aus dem Hyaluronidase-Extrakt, Spur 5: 30 µg Protein der extrahierten leichten Membranen und Synaptosomen, Spur 6: 30 µg nicht-präzipitiertes Protein, Spur 7: 10 µg Protein, erster Waschschrift, Spur 8: 10 µg Protein, zweiter Waschschrift, Spur 9: 2.5 µg eluiertes Protein, Spur 10 : Marker. Der Pfeil zeigt die Lage der IB₄-Reaktivität.

Das Ergebnis ist dasselbe wie beim Schwein. Wieder lässt sich nur ein einzelnes IB₄-bindendes Glykoprotein im Westernblot detektieren und wieder beträgt das apparente Molekulargewicht > 250 kDa. Da wir für die Immunpräzipitation den monoklonalen anti-GHAP Antikörper verwendet haben, kann man davon ausgehen, dass Versican das IB₄-bindende Glykoprotein ist.

Wenn sich die IB₄-Reaktivität nicht-peptiderger C-Fasern auf Versican zurückführen lässt, müssen sich auch Transkripte des Versicans in RNA-Extrakten aus dem DRG nachweisen lassen. Wir haben deshalb RNA aus Ratten-DRG isoliert, revers transkribiert und die resultierende cDNA unter Verwendung Splicevarianten-spezifischer Primer in verschiedenen PCRs analysiert.

2.4.2. Lassen sich Versican-Transkripte im DRG nachweisen?

Das Versicanogen der Ratte liegt auf Chromosom 2 (Ratten Genom Datenbank-Eintrag 619940, Gen-Name: CSPG2, Gen-Identität: 114122). Es umfasst insgesamt 15 Exons, die sich über einen Bereich von annähernd 100 kb erstrecken. Durch alternatives Spleißen werden 4 verschiedene mRNA-Varianten aus dem Primärtranskript erzeugt (Wight, 2002). Alle vier Varianten enthalten die Exons 2 bis 6 (N-Terminus) und 9 bis 15 (C-Terminus). Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Varianten betreffen ausschließlich die An- bzw. Abwesenheit der beiden GAG-Domänen codierenden Exons 7 (GAG α) und 8 (GAG β). Während V₀ Exon 7 und 8 enthält, besitzt V₁ nur Exon 8, V₂ nur Exon 7 und V₃ keines der beiden.

Um herauszufinden, ob das Versicanogen im DRG transkribiert wird und welche Variante/n aus dem Primärtranskript gespleißt werden, haben wir verschiedene Primerpaare zur Amplifizierung Splicevarianten-spezifischer DNA-Fragmente ausgewählt, eine PCR durchgeführt und die daraus resultierenden Amplifikate im Agarosegel analysiert. Das Ergebnis ist in den folgenden Abbildungen dargestellt.

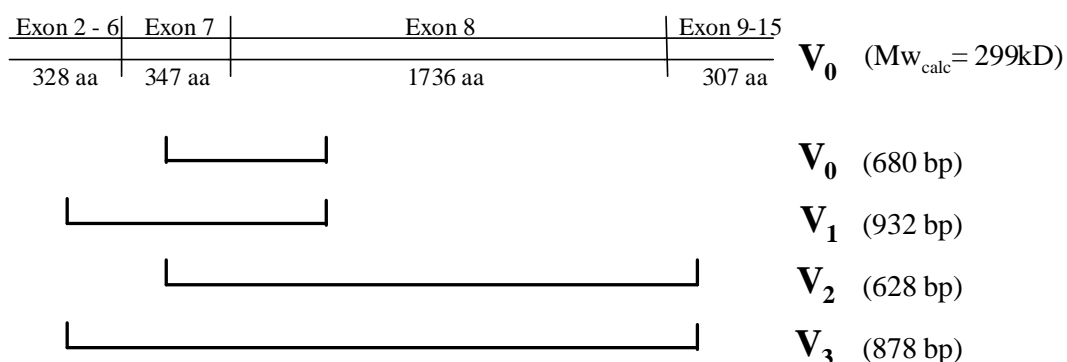


Abb. 2.15: Lage der ausgewählten Primerpaare und Größe der zu erwartenden, amplifizierten Sequenzen basierend auf der mRNA-Sequenz von V₀, der größten Versican-Splicevariante.

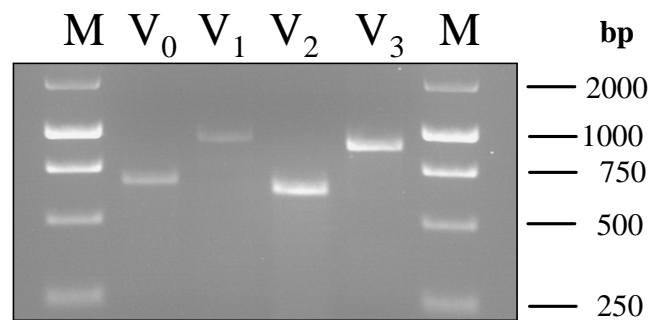


Abb. 2.16: Auftrennung der mittels PCR amplifizierten Splicevarianten-spezifischen DNA-Fragmente im Agarosegel. Aus DRGs isolierte RNA wurde zunächst in cDNA transkribiert. Aus der cDNA wurden anschließend mit Hilfe geeigneter Primerpaare die Splicevarianten-spezifischen Transkripte amplifiziert.

Mit jedem der verwendeten Primerpaare lässt sich ein Fragment erwarteter Größe amplifizieren. Aufgrund der Spezifität der verwendeten Primer kann man davon ausgehen, dass es sich bei den amplifizierten Fragmenten um Sequenzen von Versican-Transkripten handelt.

Dass sich Transkripte aller vier Splicevarianten in den RNA-Extrakten nachweisen lassen, sagt aber noch nichts über ihren zellulären Ursprung aus. Da ein DRG neben Neuronen auch Fibroblasten und Gliazellen enthält, müssen die Versican-Transkripte nicht zwingend neuronalen Ursprunges sein. Wir wollten deshalb als Nächstes untersuchen, ob sich Versican-Transkripte auch tatsächlich in Neuronen detektieren lassen.

2.4.3. *In situ*-Hybridisierung an DRG-Neuronen

Wenn Versican neuronal exprimiert wird, müssen sich natürlich auch RNA-Transkripte in den Somata von DRG-Neuronen nachweisen lassen. Wir haben deshalb unter Verwendung von Digoxigenin (DIG)-markierten Ribonucleotiden sense und antisense RNA-Sonden gegen die, in allen Splicevarianten präsenten, Exons 4 bis 6 transkribiert und zur Hybridisierung mit den entsprechenden mRNA Molekülen auf DRG-Schnitten eingesetzt. Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

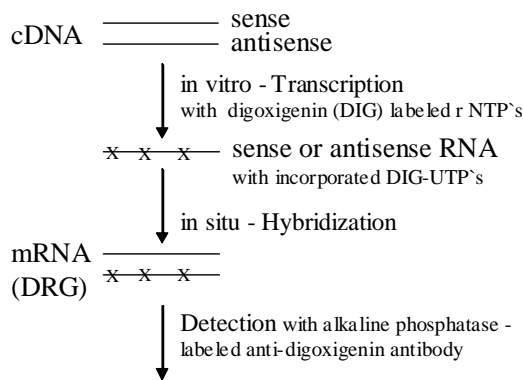


Abb. 2.17: Prinzip der Herstellung von sense und antisense RNA-Sonden gegen mRNA-Transkripte des Versicans. Aus der klonierten cDNA des Versicans werden über eine *in vitro* Transkription sense und antisense Sonden generiert und für die *in situ*-Hybridisierung an Gewebeschnitten verwendet. Da die Sonden mit Digoxigenin markiert sind, können miteinander hybridisierte Stränge mit alkalischer Phosphatase (AP)-konjugierten anti-DIG Antikörpern markiert und unter Katalyse einer Farbreaktion lokalisiert werden.

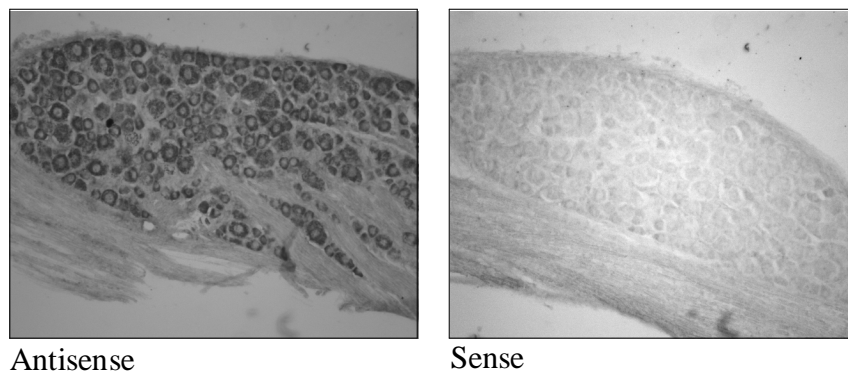


Abb. 2.18: *In situ*-Hybridisierung an Ratten-DRG's. Die Ratten wurden anästhesiert und transkardial mit PBS und 4 % Paraformaldehyd perfundiert. Nach der Perfusion wurden die DRG's der lumbalen Segmente L4 bis L6 herauspräpariert, zunächst für 2 h in 4 % PFA nachfixiert und anschließend - zur Kryoprotektion - für jeweils 2 h in einer 10 %, 20 % und 30 % igen Sucrose-Lösung gelagert.

Die *in situ*-Hybridisierung wurde an 20 µm dicken Gewebeschnitten mit DIG-markierten Sonden gegen den - allen Splicevarianten gemeinsamen - hoch konservierten N-Terminus durchgeführt. Um die freie Zugänglichkeit der mRNA-Transkripte zu gewährleisten, wurden die Schnitte vorher noch mit Proteinase K behandelt. Die Hybridisierung verlief über 12 h bei 42°C mit 0.5 µg/ml Dig-markierter Sonden in 50 % Formamid, 5 x SSC, 100 µg/ml Heringssperma-DNA und 0.1 % Tween 20. Zur Detektion der Hybride wurden die Gewebeschnitte zunächst mit einem mit AP-konjugierten anti-DIG Antikörper markiert und anschließend unter Verwendung von NBT/BCIP entwickelt.

In den Somata sämtlicher Neurone lassen sich Versican-Transkripte detektieren. Weil die eingesetzte antisense Sonde allerdings gegen Sequenzen aus den Exons 4-6 gerichtet ist und diese Sequenzen in allen vier Varianten präsent sind, lässt sich damit natürlich nicht ermitteln, welche Splicevariante/n von welchen Neuronen transkribiert werden. Darüber hinaus ist damit auch noch nicht gezeigt, dass die mRNA-Sequenzen in eine Proteinsequenz translatiert werden. Wir hatten uns deshalb entschieden, als Nächstes die Versican-Expression in der Immunfluoreszenz zu untersuchen.

2.4.4 Kolokalisation in der Immunfluoreszenz

Wenn Versican für die IB₄-Reaktivität der nicht-peptidergen C-Fasern verantwortlich ist, sollte seine Immunreaktivität mit der subzellulären Lokalisation der IB₄-Reaktivität korrelieren. Wir haben deshalb die beiden Reaktivitäten in der Immunfluoreszenz an DRG-Neuronen untersucht. Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

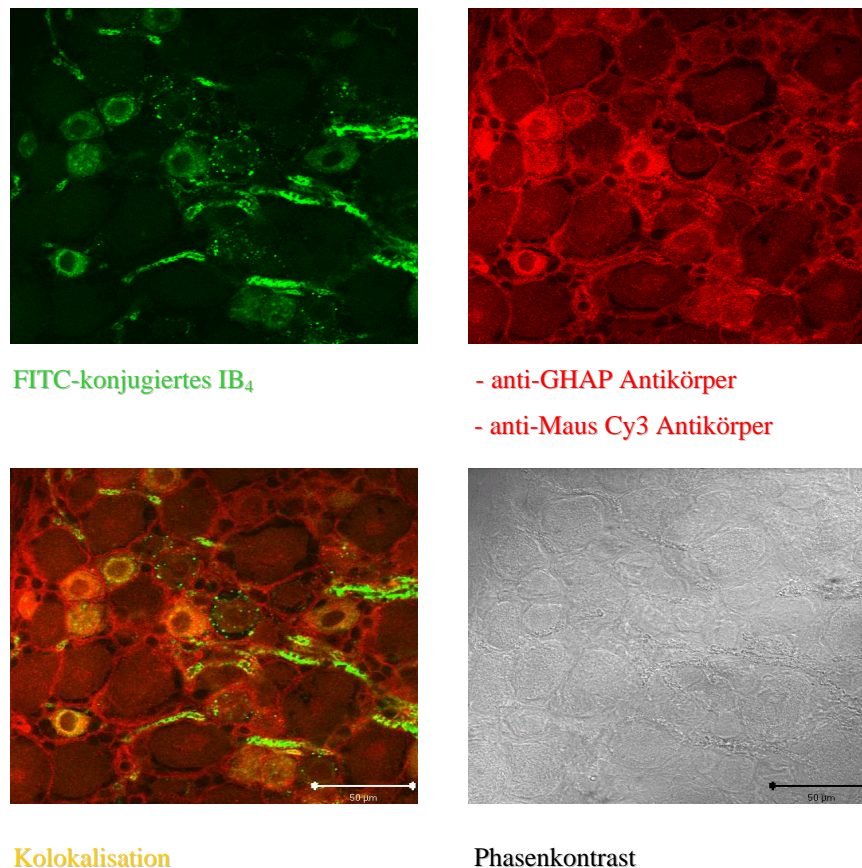


Abb. 2.19: Kolokalisation von IB₄- und anti-Versican Immunreaktivität in der Immunfluoreszenz an Ratten- DRGs (L4). Die Ratten wurden anästhesiert und transkardial mit PBS perfundiert. Die DRGs der lumbalen Segmente L4 bis L6 wurden herauspräpariert und über eine 10 minütige Inkubation in absolutem Aceton bei -20 °C fixiert. Die Immunfluoreszenzen wurden an 20 μm dünnen Gewebeschnitten durchgeführt. Alle Schnitte wurden zunächst für 3 Minuten mit 1 % iger Periodsäure behandelt und anschließend für 30 min. bei RT mit 0.3 % (w/v) Triton X-100 und 5 % NGS in 0.1 mM CaCl₂, 0.1 mM MnCl₂, 0.1 mM MgCl₂ haltigem PBS (Antikörper-Verdünnungspuffer) inkubiert. Die DRGs wurden über Nacht bei 4°C mit dem anti-GHAP Antikörper (1:100) und dem FITC-konjugierten IB₄ (1:250) in Antikörper-Verdünnungspuffer inkubiert, dreimal mit - durch bivalente Kationen ergänztem - PBS gewaschen und über 2 h bei RT mit einem Kaninchen anti-Maus-Cy 3-konjugierten Antikörper (1:100) in Antikörper-Verdünnungspuffer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit durch bivalente Kationen supplementiertem PBS wurden die Schnitte unter Verwendung von Fluoromount-Medium eingedeckelt und konfokal mikroskopiert.

Die IB₄-Reaktivität ist primär auf das Cytoplasma der nicht-peptidergen C-Fasern konzentriert. Auch ein Teil der anti-Versican Immunreaktivität lässt sich eindeutig im Cytoplasma der nicht-peptidergen C-Fasern, und zwar kolokalisiert mit der IB₄-Reaktivität, detektieren. Damit dürfte gezeigt sein, dass Versican neuronal exprimiert wird und eine, noch zu definierende, Splicevariante das Molekül ist, welches für die IB₄-Reaktivität der nicht-peptidergen C-Fasern verantwortlich ist.

Es gibt allerdings auch anatomische Strukturen im DRG, in denen keine Kolokalisation feststellbar ist, wie die extrazelluläre Matrix oder die myelinhaltigen Markscheiden. In der extrazellulären Matrix ist ausschließlich Versican zu detektieren. Da unsere Ergebnisse aus der RT-PCR allerdings vermuten lassen, dass mehrere Versican-Splicevarianten im DRG existieren und offensichtlich nicht alle durch die IB₄-bindenden Epitope modifiziert sind, ist dieses Ergebnis alles andere als überraschend.

Im Gegensatz dazu sind die myelinhaltigen Markscheiden ausschließlich IB₄-reaktiv. Vermutlich ist die IB₄-Reaktivität der Markscheiden allerdings nicht proteinerger sondern lipiderger Ursprunges (Fullmer et al., 2004).

2.5. Versuche zur Identifizierung der IB₄-bindenden Versican-Splicevariante

Wir haben gezeigt, dass alle Neurone im DRG das Versican transkribieren. Wir haben außerdem gezeigt, dass zumindest auch die nicht-peptidergen C-Fasern die Versican Transkripte translatieren. Offen bleibt allerdings, welche Neurone welche Splicevariante/n transkribieren und warum sich Versican nur in den nicht-peptidergen C-Fasern nachweisen lässt, obwohl offensichtlich alle Neurone mRNA-Transkripte vom Versican enthalten.

Offen ist außerdem, welche Splicevariante die IB₄-bindenden Epitope trägt. Wie bereits erwähnt, sind bisher vier verschiedene Versican-Varianten bekannt. Alle vier Splicevarianten besitzen zwar die selben N- und C-Termini, sie unterscheiden sich aber hinsichtlich der Art und Anzahl der GAG-Domänen, die sie enthalten (s.Abb. 2.21). Während V₀ zwei GAG-Domänen enthält, besitzen V₁ und V₂ jeweils nur eine und V₃ sogar gar keine GAG-Domäne. Es sollte deshalb möglich sein, die IB₄-bindende Variante über eine Analyse der GAG-Domänenstruktur zu identifizieren.

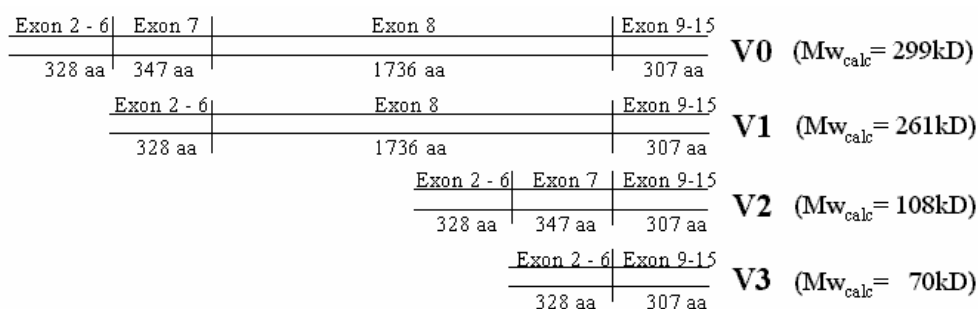


Abb. 2.20: Schematische Darstellung der vier verschiedenen Splicevarianten des Versicans (Swiss-Prot Datenbank-Eintrag Q9ERB4). Alle vier Varianten besitzen die durch Exon 2-6 und 9-15 codierten N- und C-Termini, unterscheiden sich aber in ihrer GAG-Domänenstruktur. Während V₀ Exon 7 (GAG α) und 8 (GAG β) enthält, besitzt V₁ nur Exon 8 (GAG β), V₂ nur Exon 7 (GAG α) und V₃ keines der beiden GAG-Domänen codierenden Exons. Es sollte daher möglich sein, die IB₄-bindende Variante über eine Analyse der GAG-Domänenstruktur zu identifizieren.

2.5.1. Analyse der GAG-Domänenstruktur des IB₄-bindenden Versicans

Um herauszufinden, welche GAG-Domäne/n das IB₄-bindende Versican enthält, haben wir Proteine aus dem Hyaluronidase-Extrakt im Westernblot mit anti-Ratten GAG α - und β -spezifischen Antikörpern (freundliche Gabe von Prof. R.U. Margolis, New York) auf ihre Immunreaktivität analysiert. Um zu testen, ob sich die Ratten-spezifischen Antikörper vielleicht auch für eine Analyse der GAG-Domänen des porcinen Versicans eignen, haben wir, parallel dazu, auch die Hyaluronidase-Extrakte aus den subzellulären Fraktionen des porcinen Rückenmarks analysiert. Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

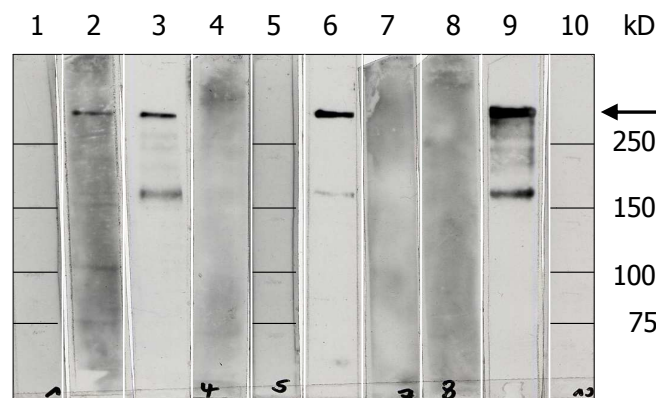


Abb. 2.21: Analyse der GAG-Domänenstruktur des IB₄-bindenden Versicans. Proteine aus den mit Hyaluronidase extrahierten leichten Membranen und Synaptosomen wurden in einer SDS-PAGE (5 – 7.5 % iges Trenngel) aufgetrennt und anschließend auf eine NC-Membran geblottet. Um die Proteinauftrennung abzubilden wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt und entsprechend dem Verlauf der einzelnen Spuren mit einem Skalpel durchtrennt. Die daraus resultierenden NC-Streifen wurden in eine Streifenbox transferiert und mit verschiedenen Antikörpern auf ihre Immunreaktivität untersucht. Spuren 1, 5 und 10: Marker, Spur 2: 30 μ g Protein, Ratte mit anti-Ratte GAG α AK, Spur 3: 30 μ g Protein, Ratte mit IB₄-PO, Spur 4: 30 μ g Protein, Ratte mit anti-Ratte GAG β AK, Spur 6: 10 μ g Protein, Schwein mit dem anti-GHAP AK, Spur 7: 10 μ g Protein, Schwein mit dem anti-Ratte GAG α AK, Spur 8: 10 μ g Protein, Schwein mit dem anti-Ratte GAG β AK, Spur 9: 10 μ g Protein, Schwein mit IB₄-PO. Der Pfeil zeigt die Lage des IB₄-bindenden Versicans.

Das IB₄-bindende Versican scheint nur die GAG α -Domäne zu besitzen; mit dem anti-GAG β -spezifischen Antikörper lässt sich Versican jedenfalls nicht detektieren (Spur 2 versus 4). Das porcine Versican lässt sich mit den anti-Ratten spezifischen Antikörpern ebenfalls nicht nachweisen. Vermutlich sind die Unterschiede in den Sequenzen der GAG-Domänen beider Spezies einfach zu signifikant.

Wenn das IB₄-bindende Versican ausschließlich die GAG α -Domäne enthält, kommt eigentlich nur V₂ als Zielmolekül in Frage. Allerdings besitzt das V₂ der Ratte ein kalkuliertes

Molekulargewicht von 110 kDa (s. Abb. 2.20; Q9ERB4). Das apparente Molekulargewicht des IB₄-bindenden Versicans liegt jedoch bei > 250 kDa. Wodurch erklärt sich diese offensichtliche Diskrepanz? Da die für die Extraktion eingesetzte Hyaluronidase (H3506, Sigma) neben Hyaluronan auch Chondroitinsulfate verdaut, können Chondroitinsulfat-Seitenketten nicht für diese drastischen Unterschiede im Molekulargewicht verantwortlich sein. Selbst die Tatsache, dass es sich beim Versican um ein acides Protein (pI~4) handelt, welches noch einige Glykosylierungen, wie z. B. die IB₄-bindenden Epitope, trägt, liefert keine ausreichende Erklärung für die auftretende Diskrepanz von >150 kDa.

Auffällig ist, dass das die GAG α - Domäne codierende Exon 7 der Ratte unverhältnismäßig kurz ist. Es codiert nur für 347 Aminosäuren, während die entsprechenden murinen oder humanen Exons für 961 (Maus, Q62059) bzw. 988 (Mensch, P13611) Aminosäuren codieren. Gibt es dafür eine Erklärung? Wenn man den Swiss-Prot. Datenbank-Eintrag für das Ratten-Versican mit dem entsprechenden Eintrag in der NCBI-Datenbank vergleicht, stößt man auf einige interessante Unterschiede bezüglich der Größe der verschiedenen Varianten und ihrer Exonstruktur. Während das Ratten-Versican V₀ laut Swiss-Prot 2718 Aminosäuren umfasst, besitzt das in der NCBI Datenbank 3304 Aminosäuren. Laut Swiss Prot startet die Translation in Exon 2, laut NCBI in Exon 3. Dadurch besitzt die Swiss-Prot-Sequenz einen um 110 Aminosäuren gegenüber der NCBI Variante verlängerten N-Terminus. Andererseits enthält die NCBI-Sequenz eine 696 Aminosäuren umfassende Insertion zwischen Exon 6 und 7. Davon entfallen 56 Aminosäuren auf ein verlängertes Exon 6, 21 Aminosäuren auf ein sich daran anschließendes Miniexon sowie 619 Aminosäuren auf einen sich direkt am 5`Ende von Exon 7 anschließenden, offenen Leserahmen (ORF). Um herauszufinden, ob es sich bei diesem ORF möglicherweise um einen Teil des unverhältnismäßig kurzen Exon 7 handelt, haben wir die durch den ORF und Exon 7 codierte Aminosäuresequenz in einem Alignment mit den entsprechenden Aminosäuresequenzen der GAG α -Domänen von Mensch und Maus verglichen. Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

Mensch	348	...PKEATT	IDLSILAETA	SPSLSKEPQM	VSDRTTPIIP	LVDELPIIPT
Maus	348	PKQNISEATT	IEMNILAETS	SPSLSKEPHM	VPDRATPVIP	LATELPIFTT
Ratte	296	.KQNISEATT	IETNTLAETA	SPSLSKEPHM	VPERATPVIP	LVTELPIFTT
Mensch		EFPPVGNIVS	FEQKATVQPQ	AITDSLATKL	PTPTGSTKKP	WMDDYSPSA
Maus		HFPPAGNIVN	SEQKSVVYSQ	AITGRLATES	PTTTRNTINS	WDLNDSLASG
Ratte		HFPPAGNIVN	SEQKSVIYSQ	AITDRVATES	PTAAGSPINS	WDADDYLPSSG
Mensch		SGPLGKLDIS	EIKEEVLQST	TGVSHYATDS	WDGVVEDKQT	QESVTQIEQI
Maus		SGPLGMPDIS	EIKEEELRST	TVISQHATGS	QAVITEDTQT	HESVSQIEQI
Ratte		SGPLGKPDIS	EIKEEGLQST	TVTSQHATAS	HHGITEDTQT	HESVTQIEQI
Mensch		EVGPLVTSME	ILKHIPSKEF	PV.TETPLVT	ARMILE.SKT	EKKMVSTVSE
Maus		EVGPLVTSME	ITNHISLKEF	PEKNKTPYES	TEVTLE.HTT	EMPTVSASPE
Ratte		EVGPLVTSME	ITNHISFKEF	LE.TKTPLES	TEVTLEQHQT	DMPTVITSPE
Mensch		LVTTHYGFY	LGEEDDEDRT	LTVGSDESTL	IFDQIPEVIT	VSKTSEDTHI
Maus		LATTSHYGFY	LREDDREDRT	LTVRSQSTR	VFSQIPEVIT	VSKTSEDTHY
Ratte		LATTSHYGVY	LREDDREDIA	LTVRSQSTR	VFSQIPEVIT	VSKTSEDTHY
Mensch		THLEDLESVS	ASTTVSPLIM	PDNNGSSMDD	WEERQTSGRI	TEEFLGKYLS
Maus		SQLGDLESIS	TST....ITM	LGTDRSLIDK	EKEPKTNGKV	TEDEFGQSQP
Ratte		SQLGDLEFVS	TAT....ITM	LGTDGLTDE	GKEPQTDDKT	AEDFEGQSQP
Mensch		TTPFPSQHRT	EIELFPYSGD	KILVEGISTV	IYPSLQTEM	HRRERETLI
Maus		TTTFPSQHRT	EVELLPYSGD	TTSVEGISTV	IYPSLQDVT	QGRERETPR
Ratte		TIPFPSQHRT	EVELLPYSGD	TISVERISTV	SYPSLQDVT	QGRERETVPR
Mensch		PEMRTDTYT.	DEIQEEITKS	PFMGKTEEEV	FSGMKLSTSL	SEPIHVTESS
Maus		PELKKDPYTV	DEIPEKVTKD	PFIGKT.EEV	FSGMPLSTSS	S.....ESS
Ratte		PGLKKDPYAV	DEIQEKITKD	PFIGTI.EEG	FSGMSLSTSS	S.....ETS
Mensch		VEMTKSDFDP	TLITKLSAEP	TEVRDMEEEDF	TAT...PGTT	KYDENITTVL
Maus		VERTESVSPA	LTIEKLTGKP	TEARDVEEMT	TLTRLETDTV	KSDKDVTRVH
Ratte		AERTESVSPA	LTIEKLTGKP	AVASDVDEMT	ILTRLETDPV	TSEDEVTSAH
Mensch		LAHGTLVSEA	ATVSKWSWDE	DNITSKPLES	TEPSASSKLP	PALLTTVGMN
Maus		LTHSTLNVEV	VTVSKWPGDE	DNSTSKPLPS	TEHAGFTKLP	PVPLSTIGIN
Ratte		LTHSTLNVEV	VTVLKWPGNE	DNSTSKPLPP	TERAGFTKSP	PVSLSTVIV

Mensch	GKDKDIPSFT	EDGADEFTLI	PDSTQKQLEE	VTDEDIAAHG	KFTIRFQPTT
Maus	GKDKEIPSFT	.DGGGEYTLF	PDGTPKPLEK	VSEEDLAS.G	ELTVTFHTST
Ratte	GKDKETPSFT	.DGGDEYTLS	LDGTPKPLEK	FSEEDLTS.G	EFAVTIPTSI
Mensch	STGIAEKSTL	RDSSTTEEKVP	PISTSTEGQVY	.ATMEGSALG	EVEDVDLSKP
Maus	SIGSAEKSAS	GEPTTGDRFL	PTTSTEDQVI	NATAEGSALG	..EDTEASKP
Ratte	SIDSAEKSTL	GEPTTGDRVL	STTSTKDLVI	NATVEGSALD	..EDMDASKP
Mensch	VSTVPQFAHT	SEVEGLAFVS	YSSTQEPTTY	VDSHTIPLS	VIPKTDWGL
Maus	LFTGPPFVHT	SDVEELAFVN	YSSTQEPTTY	VDISHTSPLS	IIPKTEWSVL
Ratte	LFTATPFVHT	SDVEESAFVN	YSSTQOPTTY	VDISHTSPLS	IIPKTEWSVS
Mensch	VPSVPSSEDEV	LGEP SQDILV	IDQTRLEATI	SPETMRITKI	TEGTTQEEFP
Maus	ETSVPLEDEI	LGKSDQDIL.	.EQTHLEATM	SPGALRTGV	SQGETQEE..
Ratte	ETSVPLEDEV	LGKSDQDTL.	.EQTHLEATM	SPEALSTIEV	TQGETQEE..
Mensch	WKEQTAEKPV	PALSSTAWTP	KEAVTPLDEQ	EGDGSAYTVS	EDELLTGSER
Maus	..PQTPGSPF	PTFSSTAVMA	KETTA..FEE	.GEGSTYTPS	EGRLMTGSER
Ratte	..PQTPGIPF	PALSSTAVMT	KETTA..FEE	E GEGSTYTLS	EDRLMTDSEI
Mensch	VPVLETPVVG	KIDHSVSYP	GAVTEHKVKT	DEVVTLTPRI	GPKVSLSPGP
Maus	VPGLETPVVGTSYP	GAITDQEVEM	DTMVTLMSTI	RPTVVSSTES
Ratte	VPSLETPVVGTSYPG	GAMTQQGVEM	DTMVTQMSSI	RPTVVLSTEP
Mensch	EQKYETEGSS	TTGFTSSLSP	FSTHITQLME	ETTTE..KTS	LEDIDLGSGL
Maus	EVIYEAEGSS	PTEFASTLRP	FQTHVTQLME	ETTTEEGKKAS	LDYTDLGSGL
Ratte	EVSYEAEGSS	PMEFASTLKP	FGTQVTQLVE	ETTTEEGKKTP	LDYTDLGSGL
Mensch	FEKPKATELI	EFSTIKVTVP	SDITTAFFSSV	DRLHRTSAFK	PSSAITKKPP
Maus	FE.PRATELP	KFP....STP	SDI.SVFTAI	DSLHRTPPLS	PSSSFTEEQR
Ratte	FEQPRVTELP	DFS....MTP	SDI.SVFTAI	DSLHRTTPLR	PPSPFTEEPH
Mensch	LIDREPGEET	TSDMVIIGES	TSHVPPTTLE	DIVAKETETD	IDREYFTTSS
Maus	VFEEESSEKT	TGDI.LPGES	VTQHPVTTLI	DIVAMKTESD	IDH...MTSK
Ratte	IFEKEPSEKT	TGDIILPRES	VTQHPLTTLM	DI IAKKTESD	IDHEYHMTSK
Mensch	PPATQPTRPP	TVEDKEAFGP	QALSTPQPPA	STKFHPDINV	YIIEVRENKT
Maus	PPVTQPTRPS	VVERKTTSKT	QELSTSTPAA	GTKFHPDINV	YIIEVRENKT
Ratte	PPVMQPTRPS	VVERKTTSKP	QELSTSSPPA	GTKFHPDINV	YIIEVRENKT

Mensch	G	1335
Maus	G	1308
Ratte	G	1261

Abb. 2.22: Alignment zwischen den GAG α -Domänen von Mensch und Maus mit der durch den ORF und Exon 7 der Ratte codierten Aminosäuresequenz. Identische Aminosäuren sind gelb unterlegt. Konservierte Glykosylierungsmotive sind unterstrichen sowie durch Fettdruck hervorgehoben. Anmerkung: Versican besitzt drei verschiedene Glykosylierungsmotive: a) N,X,T/S-Motive sind potentielle N-Glykosylierungsstellen; b) S/T-Cluster, bestehend aus mindestens drei hintereinanderliegenden Serin- oder Threonin-Resten, sind potentielle O-Glykosylierungsstellen; c) azide G/S-Motive, bestehend aus mindestens zwei aufeinanderfolgenden Aminosäuren, von denen einer ein Serin, der andere ein Glycin ist und in deren unmittelbarer Nachbarschaft sich - zumindest einseitig - mindestens eine saure Aminosäure befindet, fungieren als potentielle Chondroitinsulfat-Anheftungsstellen.

54 % aller in dem Alignment miteinander verglichenen Aminosäuren sind identisch. Darüber hinaus lassen sich auch 14 konservierte Glykosylierungsmotive identifizieren, 2 potentielle N-Glykosylierungsstellen, 6 potentielle O-Glykosylierungsstellen sowie ebenfalls 6 potentielle Chondroitinsulfat-Anheftungsmotive. Es ist deshalb durchaus vorstellbar, dass die durch den ORF codierten Aminosäuren zur GAG α -Domäne der Ratte gehören.

Um herauszufinden, ob der ORF tatsächlich transkribiert wird und welche Exonstruktur die Versican-Transkripte besitzen, hatten wir uns überlegt die cDNA mittels verschiedener PCRs genauer zu charakterisieren.

2.5.2. Analyse der Exonstruktur von Versican-Transkripten aus dem Hinterwurzelganglion

Wie erwähnt unterscheiden sich die Swiss-Prot und NCBI Datenbank-Einträge für das Versican hinsichtlich der postulierten Größe der V_0 Transkripte, des Startpunktes der Translation und der Exonstruktur. Um herauszufinden, welcher Datenbank-Eintrag der Realität entspricht, hatten wir uns überlegt, die RNA-Extrakte bzw. die daraus präparierte cDNA aus den Hinterwurzelganglien mit Hilfe verschiedener PCR`s zu untersuchen. Die dazu ausgewählten Primerpaare, die Größe der erwarteten Amplifikate und das Ergebnis der durchgeführten PCR`s sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

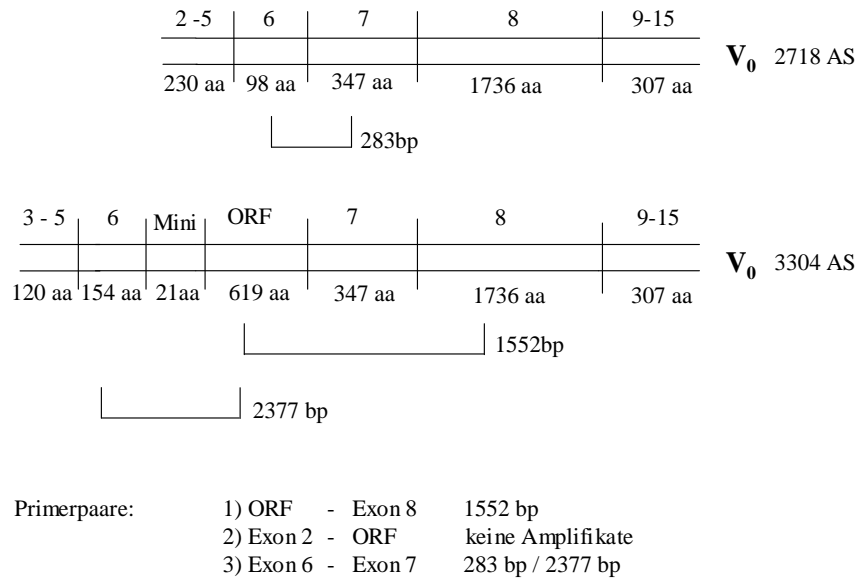


Abb. 2.23: Exonstruktur von V_0 laut Swiss-Prot (Q9ERB4) bzw. NCBI (XM215451) Datenbank-Eintrag, ausgewählte Primerpaare zur Analyse der Exonstruktur und Größe der erwarteten Amplifikate.

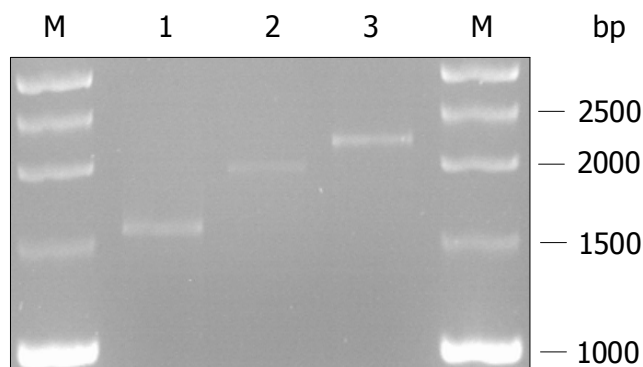


Abb. 2.24: Darstellung der unter Verwendung der in Abb. 2.23 aufgeführten Primerpaare amplifizierten DNA-Fragmente aus der cDNA von RNA-Extrakten aus dem Hinterwurzelganglion.

Durch die Verwendung des Primerpaares ORF - Exon 8 lässt sich ein DNA-Fragment von >1500 bp amplifizieren (Spur 1). Damit wird bestätigt, dass der ORF zusammen mit Exon 7 transkribiert wird. Dazu passt auch, dass sich unter Verwendung des Primerpaares Exon 6 - Exon 7 ein Produkt von 2 bis 2.5 kb amplifizieren lässt (Spur 3).

Überraschenderweise lässt sich aber auch mit dem Primerpaar Exon 2 - ORF ein Produkt amplifizieren (Spur 2). Die Größe des Amplifikates liegt < 2kb. Dies deutet darauf hin, dass eine Variante existiert, die Exon 2 und den ORF enthält und je nachdem, ob der Rest der postulierten Insertion, d. h. die die restlichen 77 Aminosäuren codierenden 231 Nucleotide, enthalten ist oder nicht, 1925 bp oder 2156 bp groß sein dürfte.

Wie passt das zusammen? Wenn man davon ausgeht, dass V_0 mit Exon 2 beginnt und den ORF enthält, bleibt letztlich also nur die Frage nach den restlichen 231 Nucleotiden (bzw. 77 Aminosäuren) der Insertion. Wenn man sich die Ergebnisse der PCR-Analyse aus Abschnitt 2.3.2. vergegenwärtigt (s. dazu Abb. 2.16 und 2.17), müssten – sofern die Insertion vorhanden ist – die unter Verwendung der V_1 und V_3 spezifischen Primer amplifizierten DNA-Fragmente 1163 bp und 1109 bp umfassen. Die Größe der beiden Fragmente liegt aber unter 1000 bp. Deshalb kann man wohl davon ausgehen, dass der Rest der Insertion nicht transkribiert wird.

Damit ergibt sich für die Exonstruktur des V_0' Transkripts (weil die Exonstruktur von der von V_0 abweicht, aber ebenfalls beide GAG-Domänen codierenden Exons 7 und 8 enthält, haben wir das Transkript als V_0' bezeichnet) - im Unterschied zu beiden Datenbank-Einträgen – folgendes, endgültiges Bild:

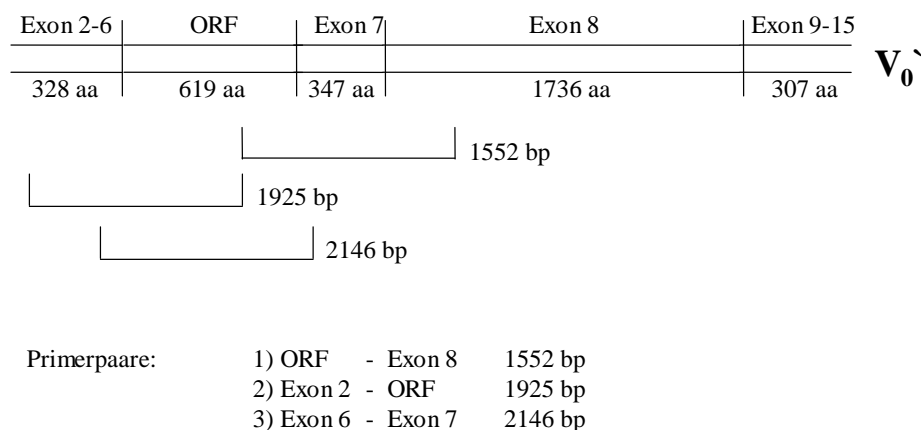


Abb. 2.25: Exonstruktur von V_0' . Aufgrund der Ergebnisse unserer RT-PCR Analysen muss man davon ausgehen, dass die Exonstruktur des V_0 Transkripts – zumindest in Ratten DRGs – weder mit dem Eintrag aus der Swiss Prot Datenbank noch mit dem der NCBI Datenbank übereinstimmt. Da es sich um eine neue Splicevariante handelt, die eine ähnliche Exonstruktur wie V_0 besitzt, haben wir diese Variante als V_0' bezeichnet.

Die Translation von V_0' startet in Exon 2, der ORF wird ausschließlich in Kombination mit Exon 7 transkribiert. Das V_0' Transkript umfasst demnach 10011 Nucleotide, die für 3337 Aminosäuren codieren.