
3. DISKUSSION

3.1. Versican-Splicevarianten: Der offene Leserahmen

Bei dem Versuch das IB₄-bindende Versican zu identifizieren, sind wir auf einen offensichtlich zusätzlich existierenden offenen Leserahmen im Versican der Ratte gestoßen. Der offene Leserahmen codiert für 619 Aminosäuren und liegt unmittelbar vor dem 5' Ende des die GAG α -Domäne codierenden Exons 7. Leider ist es uns im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht gelungen, die funktionelle Relevanz des offenen Leserahmens zu beweisen. Trotzdem gibt es eine Reihe von Indizien, die die Vermutung stützen, dass es sich bei dem offenen Leserahmen um einen Teil von Exon 7 handelt und als solcher auch zusammen mit diesem transkribiert und translatiert wird.

- a) Die ungewöhnliche Größe der durch Exon 7 codierten GAG α -Domäne. Während die murine GAG α -Domäne 961 Aminosäuren besitzt und die bovine oder humane GAG α -Domäne jeweils 988 Aminosäuren, besitzt die GAG α -Domäne der Ratte lediglich 347 Aminosäuren. Wenn man zu diesen 347 Aminosäuren allerdings die 619 Aminosäuren addiert, die der offene Leserahmen codiert, kommt man auch für die GAG α -Domäne der Ratte auf einen, mit den GAG α -Domänen aller anderen Spezies vergleichbaren, Umfang von 966 Aminosäuren.
- b) Die ausgeprägte Homologie zwischen der, durch den offenen Leserahmen und Exon 7 der Ratte codierten, hypothetischen GAG α -Domäne mit den GAG α -Domänen vergleichbarer Spezies. Wie wir über ein Alignment zwischen der humanen und murinen GAG α -Domäne mit der hypothetischen GAG α -Domäne der Ratte zeigen konnten, sind 54 % aller miteinander verglichenen Aminosäuren absolut identisch. Wenn man in dem Alignment die humanen Sequenzen nicht berücksichtigt, kommt man sogar auf eine Übereinstimmung von 84 %. Die ausgeprägte Homologie belegt, dass diese Sequenzen einem starken Selektionsdruck unterliegen und macht biologisch natürlich nur Sinn, wenn diese Sequenzen auch funktionell relevant sind.
- c) Der Nachweis des offenen Leserahmens auf RNA-Ebene. Bei der RT-PCR von Versican-Transkripten aus dem Hinterwurzelganglion mittels drei verschiedener Primerpaare, wovon zwei Primer so ausgewählt wurden, dass sie ausschließlich im Bereich des offenen Leserahmens binden konnten, wurden drei verschiedene DNA-Fragmente amplifiziert, deren Größe sich einzig und allein dadurch erklären lässt, dass

der offene Leserahmen zusammen und ausschließlich in Kombination mit Exon 7 transkribiert wird. Da alle Gene, die transkribiert werden, in irgendeiner Form - früher oder später - auch translatiert werden, kann man davon ausgehen, dass auch die Nucleotidsequenzen des offenen Leserahmens in eine Proteinsequenz translatiert werden.

Aus der Kombination der durch den offenen Leserahmen codierten Sequenz mit den bisher bekannten Sequenzen des Versicans lässt sich - allerdings nur für die Ratte - die Existenz zweier weiterer, bisher noch nicht beschriebener Splicevarianten postulieren. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit den beiden Varianten V_0 und V_2 haben wir diese Varianten als V_0' und V_2' bezeichnet (siehe Abb. 3.1). Die Unterschiede zwischen V_0 und V_0' sowie V_2 und V_2' liegen in der Zusammensetzung ihrer GAG α -Domäne. In den beiden Varianten V_0 und V_2 besteht die GAG α -Domäne offensichtlich nur aus den 347 von Exon 7 codierten Aminosäuren. In den beiden Varianten V_0' und V_2' umfasst die GAG α -Domäne hingegen zusätzlich die 619 Aminosäuren, die der offene Leserahmen codiert.

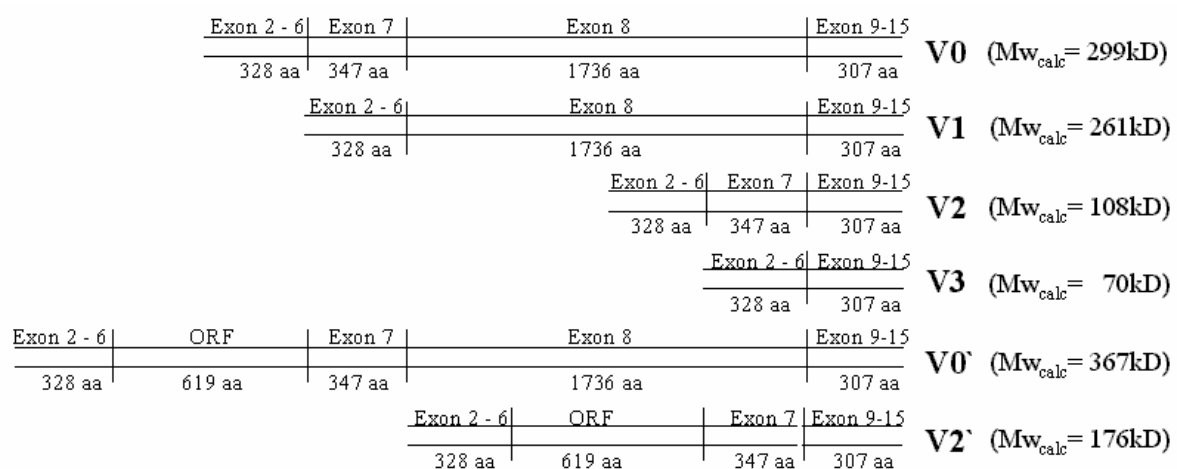


Abb. 3.1: Aufstellung aller Versican-Splicevarianten der Ratte. Bei den Varianten V_0 bis V_3 handelt es sich um die vier klassischen Varianten. Die GAG α -Domäne wird von Nucleotidsequenzen in Exon 7 codiert. Laut Swiss-Prot Datenbank-Eintrag besitzt die GAG α -Domäne lediglich 347 Aminosäuren. Direkt vor dem 5'Ende von Exon 7 im Versicangen liegt jedoch ein offener Leserahmen (ORF) für 619 zusätzliche Aminosäuren. Unter der Voraussetzung, dass die Größe der GAG α -Domäne zwischen 347 und 966 Aminosäuren variiert, je nachdem ob nur Exon 7 oder der offene Leserahmen plus Exon 7 exprimiert wird, können zwei weitere bisher nicht beschriebene Splicevarianten für die Ratte postuliert werden. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit den Varianten V_0 und V_2 haben wir diese Varianten als V_0' und V_2' bezeichnet. Die ausgewiesenen Molekulargewichte errechnen sich als das Produkt der Anzahl der Aminosäuren und einer mittleren Molekularmasse von 110 kDa / Aminosäure.

Einen ersten Hinweis darauf, dass der offene Leserahmen zusammen mit Exon 7 translatiert wird und damit auch funktionell relevant ist, liefern unsere eigenen Untersuchungen zur Identifizierung des IB₄-bindenden Versicans. Wie wir über die Analyse der GAG-Domänenstruktur im Westernblot gezeigt haben, besitzt das IB₄-bindende Versican nur die GAG α -Domäne. Deshalb kommen nur die Versican-Varianten V₂ und V₂' als IB₄-bindendes Molekül in Frage. Bei der von uns durchgeführten RT-PCR konnten allerdings keine V₂ spezifischen DNA-Fragmente amplifiziert werden. Es ist deshalb zumindest fraglich, ob überhaupt V₂ Transkripte im Hinterwurzelganglion existieren. Darüber hinaus beträgt das apparente Molekulargewicht des IB₄-bindenden Versicans - trotz des Abbaus der Chondroitinsulfate - > 250 kDa. Das kalkulierte Molekulargewicht von V₂ beträgt 108 kDa, das von V₂' 176 kDa. Obwohl man natürlich nicht ausschließen kann, dass es sich bei dem IB₄-bindenden Versican nur um ein 108 kDa großes Protein handelt, ist es doch wesentlich nahe liegender, anzunehmen, dass es sich hierbei in Wirklichkeit um ein 176 kDa großes Protein handelt.

3.2. Versican-Splicevarianten: Die Exons 7a und 8a

Während unserer Versuche das IB₄-bindende Versican zu identifizieren, sind wir auf zwei weitere putative Exons im Versicangen gestoßen. Eines der beiden Exons wurde von Dr. Stefan Tomiuk von der Memorec GmbH, im Rahmen einer bioinformatischen Analyse der existierenden Splicevarianten des Versicans, identifiziert, das andere von Dr. Olaf Bender, einem ehemaligen Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe. Beide Exons wurden mit Hilfe eines Computerprogrammes zum Abgleich von Nucleotidsequenzen, dem so genannten BLAST (basic local alignment search tool), identifiziert; und in beiden Fällen wurde das Exon über einen Abgleich des DNA-Abschnittes, auf dem sich das Versicangen befindet, mit Sequenzen aus EST (expressed sequence tag)-Datenbanken gefunden.

3.2.1. Das nicht-codierende Exon 8a

Dieses Exon wurde über eine so genannte BLAST-Suche, also einen Abgleich des chromosomalen Abschnittes, der das humane Versicangen trägt (Gen-Name: CSPG2, Gen-ID: 1462, Chromosom 5, langer Arm, Abschnitt 82.803.339-82.912.737), mit humanen ESTs aus der Unigene-Datenbank identifiziert. Der dabei gefundene humane EST (BI 818462) enthält einen Teil von Exon 8, eine bisher unbekannte Sequenzinsertion von 107 Nucleotiden Länge, Exon 9, Exon 10 sowie einen schlecht sequenzierten Teil von Exon 11:

```

1 ccagctatgg gcttcgagcg catggtggtg atagtcttgg actcaaggtc cacaggatga
61 tctgcacgga ggtcccatgc atttcatctg ctccatcaga taatataacc tgaatcctcc
121 atacgacgag tctatgaatc agaagggcag gattccacga tagcagcatc agaacagcaa
181 gtggcagcga gaattcttga ttccaatgat caggcaacag taaaccctgt ggaatttaat
241 actgagggtt caacaccacc attttccctt ctggagactt ctaatgaaac agatttccctg
301 attggcatta atgaagagtc agtgggaagge acggcaatct atttaccagt ttaaaggagt
361 acatttggaa cgtgtttttg gaaaaagcat gttaatgtac gcagaagaga cttcagtgca
421 cactttcgaa gaaaaacagt ttctgagcat taagtggacc tgatcgctgc aaaatgaacc
481 cgtgccttaa cggaggcacc tgttatccta ctgaaacttc ctacgtatgc acctgtgtgc
541 caggatacag cggagaccag tgtgaacttg attttgatga atgtcactct aatccctgtc
601 gtaatggagc cacttgtggt gatggtttta acacattcag gtgcctctgc cttccaagtt
661 atgttgggtc actttgtgag caagataccg agacatgtga ctattgctgg cacaaaattcc
721 aagggcagtg ctacaaatta ctttgcccat cgacgcacat gggattgccca gtgacaccgg
781 gactgccgtc tggcaggggt gccatctcac aggcacacctg gttcaccaaaa tgcaca

```

Abb. 3.2: Nucleotidsequenz des humanen ESTs BI 818462. Der EST enthält einen Teil von Exon 8, eine bisher unbekannte Sequenzinsertion (gelb unterlegt), Exon 9, Exon 10 sowie einen ungenau sequenzierten Teil von Exon 11. Die unbekannte Insertion umfasst 107 nt und enthält keine proteincodierenden Informationen.

Diese unbekannte Sequenzinsertion ist auch im Versicangen der Ratte vorhanden. Wie das folgende Alignment zeigt, ist die Sequenz stark konserviert.

```

human 5` tttaaaggag tacattttgga acgtgttttt ggaaaaagca tgttaatgta cgcagaag
rat   5` tttaaaggag tacagtttgga acgtgttttt ggaaaaaggca tgttaatgta cgcagaag

human acttcagtg acacttttcga agaaaacag tttctgagca ttaagtg 3`
rat   acgtcagtg acacttttcga ag---acag tttctgagca ttaagtg 3`

```

Abb. 3.3: Alignment zwischen der unbekanntem Insertion aus dem humanen ESTs BI 818462 und der entsprechenden Sequenz aus dem Versicangen der Ratte. Identische Nucleotide sind durch Fettdruck hervorgehoben, Abweichungen unterstrichen.

Da es sich bei der Insertion um nicht-codierende Sequenzen handelt, würde die Translation von Transkripten unmittelbar nach Exon 8 unterbrochen. Das daraus resultierende hypothetische Protein wäre demnach um 307 Aminosäuren C-terminal trunziert.

```

N`  V  E  G  T  A  V  Y  L  P  V  *  R  S  T  V
5`  GTG GAA GGC ACA GCA GTT TAT CTA CCA GTT TAA AGG AGT ACA GTT

N`  G  T  C  F  W  K  R  H  V  N  V  A  E  E  T
5`  GGA ACG TGT TTT TGG AAA AGG CAT GTT AAT GTA GCA GAA GAA ACG

N`  S  V  H  T  F  E  D  S  F  *  A  L  S
5`  TCA GTG CAC ACT TTC GAA GAC AGT TTC TGA GCA TTA AGT

```

Abb. 3.4: Ausschnitt aus einem hypothetischen Transkript, das die unbekannte Sequenzinsertion (unterstrichen) enthält. Die Translation der Nucleotidsequenz würde direkt hinter Exon 8 bzw. am Anfang der Sequenzinsertion unterbrochen (* = STOP). Die ersten 10 Aminosäuren entsprechen dem 3`Ende von Exon 8.

Um herauszufinden, ob die Insertion transkribiert wird, haben wir RNA-Extrakte aus dem Hinterwurzelganglion und Gehirn der Ratte mittels RT-PCR analysiert. Im Hinterwurzelganglion ließen sich keine Transkripte nachweisen, wohl aber im Gehirn (dazu liegen leider keine experimentellen Daten vor). Man kann also davon ausgehen, dass es sich hierbei tatsächlich um ein bisher noch nicht beschriebenes Exon handelt. Aufgrund seiner Lage in der genomischen Sequenz des Versicangens haben wir dieses Exon als Exon 8a bezeichnet.

3.2.2. Das nicht-codierende Exon 7a

Auch dieses putative Exon wurde durch eine so genannte BLAST-Suche identifiziert. Hierzu wurde der DNA-Abschnitt des Versicans der Ratte (Gen-Name: CSPG2, Gen-ID: 114122) für den Abgleich mit Ratten EST-Sequenzen aus der Unigene-Datenbank verwendet. Dabei wurde zunächst der EST BF 545755 entdeckt. Dieser EST enthält das 5' Ende einer zwischen den beiden GAG-codierenden Exons 7 und 8 liegenden intronischen Sequenz (s.Abb.3.5). Der dazugehörige Klon trägt die Bezeichnung UI-R-BTO-qa-g-06-0-UI.r1. Zu diesem Klon gehört ein zweiter Klon mit der Bezeichnung UI-R-BTO-qa-g-06-0-UI.s1. Dieser Klon enthält den EST AI 454068, der das 3' Ende der zwischen den beiden Exons 7 und 8 liegenden Sequenz enthält (s.Abb.3.5).

```
ACGATTGAAAACTTCGTCCGGTTTCGTCTTACTTCCCCTATAACTTTATCCTGATGTTTTGACGAACGGATGA
CAAACGTCCATGTCTTTACGGTCATCTTTACCTTCCCTCACCCCACTGACACCTAGGTAGTCACTCCGACAAACT
TACAGGGTAATGTCCAGTTAAACTTCTCTGCTGACCTTCGTTCTAATTCAAGACTGGTTCCTTATCGGTTTATC
TCGACCCTAACGTGAGACACCGAATCATCTGCCTTAGACTTCTCTGATATTAGAATGGGTAGTCTCAGAGATGAA
ATAACATCAGTTCCTGAAGGAATGAAAATTCAAAAATAAACTAAGATCGTAACCCTATAGACCATTATAGATA
GACACCTAGGCATAGGTATAGTAGACATAGATATGCATACACACATACAGTTACCTGAGTTTACGATCCCATGAT
TTCTAATCGCTACAAGATGAAGTGCCAACCGGAAAATAAACAGTTAGGTTTTGCAATACACATACTCACGAAAA
AGACTTACACACAGACACTAGGTAAACGTACGGACCATGGATCTTTCCGGTCTCTCTCACAACCTAATGGGATGTT
AACCTCAATATTAGTCAAAACCTCGAAGACTCATCCACGATCCCTAGATTAAGTCTGTGACTCCTTCTCGTGGGC
CTGAAAATTGGACGACTTGCTCGAAGGACGGGTATAACCAACGTAAGAAAAAAAAAACTTTTTTTTTTCTATTTA
AAAATCTCTTAAAGTGTTTTACATAAACCTAGGGTGAGTGGGGTTGACACGAGTTCTAAGTGAAACCGATGGGTC
GGGTGGGTTAAAGTAAGGCAGAAAAGTGAATAATTTGGATGGATGAGCTCAGGCACGACGAGTTTACGAGCAACT
CAAATCTCGTCAGAGGACCTAGTACCAGTCGGATCGTTCTTCTGACCAAGTCTCTCGTAAAACCTCAAGTTAACA
GGTTTACTGAACAAAAGCAAATCAAATAGAATGATGTGCCACAAAAGGTTTTACTGAGACTAACGAAGTTATG
CGACAGATC
```

Abb. 3.5: 1059 bp umfassender genomischer Abschnitt aus dem Intron zwischen Exon 7 und 8 der Ratte. Die ersten 494 nt der Sequenz (Fettdruck) finden sich auch in dem Ratten-EST BF 545755, die letzten 393 nt (Fettdruck) im Ratten-EST AI 454068.

Um herauszufinden, ob diese Insertion transkribiert wird, haben wir RNA-Extrakte aus dem Hinterwurzelganglion und dem Gehirn der Ratte mittels RT-PCR analysiert. Im Hinterwurzelganglion ließen sich keine Transkripte nachweisen, wohl aber im Gehirn. Das während der RT-PCR von cDNA aus dem Gehirn amplifizierte DNA-Fragment wurde im Agarosegel aufgetrennt, isoliert und sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

```

N` P   F   T   E   E   P   H   I   F   E   K   E   P   S   E   K   T   T
5`CCA TTC ACT GAG GAA CCA CAC ATC TTT GAG AAG GAG CCC AGT GAG AAA ACA ACA
N` G   D   I   I   L   P   R   E   S   V   T   Q   H   P   L   T   T   L
5`GGT GAC ATA ATA CTT CCT AGA GAA TCT GTA ACA CAG CAC CCT CTG ACA ACT CTC
N`Met  D   I   I   A   K   K   T   E   S   D   I   D   H   E   Y   H   Met
5`ATG GAT ATC ATA GCC AAG AAA ACA GAA TCT GAT ATT GAT CAC GAG TAT CAC ATG
N` T   S   K   P   P   V   Met  Q   P   T   R   P   S   V   V   E   R   K
5`ACC TCA AAG CCT CCT GTA ATG CAG CCA ACA AGA CCA TCA GTT GTG GAA AGA AAA
N` T   T   S   K   P   Q   E   L   S   T   S   S   P   P   A   G   T   K
5`ACA ACT TCC AAA CCT CAA GAG TTG TCT ACT TCA TCA CCC CCG GCA GGG ACC AAA
N` F   H   P   D   I   N   V   Y   I   I   E   V   R   E   N   K   T   G
5`TTC CAC CCT GAC ATA AAT GTT TAT ATT ATT GAG GTC AGA GAA AAC AAG ACA GGT
N` T   G   S   I   *   R   D   D   W   K   Q   D   *   V   L   T   K   E
5`ACA GGG TCA ATT TGA AGA GAC GAC TGG AAG CAA GAT TAA GTT CTG ACC AAG GAA
N` *   P   N   R   A   G   I   A   L   C   G   L   V   D   G   I   *   R
5`TAG CCA AAT AGA GCT GGG ATT GCA CTC TGT GGC TTA GTA GAC GGA ATC TGA AGA
N` D   Y   N   L   T   H   Q   S   L   Y   F   I   V   V   K   D   F   L
5`GAC TAT AAT CTT ACC CAT CAG AGT CTC TAC TTT ATT GTA GTC AAG GAC TTC CTT
N` T   F   K   F   L   I   L   I   L   A   L   G   Y   L   V   I   S   I
5`ACT TTT AAG TTT TTG ATT TTG ATT CTA GCA TTG GGA TAT CTG GTA ATA TCT ATC
N` C   G   S   V   S   I   S   S   V   S   I   R   Met  C   V   C   Q   W
5`TGT GGA TCC GTA TCC ATA TCA TCT GTA TCT ATA CGT ATG TGT GTA TGT CAA TGG
N` T   Q   Met  L   G   Y   *   R   I   S   D   V   L   L   H   G
5`ACT CAA ATG CTA GGG TAC TAA AGG ATT AGC GAT GTT CTA CTT CAC GGT TG

```

Abb. 3.6: Nucleotidsequenz des 644 bp umfassenden PCR-Produktes (cDNA von RNA-Extrakt aus dem Gehirn der Ratte), das unter Verwendung der beiden Primer Exon 7_for und EST_rev (unterstrichen) amplifiziert wurde. Nucleotide, die auf intronische Bereiche zwischen Exon 7 und 8 in der genomischen Sequenz des Versicans der Ratte zurückgeführt werden können und ebenfalls im EST BF 545755 zu finden sind, wurden durch Fettdruck hervorgehoben. Auch bei diesem putativen Exon handelt es sich um nicht-codierende Sequenzen (*= STOP). Deswegen würde die Translation der Nucleotide - analog zu Exon 8a - unmittelbar hinter Exon 7 unterbrochen werden.

Obwohl das PCR-Produkt tatsächlich einen Teil aus der intronischen Sequenz (und damit auch aus dem EST BF 545755) enthält, verläuft der Übergang aus Exon 7 in das Intron anders, als man aufgrund der EST-Daten erwarten würde. Das 5`Ende der intronischen Sequenz des PCR-Produktes stimmt nicht mit dem 5`Ende des EST BF 545755 überein, sondern liegt mitten in der Sequenz des ESTs, um 159 Nucleotide Richtung 3`Ende versetzt (vgl. Abb. 3.5 und 3.6, der Abschnitt aus der Sequenz des ESTs BF 545755, der auch im PCR-Produkt auftritt, ist gelb unterlegt).

Da dieser intronische Abschnitt transkribiert wird, handelt es sich - in Analogie zu Exon 8a - offensichtlich ebenfalls um ein bisher noch nicht beschriebenes Exon. Aufgrund seiner Lage in der Sequenz des Versicangens haben wir dieses Exon als Exon 7a bezeichnet.

Offensichtlich wird Exon 7a in verschiedenen Variationen transkribiert. Da die Translation jedoch - unabhängig vom Startpunkt des Exons - unmittelbar hinter Exon 7 unterbrochen würde, ist unklar, welche Bedeutung dahintersteht. Möglicherweise erhält man einen Anhaltspunkt dafür, wenn man das 3`Ende von Exon 7a charakterisiert. Arbeiten dazu stehen allerdings noch aus.

Aus der Kombination von Exon 7a und 8a mit den bisher bekannten Exons vom Versican lassen sich vier weitere Splicevarianten postulieren. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit den Varianten V_0 und V_2 haben wir diese Varianten als V_0'' und V_0''' sowie V_2'' und V_2''' bezeichnet.

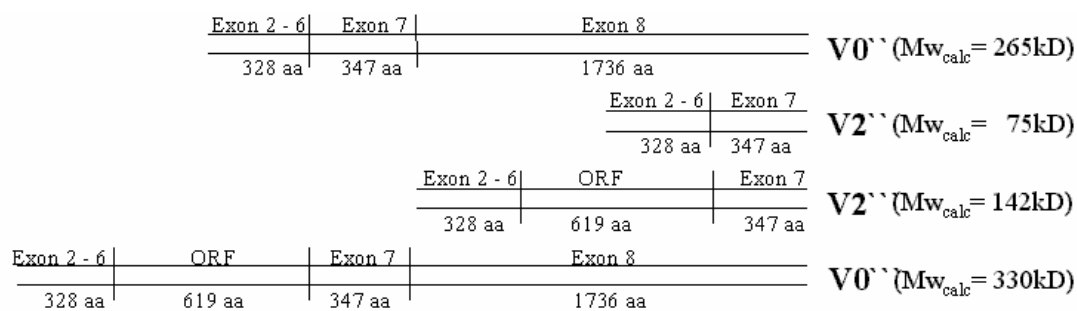


Abb. 3.7: Die vier Splicevarianten, die sich aus der Kombination von Exon 7a und 8a mit den bisher bekannten Exons des Versicangens ableiten lassen. Da die Nucleotidsequenzen beider Exons keine proteincodierenden Informationen enthalten, fehlt allen vier Varianten der - von den Exons 9 - 15 codierte - C-Terminus.

Ob diese Varianten tatsächlich translatiert werden, muss im Rahmen nachfolgender Untersuchungen geklärt werden. Interessant ist allerdings die offensichtlich existierende funktionelle Analogie. Allen vier hypothetischen Proteinen fehlen die beiden C-terminal lokalisierten EGF-ähnlichen Domänen, die Ca^{2+} -abhängige Lektindomäne und die Sushi-Domäne. Für diese Domänen sind verschiedene Interaktionen mit Proteinen und Kohlenhydraten beschrieben (Wu et al., 2005). Sie verleihen dem Versican einen adhäsiven Charakter und könnten von essentieller Bedeutung für die für das Versican diskutierte Beteiligung der Regulation der Zellmigration und Musterbildung im sich entwickelnden Nervensystem sein (Perissinotto et al., 2000). Fraglich ist allerdings, welche funktionelle Bedeutung diesen Domänen im bereits vollständig ausgebildeten Nervensystem, insbesondere

dem Gehirn, zukommt. Versican V₂ ist bekanntlich die einzige Variante, die in nennenswertem Umfang im Gehirn exprimiert wird (Schmalfeld et al., 1998; Westling et al., 2004). Man findet sie vor allem als integralen Bestandteil von perineuronalen Netzen, wo sie vermutlich maßgeblich an der Protektion von Neuronen vor exogenem oxidativen Stress beteiligt ist (Yamaguchi, 2000; Reinert et al., 2003). Da Versican für die Verankerung in den perineuronalen Netzen eigentlich nur die N-terminal lokalisierte, Hyaluronan-bindende Domäne benötigt und für das Puffern von redoxaktiven Metallionen eigentlich nur die GAG α -Domäne funktionell relevant ist, scheint der C-Terminus - zumindest theoretisch - entbehrlich zu sein. Interessanterweise ist ein offensichtlich altersbedingter Verlust genau dieser drei Domänen bereits für das homologe Aggrecan beschrieben (Paulsson et al., 1987; Olin et al., 2001). Und auch in affinitätsgereinigten Proteinextrakten aus dem Gehirn von Mensch und Ratte lassen sich mehrere - offensichtlich stabile - C-terminal trunkeierte Versicane identifizieren (Westling et al., 2004). Dass bisher noch keine C-terminal lokalisierten Erkennungssequenzen für Matrixmetalloproteasen identifiziert wurden, lässt deshalb vermuten, dass der Existenz der C-terminal trunkeierten Varianten ein alternativer Mechanismus zugrunde liegt. Möglicherweise erklärt sich die Existenz der Varianten deshalb tatsächlich durch eine unvollständig verlaufende Translation der entsprechenden Transkripte.

3.3. Ausblick auf zu untersuchende Fragestellungen

3.3.1. Nachweis der neuronalen Expression des IB₄-bindenden Versicans V₂'

Um zu beweisen, dass V₂' für die IB₄-Reaktivität der nozizeptiven, nicht-peptidergen C-Faserneurone der Ratte verantwortlich ist, sollte man zunächst einmal untersuchen, ob sich V₂' spezifische Transkripte in RNA-Extrakten aus dem DRG nachweisen lassen. Wir haben bereits gezeigt, dass der offene Leserahmen - zumindest im DRG - immer und ausschließlich in Kombination mit Exon 7 auftritt (siehe dazu Kapitel 2.5.2). Da diese Kombination allerdings nicht nur in V₂', sondern auch in V₀' auftritt, ist dieser Nachweis nicht V₂' spezifisch. Um V₂' spezifische Transkripte nachzuweisen, könnte man eine RT-PCR mit Primern gegen Sequenzen aus den beiden Exons 7 und 9 durchführen. Da wir im DRG keine V₂ spezifischen Transkripte nachweisen konnten und die beiden Exons 7 und 9 in der Variante V₀' durch Exon 8 voneinander getrennt sind, ließe/n sich das oder die amplifizierte/n Fragment/e relativ leicht seinem/ihrem entsprechenden Transkript zuordnen.

Natürlich ist der Nachweis von V₂' spezifischen Transkripten noch kein Beweis für ihren neuronalen Ursprung. Allerdings ist eine RT-PCR Analyse relativ leicht und schnell durchzuführen und unter Umständen von essentieller Bedeutung für den weiteren Verlauf der Experimente. Wenn sich - wider Erwarten - keine V₂' spezifischen Transkripte nachweisen lassen, machen alle nachfolgenden Experimente keinen Sinn.

Die RT-PCR bietet noch einen weiteren, zusätzlichen Vorteil. Sollte sich ein V₂' spezifisches DNA-Fragment amplifizieren lassen, könnte man dieses Fragment durch die Insertion in einen geeigneten Vektor klonieren. Benutzt man für die Klonierung z. B. einen Vektor, dessen multiple Klonierungsstelle zu beiden Seiten von Promotoren für die SP6 und T7 RNA-Polymerasen eingefasst ist, lassen sich aus den insertierten DNA-Fragmenten, über eine *in vitro*-Transkription unter Verwendung DIG-markierter oder alternativ auch radioaktiv-markierter Nucleotide auch gleich die für die *in situ*-Hybridisierung erforderlichen sense und antisense Sonden generieren.

Wenn V₂' für die IB₄-Reaktivität der nicht-peptidergen C-Fasern verantwortlich ist, müssen sich natürlich auch V₂' spezifische Transkripte in den Somata der nicht-peptidergen C-Fasern nachweisen lassen. Wir haben bereits mit unseren Immunfluoreszenz-Experimenten an DRG-Neuronen gezeigt, dass die nicht-peptidergen C-Fasern neben den IB₄-bindenden Epitopen auch Versican exprimieren (s.dazu Kapitel 2.4.4). Es ist deshalb zu erwarten, dass die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierung und Immunfluoreszenz miteinander korrelieren.

Mit dem Nachweis von V_2' spezifischer mRNA in den Somata der nicht-peptidergen C-Fasern ist allerdings noch nicht gezeigt, dass die mRNA auch wirklich in eine Proteinsequenz translatiert wird. Darüber hinaus ist der anti-GHAP Antikörper, den wir für die Analyse der anti-Versican Immunreaktivität an DRG-Neuronen eingesetzt haben, gegen den hoch konservierten N-Terminus des Versicans gerichtet und besitzt damit keine Spezifität für eine bestimmte Splicevariante. Deshalb fehlt natürlich noch der Nachweis, dass es sich bei dem IB_4 -bindenden Versican tatsächlich um V_2' handelt.

Um zu beweisen, dass V_2' für die IB_4 -Reaktivität der nicht-peptidergen C-Fasern verantwortlich ist, existieren zwei alternative Möglichkeiten: Man kann entweder versuchen, über die intrathekale Applikation von V_2' spezifischen antisense Oligonucleotiden die Translation der zugrunde liegenden mRNA zu blockieren und die Reduktion der IB_4 -Reaktivität über die Immunfluoreszenz an DRG-Neuronen dokumentieren oder aber die Existenz der durch den ORF codierten Sequenzen über eine Westernblot-Analyse von Proteinextrakten aus dem DRG beweisen. Der uns freundlicherweise von Prof. Margolis für die Analyse der GAG-Domänenstruktur des IB_4 -bindenden Versicans zur Verfügung gestellte anti-GAG α Antikörper ist gegen Proteinsequenzen gerichtet, die durch Exon 7 codiert werden. Wenn man einen zweiten Antikörper besäße, der gegen die Proteinsequenzen gerichtet ist, die durch den ORF codiert werden, könnte man über einen Vergleich der Immunreaktivitäten im Westernblot beweisen, dass die IB_4 -bindende Domäne a) nur die GAG α -Domäne besitzt und b) diese Domäne aus Proteinsequenzen zusammengesetzt ist, die durch den ORF und Exon 7 codiert werden.