

**Produktion und funktionelle Charakterisierung humaner  
rekombinanter Tenascin-R Proteinfragmente in Bezug  
auf die axonale Regeneration im Zentralnervensystem**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Bettina Baeßler geb. Weiher  
aus Köln

2011

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. P. Pesheva
2. Gutachter: Prof. Dr. T. Pietsch

Tag der Mündlichen Prüfung: 06.05.2011

Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Bonn  
Direktor: Prof. Dr. med. H.-J. Biersack

*Für Finja und Felix*



# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>5</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>8</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Die Extrazelluläre Matrix des ZNS</b>	<b>11</b>
1.1.1 Definition und Aufgaben	11
1.1.1.1 Spezialisierte ECM-Strukturen im ZNS	11
1.1.2 Molekulare Komponenten der ECM	12
1.1.2.1 Glykosaminoglykane	13
1.1.2.2 Proteoglykane	13
1.1.2.3 Glykoproteine	14
1.1.3 Zelluläre Rezeptoren für ECM-Moleküle	15
<b>1.2 Die Tenascin-Familie</b>	<b>17</b>
1.2.1 Historischer Hintergrund	17
1.2.2 Struktur	18
1.2.3 Allgemeine Funktion	19
1.2.4 Familienmitglieder	20
1.2.4.1 Tenascin-C (TNC)	20
1.2.4.2 Tenascin-X (TNX)	21
1.2.4.3 Tenascin-W (TNW)	21
<b>1.3 Tenascin-R (TNR)</b>	<b>22</b>
1.3.1 Struktur	22
1.3.2 Gewebeverteilung während Entwicklung und Pathologie	23
1.3.3 Antiadhäsive Eigenschaften	25
1.3.4 Adhäsive Eigenschaften	26
<b>1.4 Voraussetzungen und Ziele der Arbeit</b>	<b>28</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>30</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>30</b>
2.1.1 Primer	30
2.1.2 Vektoren und Plasmide	30
2.1.3 Antibiotika, Enzyme, Kits	30
2.1.4 Antikörper und Lektine	31
2.1.5 ECM-Moleküle und Glykolipide	31

2.1.6	Häufig verwendete Lösungen	31
2.1.7	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	32
2.1.8	Geräte	32
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>33</b>
2.2.1	RT-PCR-Analysen	33
2.2.2	Herstellung der rekombinanten Proteinfragmente	34
2.2.2.1	TOPO/TA-Klonierungssystem	34
2.2.2.2	Transfektion von Flp-In™ 293-Zellen mit hTNR1, 2, 3	35
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	35
2.2.3.1	Affinitätschromatographische Aufreinigung von hTNR1, 2 und 3 aus Flp-In™ 293-Zellkulturüberständen	35
2.2.3.2	Immunaффinitätschromatographische Aufreinigung von TNR-Proteinen aus Gehirngewebe	36
2.2.3.3	ELISA	36
2.2.3.4	Sandwich-ELISA	37
2.2.3.5	HRP-Konjugation der monoklonalen Antikörper R1 und R6	37
2.2.3.6	Competition-ELISA	37
2.2.3.7	Proteinbestimmung	38
2.2.3.8	SDS-PAGE	38
2.2.3.9	Western-Blot-Analyse	38
2.2.3.10	Dot-Blot-Analysen	39
2.2.3.11	N-Deglykosylierung von Proteinen	39
2.2.4	Zellkultur	40
2.2.4.1	Zelllinien	40
2.2.4.2	Medien	40
2.2.4.3	Zelladhäsions- und Neuritenwachstumsstudien	41
2.2.4.3.1	<i>Zellbindungsstudien mit Erythrozyten</i>	41
2.2.4.3.2	<i>Zelladhäsionsstudien mit F3-Transfektanten</i>	41
2.2.4.3.3	<i>SHSY5Y-Zellen</i>	41
2.2.4.3.4	<i>Kleinhirn-Mikroexplantate</i>	42
2.2.4.4	Kleinhirnkulturen	42
2.2.4.5	Oligodendrozytendifferenzierung mittels rekombinanter TNR-Fragmente	42
2.2.4.6	Immunfluoreszenzfärbungen von Kleinhirnkulturen	43
2.2.5	Statistische Auswertung	43
2.2.5.1	Zellbindungsstudien	43
2.2.5.2	ELISA-Studien	44
<b>2.3</b>	<b>Anhang</b>	<b>44</b>
2.3.1	Vektoren und Plasmide	44

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>46</b>
3.1	<b>Erzeugung und Selektion humaner TNR-Transfektanten</b>	<b>46</b>
3.1.1	Herstellung produzierender Transfektanten	46
3.1.2	RT-PCR-Analysen humaner TNR-Transfektanten	47
3.1.3	Immunbiochemische Analysen humaner rekombinanter TNR-Proteinfragmente	47
3.2	<b>Strukturelle und biochemische Analyse humaner rekombinanter TNR-Proteinfragmente</b>	<b>49</b>
3.2.1	Bestimmung der Epitope monoklonaler TNR-Antikörper	49
3.2.2	Analysen der Glykosylierung von humanen TNR-Proteinfragmenten	53
3.3	<b>Funktionelle Charakterisierung humaner rekombinanter TNR-Proteinfragmente</b>	<b>55</b>
3.3.1	Antiadhäsive Eigenschaften	55
3.3.1.1	Zelladhäsionsstudien mit F3/Contactin-Transfektanten	55
3.3.1.2	Untersuchung der neuronalen Zelladhäsion und des axonalen Wachstums von Kleinhirnneuronen	58
3.3.1.3	Untersuchung der Zelladhäsion und des axonalen Wachstums neuronal differenzierter humaner Neuroblastomzellen	59
3.3.2	Adhäsive Eigenschaften	62
3.3.2.1	Untersuchung der Sulfatid-vermittelten Interaktionen von Erythrozyten mit TNR-Fragmenten	62
3.3.2.2	Einfluss humaner TNR-Fragmente auf die Differenzierung von Oligodendrozyten	65
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>69</b>
4.1	<b>Strukturelle und biochemische Analyse humaner TNR-Fragmente</b>	<b>69</b>
4.2	<b>F3/Contactin-Bindungsstelle(n) auf dem humanen TNR</b>	<b>72</b>
4.3	<b>Sulfatid-Bindungsstelle(n) und TNR-vermittelte Differenzierung von Oligodendrozyten</b>	<b>74</b>
4.4	<b>Ein Ausblick</b>	<b>76</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG</b>	<b>82</b>
6.1	<b>Aus der Arbeit entstandene Publikationen:</b>	<b>82</b>
6.2	<b>BONFOR-Forschungspreis</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>84</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>96</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
BME	Basal Medium Eagle
BSA	Rinder-Serumalbumin (bovine serum albumin)
BSA-LF	BSA lipidfrei (BSA lipid-free)
CALEB	Chicken acidic leucine-rich EGF-like domain containing brain protein
cDNA	Complementary desoxyribonucleic acid
CHO	Chinese Hamster Ovary
CS	Chondroitinsulfat
CSPG	Chondroitinsulfat-Proteoglykane
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Desoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
DPBS	Dullbeco's modified PBS
DSA	Datura Stramonium Agglutinin
DSPG	Dermatansulfat-Proteoglykane
ECL	Enhanced chemiluminescence
ECM	Extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FAK	Focal Adhesion Kinase
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FN	Fibronectin
FNG	Fibrinogen
GAG	Glykosaminoglykane
Gal	Galaktose
GalC	Galaktocerebroside
GalNAc	N-Acetyl-Galaktosamin
GlcNAc	N-Acetyl-Glukosamin
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
HA	Hyaluronsäure (hyaluronic acid)
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEK	Human Embryonic Kidney



HRP	Meerrettichperoxidase
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
Ig	Immunglobulin
Kontr	Kontrolle
LCL	Lens culinaris Lektin
LN	Laminin
MAA	Maackia Amurensis Agglutinin
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein (myelin-associated glycoprotein)
MBP	Myelin-basisches Protein (myelin basic protein)
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
MP	Milchpulver
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MS	Multiple Sklerose
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NEAA	Nutrient Essential Amino Acids
O-2A	Oligodendrozyten-Typ-2-Astrozyten
OL	Oligodendrozyten
OMgp	Oligodendrozyten Myelin Glykoprotein (oligodendrocyte myelin glycoprotein)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDL	Poly-D-Lysin
PG	Proteoglykane
PLC	Phospholipase-C
PLL	Poly-L-Lysin
PLP	Proteolipid protein
PNA	Peanut Agglutinin
PNS	Peripheres Nervensystem
PS	Penicillin/Streptomycin
PTP- $\beta$	Phosphotyrosin-Phosphatase $\beta$
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (reverse transcription-PCR)
SA	Sialinsäure (sialic acid)
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SNA	Sambucus Nigra Agglutinin
Sulf	Sulfatide
TAE	Tris-acetate-ethylenediaminetetraacetic acid

TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (Tris-buffered saline)
TES	Tris-EDTA-Salzpuffer
TN	Tenascin
ZNS	Zentralnervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Extrazelluläre Matrix des ZNS

### 1.1.1 Definition und Aufgaben

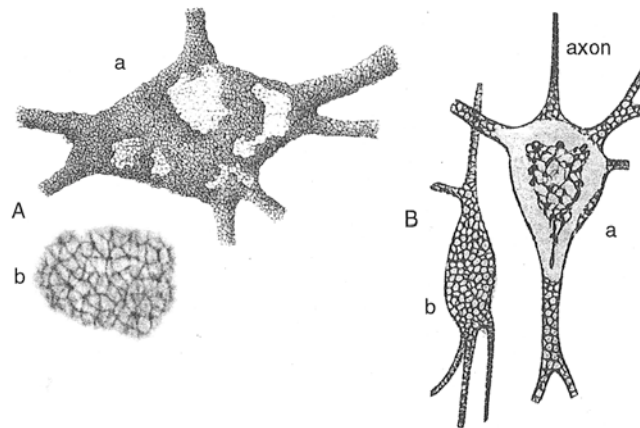
Gewebe und Organe bestehen nicht nur aus Zellen. Ein beträchtlicher Teil ihres Volumens ist extrazellulärer Raum, der weitgehend durch ein komplexes Netzwerk aus Makromolekülen ausgefüllt wird, welche die Extrazelluläre Matrix (ECM) bilden. Diese Matrix setzt sich aus einer Vielfalt an Proteinen und Polysacchariden zusammen, welche von den umliegenden Zellen freigesetzt werden und an Zellmembranen gebunden sind oder im Extrazellulärraum geordnete Strukturen ausbilden (wie etwa Bindegewebe). Früher war man der Ansicht, die ECM diene lediglich als funktionsloses Gerüst, um die Gewebestruktur zu stabilisieren. Heute aber weiß man, dass sie eine viel aktivere und komplexere Rolle innehat. Sie reguliert das Verhalten von Zellen, die an sie angrenzen, dient dem Transport von Ionen, Hormonen und Wachstumsfaktoren und beeinflusst so Überleben, Entwicklung, Migration, Proliferation, Form und Funktion der Zellen. Die ECM stellt somit eine dynamische Struktur dar, die insbesondere während der Entwicklung und im Rahmen pathologischer Prozesse eine wichtige Rolle spielt.

Bis vor nicht allzu langer Zeit herrschte noch große Skepsis, ob es im Gehirn überhaupt eine ECM gibt. Mittlerweile weiß man nicht nur, dass es sie gibt; es sind sogar einige Moleküle bekannt, die hauptsächlich in der ECM des Zentralnervensystems (ZNS) vorkommen (Iozzo, 1998; Rauch et al., 2005; Ruoslahti, 1996). Die Hauptlieferanten der ECM im Gehirn sind Astrozyten, Oligodendrozyten (OL) und Neurone. Die Aufgabe des vierten Zelltyps im Gehirn, der aktivierten Mikroglia, hingegen ist es nicht, ECM zu produzieren, sondern sie durch Herstellung verschiedener Proteasen zu zerstören, um ihre eigene Bewegungsfreiheit zu sichern. Dies hat zur Folge, dass die ECM nicht statisch ist, sondern ständig umgebildet wird (insbesondere durch Abbau mittels Metalloproteasen) und sich so an Veränderungen ihrer Umwelt anpasst (Bosman und Stamenkovich, 2003).

#### 1.1.1.1 Spezialisierte ECM-Strukturen im ZNS

Sowohl während der Neurogenese als auch im ausgebildeten neuronalen Netzwerk des ZNS bildet die ECM spezialisierte Strukturen aus, wie zum Beispiel *Tunnel*, *Röhren* oder *Straßen*, welche von großer funktioneller Wichtigkeit unter anderem für das zielgerichtete Wachstum axonaler Projektionen und die neurale Zellwanderung sind. Im ausgebildeten neuronalen Netzwerk herrschen Topologien vor wie etwa die Ranvierschen Schnürringe im Myelin (Tenascin-R

akkumuliert in diesen Membranregionen) und *Tunnel* bzw. *Röhren*, die periaxonal Nervenfasertrakte stabilisieren. Eine bedeutende ECM-Topologie des adulten ZNS stellen die perineuronalen Netze dar (s. Abb. 1). Diese bestehen aus Hyaluronsäure-Proteoglykan(PG)-Aggregaten mit einem molekularen Shift von Tenascin-C-Neurocan während der früheren Entwicklung zu Tenascin-R-Brevican und Phosphacan im adulten Gehirn und deren Assoziation mit der Membranoberfläche durch die Interaktion mit spezifischen zellulären Rezeptoren wie Integrinen oder neuronalen Zelladhäsionsmolekülen. Die molekularen Komponenten der perineuronalen Netze sind extrasynaptisch lokalisiert und werden um den Zellkörper erst nach der Etablierung synaptischer Strukturen gebildet, um der Stabilisierung von Synapsen und der neuronalen Homöostase zu dienen (Celio et al., 1998).

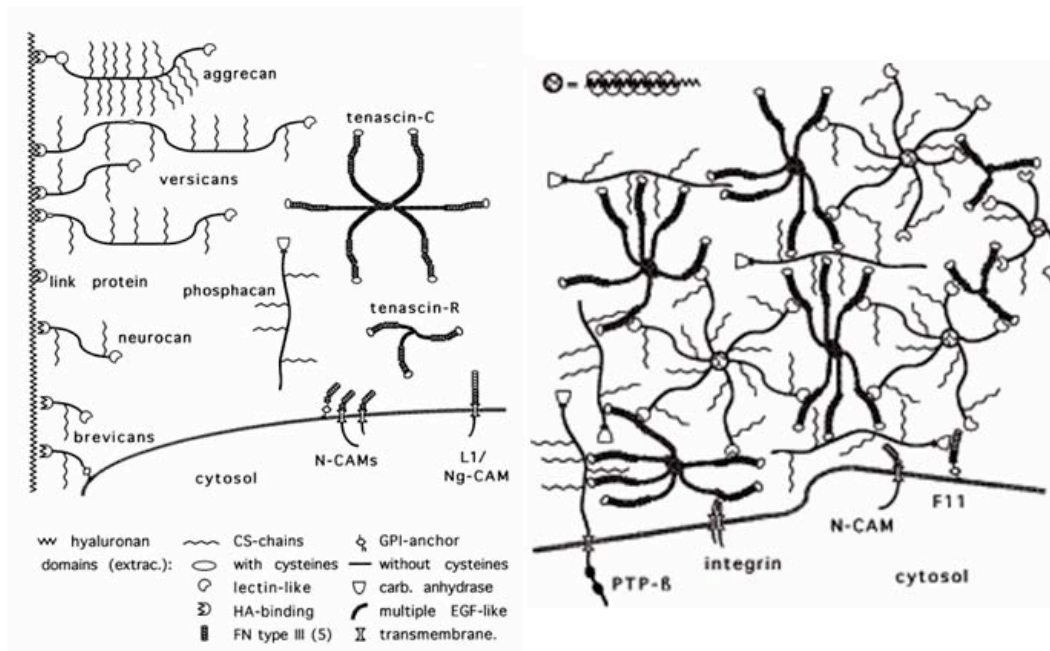


#### **Abb. 1 Perineuronale Netze um Nervenzellen im ZNS**

(A) Nervenzelle mit retikulärem Netz (Vorderhorn des Rückenmarks der Katze) (B) Zwei cerebrale Zellen mit kurzen Axonen (adulte Katze) (Quelle: Celio et al., 1998).

#### **1.1.2 Molekulare Komponenten der ECM**

Die ECM besteht zum größten Teil aus multimeren Proteinen, welche supramolekulare Strukturen ausbilden (s. Abb. 2 S. 13). Man kann zwei Hauptklassen von Matrixmolekülen unterscheiden: (i) Glykosaminoglykane (GAG), die meistens kovalent an Proteine gebunden sind und so PG bilden, und (ii) Glykoproteine wie Kollagen, Fibronectin (FN), Laminin (LN) und Tenascin. Die Organisation der ECM im Gehirn basiert auf Aggregaten von Hyaluronsäure und PG, welche durch oligomere Glykoproteine verbunden sind (Rauch et al., 2005; Yamaguchi, 2000) (s. Abb. 2).



**Abb. 2 ECM-Moleküle und supramolekulare ECM-Strukturen des Gehirns**

PG, Tenascine, außerdem NCAM, L1/Ng-CAM, F11, Integrin, PTP-β als Beispiele für an der Zellmembran vorhandene Zelladhäsionsmoleküle, die als Rezeptoren für ECM-Moleküle dienen können. Rechts die supramolekulare Struktur, welche diese Moleküle ausbilden können. CS, Chondroitinsulfat; HA, Hyaluronsäure; EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; GPI, Glykosylphosphatidyl-Inositol; PTP-β, Phosphotyrosin-Phosphatase β. Weitere Erläuterungen im Text. (Quelle: Rauch, 1997)

### 1.1.2.1 Glykosaminoglykane

GAG sind lange, unverzweigte Polysaccharidketten aus Disaccharideinheiten (N-Acetylgalaktosamin oder N-Acetylglukosamin + Uronsäure = Glukuronat oder Iduronat), die durch ihre Sulfat- oder Carboxylgruppen stark negativ geladen und zudem außerordentlich stabil und flexibel sind. Unter den GAG werden gemäß der Zucker, den glykosidischen Bindungstypen und der Anzahl und Lokalisation der Sulfatreste vier Gruppen unterschieden: (i) Hyaluronsäure, (ii) Chondroitinsulfat (CS) und Dermatansulfat, (iii) Heparansulfat und (iiii) Keratansulfat. Durch ihre negative Ladung ziehen sie viele Kationen, insbesondere Natrium, an, durch deren osmotische Aktivität große Mengen an Wasser eingelagert werden können (Alberts et al., 2002).

### 1.1.2.2 Proteoglykane

Außer Hyaluronsäure sind alle GAG meist kovalent an ein Protein gebunden und bilden so PG. Die Polypeptidkette, auch Core-Protein genannt, ist reich an Serin und Threonin; bisher sind über 20 verschiedene PG-Proteingerüste bekannt. PG haben vielfältige Funktionen; eine bedeutende Rolle kommt ihnen bei der Zellerkennung zu. Sie dienen nicht nur Interaktionen innerhalb der Matrix, sondern sind auch als Rezeptoren auf der Zelloberfläche vorhanden, um

Interaktionen zwischen Zellen und Matrix zu vermitteln. Obwohl eine eindeutige Einteilung der PG aufgrund ihrer Heterogenität schwierig ist, kann man sie anhand der gebundenen Seitenketten zuordnen. Im ZNS kommen vor allem Chondroitinsulfat-Proteoglykane (CSPG) und Dermatansulfat-Proteoglykane (DSPG) vor, die hauptsächlich von Gliazellen (i.e. Astrozyten und OL) synthetisiert werden (Rhodes und Fawcett, 2004).

Zusätzlich zu der Einteilung durch die GAG-Seitenketten werden die PG in verschiedene Familien untergliedert, von denen die Lektikan-Familie für das Gehirn die wichtigste ist. Lektikane oder auch Hyalektikane (Iozzo und Murdoch, 1996) sind ein Akronym für Hyaluronsäure- und Lektin-ähnliche PG. Sie haben eine Tridomänen-Struktur mit einer N-terminalen Bindungsstelle für Hyaluronsäure, einer zentralen Domäne mit GAG-Seitenketten und einer Lektin-ähnlichen Domäne im C-Terminus (Day et al., 2004). Die Vertreter dieser Familie sind Neurocan, Brevican, Aggrecan, Versican und Dermacan, welches erst kürzlich im Zebrafisch entdeckt wurde (Kang et al., 2004; Rauch et al., 2005).

### **1.1.2.3 Glykoproteine**

Zu den Glykoproteinen der ECM gehören FN, LN, Kollagen und multimere Moleküle wie die Tenascine. Sie tragen unterschiedliche Mengen an Oligosacchariden, in der Regel aber keine GAG. Die Glykosylierung eines einzelnen Moleküls kann zudem während der Entwicklung stark variieren. FN, LN und Kollagene stellen im peripheren Nervensystem (PNS) die Hauptbestandteile von Basalmembranen dar. Im Gegensatz dazu sind FN und LN im ZNS, wo sie von Astrozyten exprimiert werden, fast ausschließlich während der embryonalen und frühpostnatalen Entwicklung vorhanden. Im adulten Gehirn findet man eine Expression nur noch in den Basalmembranen der Blutgefäße, in den Hirnhäuten und in Regionen aktiver Neurogenese. Kollagene außer solche vom Typ XVII findet man im ZNS überhaupt nicht (Seppänen et al., 2005). Im reifenden und adulten ZNS wird die ECM dominiert von CSPG und multimeren Glykoproteinen wie Tenascin-R (TNR) (s. Abb. 1 S. 12).

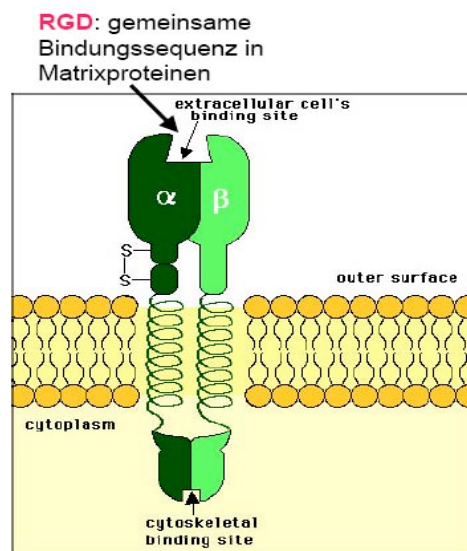
FN und LN sind die adhäsiven Glykoproteine des ZNS, d.h. sie fördern die Adhäsion und Migration neuraler Zellen und das axonale Wachstum. Sie stellen multimoduläre Moleküle dar, die Bindungsstellen für verschiedene Liganden sowohl auf der Zelloberfläche als auch in der ECM haben. FN ist ein Dimer aus zwei homologen Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Laminine, die der Hauptbestandteil von Basalmembranen sind, bestehen aus drei Polypeptidketten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) und formen somit ein Heterotrimer. Sie bilden eine sehr große Genfamilie, von der bisher 5  $\alpha$ -, 3  $\beta$ - und 3  $\gamma$ -Ketten bekannt sind (Bosman und Stamenkovic, 2003; Dityatev und Schachner, 2006). Trotz der vielfältigen genetischen

Variationsmöglichkeiten konnten bisher nur 12 verschiedene Vertreter isoliert werden. Die Tenascine werden unter 2.2 näher besprochen.

### 1.1.3 Zelluläre Rezeptoren für ECM-Moleküle

ECM-Interaktionen und Signale, die über zelluläre Rezeptoren vermittelt werden, kontrollieren viele Aspekte des zellulären Lebens, wie etwa Proliferation, Migration, Differenzierung und Überleben (Giancotti und Ruoslahti, 1999). Es sind vier Hauptgruppen zellulärer Rezeptoren für ECM-Moleküle bekannt: Integrine, PG, Mitglieder der Immunglobulin(Ig)-Superfamilie und Glykolipide.

Bei den Integrinen, den häufigsten ECM-Rezeptoren, handelt es sich um heterodimere Transmembranproteine, die aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit zusammengesetzt sind (s. Abb. 3).



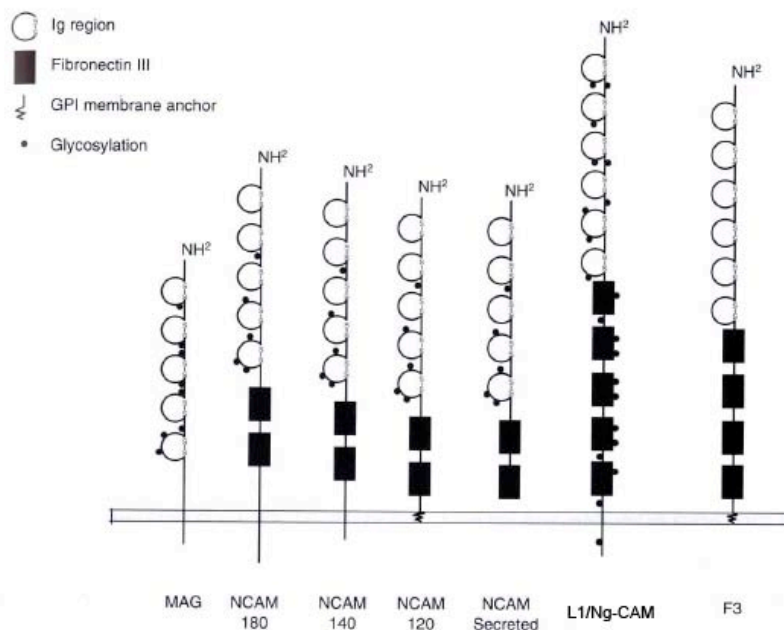
#### Abb. 3 Integrine: Heterodimere

Integrine vermitteln die dynamische Verbindung zwischen dem Actin-Cytoskelett im Zellinneren und molekularen Komponenten der ECM außerhalb der Zelle. (Quelle: <http://www.univie.ac.at/a202/sg/block3/lernunterlagen/physio>)

Die  $\alpha\beta$ -Kombination bestimmt die Affinität und Spezifität von Integrinen für verschiedene ECM-Moleküle. Sie können Signale durch die Zellmembran in beide Richtungen vermitteln: von innen nach außen und von außen nach innen. Dadurch regulieren sie Zelladhäsion, Proliferation und Migration; Integrine vermitteln auch Zell-Zell-Interaktionen sowie die dynamische Verbindung zwischen dem Actin-Cytoskelett im Zellinneren und molekularen Komponenten der ECM außerhalb der Zelle. Der Prototyp des Integrin-Rezeptors ist der FN-Rezeptor, der die spezifische Aminosäuresequenz RGD (Arginin-Glycin-Aspartat) auf verschiedenen ECM-Glykoproteinen erkennt (Alberts et al., 2002).

PG, insbesondere HSPG und CSPG, stellen ebenfalls wichtige zelluläre Rezeptoren für ECM-Moleküle dar, welche Zell-Matrix-Interaktionen vermitteln. Verschiedene CSPG sind auch wichtige Rezeptoren für TNF.

Die Mitglieder der Ig-Superfamilie bestehen aus Ig-Domänen (40–70 Aminosäuren, die durch Disulfidbrücken in einer  $\beta$ -Faltblattstruktur zusammengehalten werden) und FN III-Domänen. Einige Familienmitglieder sind durch Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-(GPI-) Bindung (Glykolipid-anker) an der Zellmembran verankert. Wichtige Vertreter dieser Moleküle im Nervensystem sind NCAM („neural cell adhesion molecule“), F3/Contactin, MAG („Myelin associated glycoprotein“) und L1 (Ng-CAM) (s. Abb. 4).



**Abb. 4 Rezeptoren der Ig-Superfamilie: Beispiele für neurale Zelladhäsionsmoleküle (CAM's)**

Schematische Darstellung von MAG, verschiedenen NCAM-Isoformen, L1 und F3/contactin. (Quelle: <http://www.biologie.uni-regensburg.de/Biochemie/Deutzmann>)

Polare Glykolipide (Glykosphingolipide), namentlich Sulfatide und Sialoganglioside, stellen wichtige Rezeptoren für ECM-Proteine dar, insbesondere für Tenascine. Sie sind mit ihrem hydrophoben Anteil in die Zellmembran eingebettet und ragen mit dem hydrophilen Teil (einer Zuckerkette) in das extrazelluläre Milieu. In der Plasmamembran bilden sie lipide Mikrodomänen, auch *rafts* genannt (Simons und Toomre, 2000), die zusammen mit GPI-verankerten Proteinen (extrazellulär) und Proteinkinasen (intrazellulär) an Signaltransduktionsmechanismen beteiligt sind. Sulfatide sind sulfatierte Galaktocerebroside und werden im Gehirn ausschließlich von OL exprimiert. Ganglioside bestehen aus zwei Fettsäuren (Ceramiden) und Zuckerketten, welche verschiedene Mengen an Sialinsäureresten tragen. Je nach Anzahl der Sialinsäurereste unterscheidet man mono-, di-, trisialo (etc.) Ganglioside. Sie



spielen eine wichtige modulatorische Rolle bei Zellmigration, Axonwachstum und synaptischer Transmission. Beide, Sulfatide und Ganglioside, sind zudem bei der Myelinisierung von Bedeutung (Pan et al., 2005).

Die ECM-Moleküle des Gehirns spielen eine zentrale Rolle in der zellulären Kommunikation nicht nur während normaler Strukturbildung, sondern auch im Verlauf verschiedener Neuropathologien und während der Gewebereparatur (Clegg et al., 2003; Crespo-Santiago, 2004; Sobel, 2001). Wie ein ECM-Molekül das Zellverhalten beeinflusst, hängt davon ab, in welchem molekularen und zellulären Kontext diese Wirkung stattfindet, so z.B. von der Zusammensetzung der ECM, der topographischen Präsentation der ECM-Moleküle, dem vorhandenen Repertoire an zellulären Rezeptoren und intrazellulären Signalkaskaden oder dem Differenzierungsstatus einer Zelle. Innerhalb der ECM bilden die Tenascine eine faszinierende Familie von Glykoproteinen mit unterschiedlichsten Eigenschaften. Im Folgenden soll näher auf sie eingegangen werden.

## **1.2 Die Tenascin-Familie**

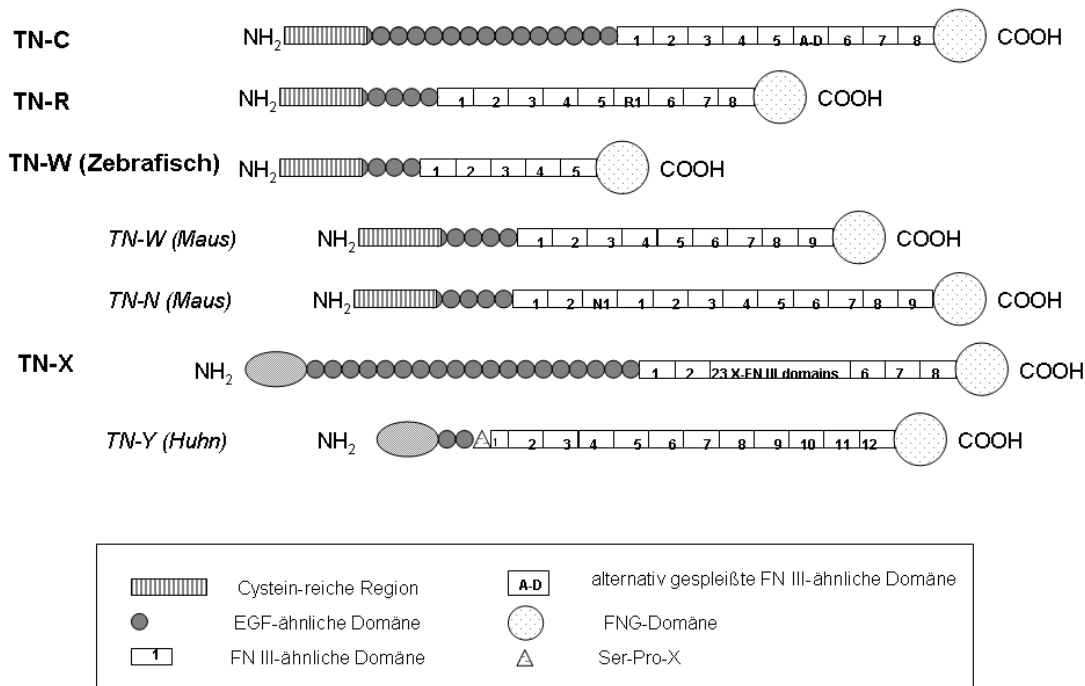
### **1.2.1 Historischer Hintergrund**

1984 entdeckten Kruse und Mitarbeiter nach immunaffinitätschromatographischen Aufreinigung von Glykoproteinen des adulten Nagergehirns ein bis dato unbekanntes Molekül mit einem Molekulargewicht von 160 kD (Kruse et al., 1984). Nachdem sie ein polyklonales Serum gegen das Molekül erzeugt hatten, fanden sie vier molekulare Komponenten von 220, 200, 180 und 160 kD und nannten sie J1 (Kruse et al., 1985). Die Immunreaktivität der J1-Antikörper mit verschiedenen molekularen Komponenten führte zu der Annahme, dass das J1-Glykoprotein in vier molekularen Formen erscheint, die während der Entwicklung unterschiedlich exprimiert werden (J1-220 und J1-200 früh, J1-180 und J1-160 spät). Auch Bourdon et al., Grumet et al. und Chiquet-Ehrismann et al. beschrieben ECM-Proteine in verschiedenen Spezies und Geweben, welche ähnliche molekulare Komponenten und eine ähnliche differentielle Expression aufwiesen, wie das J1-200/220-Glykoprotein (Bourdon et al., 1983; Chiquet-Ehrismann et al., 1986; Grumet et al., 1985). Es entstanden viele verschiedene Bezeichnungen für die entdeckten Proteine (Cytotactin, „myotendinous antigen“, Hexabrachion), darunter auch die Bezeichnung Tenascin (aus dem Griechischen für „der Erstgeborene“) von Chiquet-Ehrismann (Chiquet-Ehrismann, 1986). 1988 zeigten Faissner und Mitarbeiter die immunochemische Verwandtschaft von J1-200/220 der Maus mit Tenascin-Cytotactin (TNC) im Huhn (Faissner et al., 1988), während Pesheva und Kollegen 1989 die J1-160- und -180-Komponenten der Maus als verschiedene molekulare Spezies identifizierten, die nur im ZNS von OL, nicht aber von

Fibroblasten und Astrozyten exprimiert werden (Pesheva et al., 1989). Auch Rathjen und Mitarbeiter beschrieben ein ähnliches ECM-Protein im Hühner-Nervensystem und nannten es dank seines räumlich und zeitlich begrenzten Expressionsmusters Restrictin (Rathjen et al., 1991). Klonierung und Sequenzanalysen all dieser Proteine zeigten, dass sie Spezies-Homologe und strukturell mit TNC verwandt sind (Fuss et al., 1993; Nörenberg et al., 1992). Nach der Entdeckung eines dritten TNC-ähnlichen Proteins im Bindegewebe, welches TNX genannt wurde (Bristow et al., 1993), wurde klar, dass es sich um eine Genfamilie handelt, deren Mitglieder unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen (TNC, TNX früh während der Morphogenese und nicht beschränkt auf das ZNS, TNR hingegen ausschließlich im ZNS spät während der Entwicklung und im adulten Organismus). Erickson gab der Familie 1993 den von Chiquet-Ehrismann vorgeschlagenen Namen der Tenascine und das J1-160/180-Protein wurde in Tenascin-Restrictin (TNR) umbenannt (Erickson, 1993).

### 1.2.2 Struktur

Die Tenascin-Genfamilie von ECM-Glykoproteinen besteht, wie mittlerweile bekannt ist, aus vier verschiedenen Genen, die für vier Paraloge kodieren: TNC, TNR, TNX und TNW (Hsia und Schwarzbauer, 2005). Allen ist eine modulare Struktur gemeinsam, welche aus einer Cystein-reichen N-terminalen Region, gefolgt von einer variablen Anzahl von Epidermalemem Wachstumsfaktor(EGF)-ähnlichen (zusammen Cys-EGF) und FN III-ähnlichen Domänen (FN) und einer C-terminalen Region mit Homologien zu Fibrinogen (FNG) besteht. Jedes Familienmitglied hat charakteristische Variationen zwischen den verschiedenen Spezies bezüglich der Anzahl an EGF- und FN-Domänen (s. Abb. 5 S. 19). Bei allen Familienmitgliedern außer TNW können durch alternatives Spleißen in den FN-Domänen Isoformen gebildet werden. Nur von TNC werden allerdings Spleißvarianten in bedeutender Anzahl und Vielfalt exprimiert (Chiquet-Ehrismann, 2004; Jones und Jones, 2000). Die einzelnen Polypeptidketten sind am N-Terminus über Disulfidbrücken miteinander verbunden, um Di- und Trimere (TNR und TNX) und Hexamere (TNC) zu bilden. Dies geschieht über eine Domäne, die als Tenascin Assembly (TA) Domäne bezeichnet wird und aus der Cystein-reichen Region und drei bis vier  $\alpha$ -helikalen „heptad repeats“ besteht (Conway und Parry, 1991).



**Abb. 5 Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Tenascin-Familie**

Die einzelnen Mitglieder der Tenascin-Familie mit einer schematischen Darstellung ihrer Domänen, geordnet nach den TN-Hauptformen (Fett) und ihren Unterformen (kursiv, eingerückt). Der Ellipsenförmige N-Terminus bei TNX und TNY stellt die fehlende Cystein-reiche Region dar. Die alternativ gespleißten Domänen sind mit „A-D“ (TNC), „R1“ (TNR), „H1“ (TN-N) oder „23X-FNIII domains“ (TNX) bezeichnet. Nähere Erklärung im Text unter 2.2.4.

### 1.2.3 Allgemeine Funktion

Obwohl jedes Mitglied der Tenascin-Familie ein unterschiedliches Expressionsmuster aufweist, ist allen gemeinsam, dass ihre Genexpression während Entwicklung und Leben des Organismus streng reguliert wird. Alle Tenascine modulieren Zell-Matrix-Interaktionen, welche die Motilität, Proliferation und das weitere Verhalten von Zellen beeinflussen. Somit haben die Tenascine wichtige Funktionen nicht nur während der Entwicklung, sondern auch während pathologischer Zustände beim Erwachsenen. Tenascine sind keine klassischen Adhäsionsproteine wie z.B. FN. Statt dessen können sie zugleich adhäsiv und promigratorisch für den einen Zelltyp, aber genauso inhibitorisch für einen anderen sein. Umgekehrt kann der Effekt eines Tenascins auf eine einzelne Zelle variieren, abhängig unter anderem von dem Kontakt der Zelle mit anderen ECM-Komponenten (ausführliches Review bei Jones und Jones, 2000). Auch die einzelnen Domänen der Tenascin-Moleküle haben unterschiedliche funktionelle Eigenschaften (Lochter und Schachner, 1993; Prieto et al., 1992). Zelloberflächenrezeptoren für Tenascine sind Integrine, Zelladhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie, Phosphacan (ein CSPG), Glykolipide und Annexin-II. Die funktionellen Aktivitäten der Tenascin-Proteine können durch direkte

Interaktionen mit diesen Rezeptoren auftreten, oder indirekt durch Modulation anderer ECM-Proteine und Zelladhäsionsmoleküle.

## 1.2.4 Familienmitglieder

### 1.2.4.1 *Tenascin-C (TNC)*

TNC, welches das erste entdeckte Tenascin ist, stellt das am besten studierte Familienmitglied dar. Es kann klassifiziert werden als antiadhäsives oder adhäsionsmodulierendes ECM-Protein (Orend und Chiquet-Ehrismann, 2000) und ist das einzige Mitglied der Tenascin-Familie, das Hexamere formt, weshalb es unter anderem auch den Namen Hexabrachion erhielt (Erickson und Iglesias, 1984). Seine Größe ist aufgrund unterschiedlicher Glykosylierung der Untereinheiten zwar variabel (190 – 300 kD), liegt aber meist um 200 kD. TNC besteht aus der für die Tenascine typischen Domänenstruktur mit hier 13.5 (Huhn) und 14.5 (Maus und Mensch) EGF- und 8 FN-Domänen (s. Abb. 5 S.19), wobei durch alternatives Spleißen von 9 verschiedenen FN-Domänen eine variable Anzahl an Isoformen entstehen kann (Faissner, 1997). Somit hat TNC die größte Zahl und Diversität von Isoformen; 27 verschiedene mRNA-Varianten wurden bisher im sich entwickelnden Maushirn gefunden (Joester und Faissner, 1999). Im Embryo wird TNC während der neuronalen, skeletalen und vaskulären Morphogenese exprimiert (Chiquet und Fambrough, 1984) und verschwindet im adulten Organismus nahezu ganz; eine fortbestehende basale Expression ist dann nur noch in Sehnen-assoziierten Geweben nachweisbar. Eine starke Hochregulation erfährt das Protein allerdings in Geweben, welche Remodellierungsprozesse durchlaufen, wie z.B. bei Wundheilung, Neovaskularisierung, Entzündung, Tumorgenese (Hsia und Schwarzbauer, 2005). Seine morphoregulatorische Rolle während Entwicklung, Gewebeumwandlung und in pathologischen Situationen spielt es dabei, indem es die Zelladhäsion und die Signaleigenschaften von neuralen und nicht-neuralen Zellen reguliert. Neueren Beobachtungen zufolge blockiert TNC die *focal adhesion kinase* (FAK)- und Rho-vermittelten Signalwege, die durch FN aktiviert werden (Midwood et al., 2004; Wenk et al., 2000). Zudem stimuliert es Wnt und andere wachstumsfördernde Wege (Orend, 2005; Ruiz et al., 2004). Fast sämtliche Bindungsstellen für Zelloberflächenrezeptoren, PG, Zelladhäsionsmoleküle und ähnliche liegen in den FN-Domänen oder in der FNG-Domäne. Zusätzlich besitzt TNC ein HNK-1-Kohlenhydratepitop (Hoffmann et al., 1988) und hat starke Affinität für die C-terminalen Domänen von Aggrecan, Versican und Neurocan und, im Gegensatz zu TNR, eine schwächere Affinität für Brevican (Day et al., 2004). Eine ausführliche Beschreibung von TNC ist nachzulesen in Faissner et al., 1997.

#### **1.2.4.2 Tenascin-X (TNX)**

Ursprünglich wurde TNX 1993 von Bristow und Mitarbeitern als 400 kD-Protein entdeckt, das durch ein ungewöhnliches Gen namens XB im humanen MHCIII-Komplex kodiert wird. Es ist das größte Mitglied der Tenascin-Familie. TNX besteht aus 18,5 EGF- und nach Ansichten verschiedener Autoren (Bristow et al., 1993; Elefteriou et al., 1997; Hsia und Schwarzbauer, 2005; Ikuta et al., 1998) einer unterschiedlichen Zahl von FN-Domänen (s. Abb. 5 S.19). Auch hier folgt am Ende die C-terminale FNG-Domäne. TNX kann Trimere bilden (Bristow et al., 1993), unterscheidet sich allerdings von den anderen Familienmitgliedern dadurch, dass ihm die N-terminale Cystein-reiche Region fehlt, die eigentlich Teil der TA-Domäne und somit an der Multimer-Bildung beteiligt ist (Hsia und Schwarzbauer, 2005). TNX ist an vielen morphogenetischen Prozessen während der Organogenese beteiligt; im adulten Organismus ist seine Expression begrenzt auf muskuloskeletale, kardiale und dermale Gewebe. Somit stellt es eine prominente Komponente von Bindegewebe dar (Burch et al., 1995). TNX ist das erste Mitglied der Tenascin-Familie, dessen Defizienz klar mit einer pathologischen Funktionsstörung verbunden wurde und das somit eine klinische Relevanz hat. Da es eine wichtige Rolle bei der Fibrillenbildung des Kollagens spielt (Mao und Bristow, 2001), ist es mitverantwortlich für die Bindegewebskrankheit Ehlers-Danlos-Syndrom, welche mit Defekten von fibrillärem Kollagen assoziiert ist (Schalkwijk et al., 2001). Mehr zur klinischen Relevanz von TNX ist nachzulesen bei Matsumoto et al., 2004.

Ein enger Verwandter, der ein ähnliches Expressionsmuster hat, aber mit Untereinheiten von 170 – 220 kD kleiner ist und erheblich weniger EGF-Domänen hat, wurde von Hagios und Kollegen 1999 im Huhn identifiziert und als neues Tenascin-Paralog Tenascin-Y (TNY) genannt (Hagios et al., 1999). Innerhalb der FN III-Domänen besitzt es eine ungewöhnliche neue Domäne, die in einigen Varianten von TNY gefunden wurde und reich an Ser-Pro-X (X steht für irgendeine Aminosäure) ist (Jones und Jones, 2000). TNY wird vornehmlich im embryonalen Herz- und Skelettmuskel exprimiert; die selbe Arbeitsgruppe zeigte zudem, dass es auch im sich entwickelnden und adulten Vogel-Nervensystem vorkommt (Tucker et al., 1999). Mittlerweile ist man aufgrund der Ähnlichkeiten von TNX und TNY und aufgrund der Erkenntnisse der Arbeitsgruppe Tucker der Meinung, dass TNY ein Vogel-Ortholog von TNX und somit kein eigenständiges Mitglied der Tenascin-Familie ist (Chiquet-Ehrismann, 2004; Hsia und Schwarzbauer, 2005).

#### **1.2.4.3 Tenascin-W (TNW)**

Tenascin-W wurde 1998 von Weber und Mitarbeitern aus einer Zebrafisch-cDNA-Bank anhand seiner EGF-Domänen isoliert (Weber et al., 1998) und ist somit das jüngste und am

schlechtesten charakterisierte Mitglied der Tenascin-Familie. Es bildet Trimere von 130 kD-Untereinheiten, wobei sich jede Untereinheit aus der Cys-reichen N-terminalen Region, 3.5 EGF- und 5 FN-Domänen sowie der FNG-Domäne im C-Terminus zusammensetzt (s. Abb. 5, S.19). Bisher sind keine durch alternatives Spleißen entstandene Isoformen bekannt. TNW wird während der Embryogenese von migrierenden Zellen sklerotomaler Herkunft und Zellen der Neuralleiste in einer Art und Weise ähnlich der von TNC exprimiert (Weber et al., 1998). Kürzlichen Berichten zufolge wurden mögliche Säuger-Orthologe identifiziert: TNW und TNN in der Maus (Neidhardt et al., 2003; Scherberich et al., 2004). Eventuell handelt es sich dabei um redundante Mechanismen bei Säugern, da es bei Mäusen, denen andere Mitglieder der Tenascin-Familie fehlen, nach derzeitigen Erkenntnissen nicht zu einem dramatisch veränderten Phänotyp kommt (Scherberich et al., 2004).

### **1.3 Tenascin-R (TNR)**

#### **1.3.1 Struktur**

Im Gegensatz zu anderen Tenascinen wird TNR, auch bekannt unter den Namen J1-160/180, Janusin und Restrictin (Pesheva und Probstmeier, 2000), im ZNS verschiedener Vertebraten zu späteren Entwicklungsstadien exprimiert (Chiquet-Ehrismann, 2004). Obwohl Carnemolla und Kollegen 1996 zeigten, dass die TNR-mRNA ausschließlich im ZNS nachzuweisen ist (Carnemolla et al., 1996), berichteten Probstmeier und Mitarbeiter 2001 zusätzlich von einer TNR exprimierenden Zelllinie, die aus dem PNS hervorgeht (Probstmeier et al., 2001). Auch bei TNR findet sich die für die Tenascine charakteristische Domänenstruktur: Cystein-reiche N-terminale Region, gefolgt von 4.5 EGF- und 8-9 FN-Domänen und dem FNG-Modul am C-Terminus (Fuss et al., 1993; Pesheva und Probstmeier, 2000) (s. Abb. 5 S. 19). Im Säuger-ZNS erscheint das Protein in zwei Formen von 160 (TNR 160) und 180 kD (TNR 180). Am N-Terminus sind die TNR-Polypeptidketten über Disulfidbrücken verbunden (Pesheva et al., 1989) und bilden so Homotrimere (TNR 180) und –dimere (TNR 160). TNR 160 entsteht durch proteolytische Spaltung nahe des N-Terminus aus TNR 180 (Woodworth et al., 2004). Sequenzanalysen von TNR im Huhn (Nörenberg et al., 1992), in der Ratte (Fuss et al., 1993) und später im Menschen (Carnemolla et al., 1996) zeigten die strukturelle Verwandtschaft der beiden Moleküle untereinander und zu TNC. Zudem wurde gezeigt, dass die TNR-Sequenz phylogenetisch hoch konserviert ist (Homologien der Aminosäuresequenzen: Huhn/Ratte 80%, Mensch/Huhn 75%, Mensch/Ratte 93%).

TNR enthält viele potentielle Stellen für N- und O-Glykosylierung; 10 – 20% seines Gewichtes machen Kohlenhydrate aus (Fuss et al., 1993; Pesheva et al., 1989). Das Protein kann mit drei

verschiedenen sulfatierten Oligosaccharidstrukturen modifiziert sein: HNK-1 ( $\text{SO}_4$ -3-GlcUA $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc; Kruse et al., 1985), GalNAc-4- $\text{SO}_4$  ( $\text{SO}_4$ -4-GalNAc $\beta$ 1,4GlcNAc; Woodworth et al., 2004) und CS (Probstmeier et al., 2000a). Die Synthese dieser drei sulfatierten Strukturen wird während der postnatalen Entwicklung des Kleinhirns unterschiedlich reguliert. Das Expressionsniveau von HNK-1 steigt und fällt parallel zu dem von TNR. Im Gegensatz dazu wird das Expressionsniveau von GalNAc-4- $\text{SO}_4$  unabhängig vom TNR-Level reguliert; es steigt spät während der Kleinhirnentwicklung und bleibt bis ins Erwachsenenalter konstant (Woodworth et al., 2004). Zusätzlich zu den sulfatierten Kohlenhydraten trägt TNR eine Fülle von O-gebundenen sialylierten Glykanen, v.a. NeuAca2-3Gal $\beta$ 1-3(NeuAca2-6)GalNAc und „brain-type“ neutrale N-Glykane (Zamze et al., 1999). Außerdem exprimiert es niedrige Mengen von CS-GAG. Da die Modifikation von TNR mit CS-GAG zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien und in verschiedenen ZNS-Kompartimenten sehr variabel ist, wurde TNR von Probstmeier und Kollegen (2000a, b) als „part time CSPG“ definiert.

### 1.3.2 Gewebeverteilung während Entwicklung und Pathologie

TNR wird im sich entwickelnden und adulten ZNS von OL und einigen Neuronen (i.e. Interneuronen und Motorneuronen) exprimiert (Bartsch et al., 1993; Nörenberg et al., 1996; Pesheva et al., 1989). Große Mengen an TNR-Protein und -mRNA sind nachweisbar während der Migration von OL-Vorläuferzellen und in der Phase aktiver Myelinisierung. Während dieser Prozesse findet eine Induktion der TNR-Expression in den beteiligten neuronalen Zellen statt. Während der neuronalen Reifung, i.e. während der ersten zwei bis drei postnatalen Wochen beim Säuger, akkumuliert TNR in perineuronalen Netzen von Inter- und Motorneuronen, oft in Kolo-kalisation mit TNC (Pesheva und Probstmeier, 2000). In Kulturen von frühpostnatalem Nagerhirn (Jung et al., 1993; Pesheva et al., 1989, 1997) und optischem Nerv (Bartsch et al., 1993) wird TNR von OL-Vorläuferzellen und Typ 2-Astrozyten exprimiert und stellt somit einen Marker für O-2A-(OL-Typ-2-Astrozyten-) Zellen dar. Nach Beendigung der Myelinisierung werden sowohl das Protein- als auch das mRNA-Expressionsniveau auf niedrigere adulte Werte herunterreguliert (Pesheva et al., 1989). TNR ist dann vor allem assoziiert mit der Oberfläche von OL, myelinisierten Axonen, synapsenreichen Regionen, perineuronalen Netzen (Dityatev et al., 2007) und Ranvier'schen Schnürringen. Die TNR-Expression durch Neurone wird im adulten Organismus nicht herunterreguliert (Fuss et al., 1993). Auch in humanen Gliomzellen findet sich eine Expression von TNR, welches für die Sequenzierung der humanen TNR-Sequenz verwendet wurde (Carnemolla et al., 1996).

Bei der Regulation der TNR-Expression während pathologischer Zustände (durch verschiedene Verletzungsmodelle untersucht), deuten sich bereits die unterschiedlichen funktionellen

Eigenschaften des Moleküls an, wie etwa die neuroprotektive Rolle gegenüber aktivierter Mikroglia oder die inhibitorische Wirkung auf das axonale Wachstum. Nach Verletzung des N. facialis wird TNR im korrespondierenden motorischen Hirnstammkern herunterreguliert. Dieser Vorgang ist reversibel nach einer Nervennaht und irreversibel nach einer Nervenresektion (Angelov et al., 1998). Die Herunterregulation des Proteins fällt zusammen mit dem Erscheinen und der Migration von aktivierter Mikroglia in den verletzten Nukleus. Diese mikroglialen Zellen binden nur an die Stellen der Motoneurone, an denen kein TNR nachweisbar ist. Erst kürzlich wurde berichtet, dass diese Modulation das Ergebnis eines koordinierten Einflusses der EGF- und FN-Domänen von TNR auf Mikroglia-rezeptoren sein könnte (Liao et al., 2005). Zudem gab der Befund Angelov und Mitarbeitern zu der Vermutung Anlass, dass das Protein eine Rolle bei der neuronalen Protektion spielt (Angelov et al., 1996). Ein weiteres Modell zeigt, dass TNR nach Transsektion des postcommissuralen Fornix bei der adulten Ratte an der Verletzungsstelle stabil hochreguliert wird, weshalb sein Beitrag zur Inhibition des axonalen Wachstums und zur Bildung einer astroglialen Narbe postuliert wurde (Probstmeier et al., 2000a). Im Gegensatz zu seiner Hochregulation im Säuger wird TNR nach Quetschung des N. opticus beim Salamander an der Verletzungsstelle herunterreguliert. Dies korreliert mit dem dortigen Wiederauswachsen von Axonen. Mit fortschreitender Myelinisierung der regenerierten Axone wird TNR sukzessive wieder hochreguliert (Becker et al., 1999). Da aus dem Maushirn stammende oder rekombinante Proteine das Neuritenwachstum aus amphibischen retinalen Explantaten *in vitro* hemmen, diskutieren Becker und Kollegen, dass eine erfolgreiche axonale Regeneration im amphibischen N. opticus nach einer Verletzung dank dem Entfernen inhibitorischer Moleküle wie etwa TNR oder einzelnen TNR-Molekülteilen stattfinden könnte. Eine neue Phylogenese studie belegt, dass Fisch-TNR-Proteine im Gegensatz zu denen höherer Vertebraten nicht abweisend für Fisch- und weniger abweisend für Säuger-Neurone sind (Pesheva et al., 2006). Säuger-TNR hingegen löst in Fischneuronen eine axonale Repulsion aus. Demzufolge spielt bei der Regenerationspotenz des ZNS niederer Vertebraten nicht das Entfernen inhibitorischer Moleküle eine entscheidende Rolle, sondern die Moleküle scheinen bei niederen Vertebraten so verändert, dass sie nicht oder kaum inhibitorisch wirken.

Diese Beobachtungen deuten bereits die Vielseitigkeit des Moleküls an, welches, *in vitro* als Substrat angeboten, als (i) adhäsives oder antiadhäsives Molekül gegenüber verschiedenen neuronalen und nichtneuronalen Zellen und (ii) als Inhibitor oder Verstärker des axonalen Wachstums agiert (Goodman, 1996; Song und Poo, 1999). Die unterschiedlichen Funktionen von TNR sollen im Folgenden ausführlicher behandelt werden.



### 1.3.3 Antiadhäsive Eigenschaften

In vitro Experimente zeigten, dass substratgebundenes TNR keine Langzeitadhäsion von frühpostnatalen Kleinhirnneuronen der Maus unterstützt. Wenn es in einer Mischung mit adhäsiven Substraten angeboten wurde, verursachte das Protein eine Ablösung der Neurone und eine starke Faszikulierung ihrer Neuriten (Pesheva et al., 1989, 1991). Zudem fand man heraus, dass das Protein das axonale Wachstum von permissiven Substraten heraus in TNR-haltige Substratgebiete inhibiert. In den Wachstumskegeln der Axone erfolgt beim Auftreffen auf eine solche molekulare Barriere eine Vermeidungsreaktion (Pesheva et al., 1993; Taylor et al., 1993). Kinetische Studien der neuronalen Zelladhäsion zeigten, dass Neurone anfangs an substratgebundenes TNR oder an TNR exprimierende OL binden, nach einiger Zeit aber die anfängliche Erkennung in ein Ablösen der neuronalen Zellen umschlägt (Morganti et al., 1990; Pesheva et al., 1993).

Der inhibitorische Effekt von TNR gegenüber verschiedenen ZNS-Neuronen ist unabhängig von den anwesenden adhäsiven Substraten und auf molekularer Ebene vermittelt durch die Interaktion mit den Ig-ähnlichen Domänen (Ig2-3) des neuronalen GPI-verankerten Proteins F3/Contactin (Brümmendorf et al., 1993; Pesheva et al., 1993; Xiao et al., 1997). F3/Contactin wird vorzugsweise axonal exprimiert und nimmt an der Kontrolle von Axonwachstum und – lenkung teil (Brümmendorf und Rathjen, 1995). Die Bindungsstelle für F3/Contactin befindet sich innerhalb der EGF-Domänen bei Ratten-TNR (Xiao et al., 1996) und in den FN-Domänen 2-3 von Hühner-TNR (Brümmendorf et al., 1989; Nörenberg et al., 1995). Wo sich die Bindungsstelle im humanen TNR befindet, ist zu Zeit noch nicht bekannt. Die F3/Contactin-gesteuerte Inhibition des axonalen Wachstums könnte auch im verletzten adulten ZNS eine Rolle spielen. Der abweisende Stimulus, der durch die Konfrontation von F3/Contactin exprimierenden regenerierenden Axonen am Läsionsort mit von OL exprimiertem TNR verursacht wird (Probstmeier et al., 2000a), könnte zu der verminderten regenerativen Kapazität des ZNS höherer Vertebraten beitragen.

F3/Contactin ist aber nicht der einzige neuronale Zellrezeptor, der an TNR-induzierten hemmenden Prozessen beteiligt ist. Wie die meisten anderen ECM-Glykoproteine hat TNR viele Zellbindungsstellen, welche die initiale neuronale Zelladhäsion und/oder die darauf folgende Repulsion vermitteln (Tabelle 1, S. 28), was unter anderem durch Zelladhäsions- und Neuritenwachstumsstudien mit definierten (nicht humanen) rekombinanten Fragmenten des Moleküls gezeigt werden konnte. Solche Zellbindungsstellen befinden sich demnach in den Domänen FN 8 (für retinale Zellen des Hühnerembryos), FN2-5, FN6-8 und FNG (für Tektum-Zellen des Hühnerembryos) und FN1-2, FN6-8 und FNG (für postnatale Kleinhirnneurone der

Maus) (Nörenberg et al., 1996; Volkmer et al., 1998; Xiao et al., 1996). Im Gegensatz zu der antiadhäsiven Wirkung von TNR in Verbindung mit F3/Contactin ist jene mit anderen neuronalen und nicht-neuronalen Zelltypen (wie diversen Fibroblasten-ähnlichen und neoplastischen glialen Zellen, OL-Vorläufern und anderen) abhängig von adhäsiven ECM-Molekülen. Wird TNR in vitro als gemischtes Substrat angeboten, inhibiert es selektiv die FN-vermittelte Zelladhäsion und das Neuritenauswachsen (Pesheva et al., 1994; Probstmeier et al., 1999). Die Interaktionen der oben genannten Zellen mit FN werden vermittelt über Zelloberflächen-PG auf der einen und Integrine auf der anderen Seite (Pesheva und Probstmeier, 2000). Der inhibitorischen Wirkung von TNR bezüglich dieser Interaktionen liegen zwei molekulare Mechanismen zu Grunde. Zum einen interagiert TNR mit FN (i.e. den Heparin/PG- und Integrin-bindenden Fragmenten von FN), was zu einer sterischen Hinderung und/oder einer Konformationsänderung der Zellbindungsstellen des Moleküls führt. Zum anderen interagiert TNR mit Zelloberflächen-Disialogangliosiden (wie GD2 und GD3), was intrazelluläre Signalkaskaden anregt, welche die Phosphorylierung der FAK beeinträchtigen und zu einer Inhibition der Integrin-abhängigen Zelladhäsion auf FN führen (Probstmeier et al., 1999). TNR beeinflusst hier das Zellverhalten aber nicht, wenn es in Kombination mit adhäsiven ECM-Molekülen wie LN angeboten wird.

Die verminderte Regenerationskapazität des ZNS höherer Vertebraten ist zum Großteil mit der Präsenz regenerationshemmender Moleküle verbunden, die von Gliazellen produziert werden. Im Rahmen der bereits oben beschriebenen phylogenetischen Funktionsanalysen von TNR im ZNS von Vertebraten (Pesheva et al., 2006) konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass TNR im ZNS niederer Vertebraten (auch nach einer Läsion) exprimiert wird, dort aber, im Gegensatz zu den Säugerproteinen, keine inhibitorische Wirkung auf retinale Fisch-Axone und keinen Einfluss auf die F3/Contactin-vermittelte Zelladhäsion und das Axonwachstum von Säugerzellen hat. Neuere Arbeiten konnten zeigen, dass TNR-defiziente Mäuse schwere kognitive Störungen und Defizite bei der Bewegungskoordination zeigen (Montag-Sallaz und Montag, 2003) und eine verstärkte neuronale Erregbarkeit in Kortex und Hippocampus aufweisen (Gurevicius et al., 2004). TNR hat somit auch eine wichtige Funktion bei der Synapsen- und damit Gedächtnisbildung. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass sich die Funktionen von TNR nicht nur auf die am besten studierten Eigenschaften der Antiadhäsion und Adhäsion beschränken lassen, sondern dass sie noch vielfältiger sind, als bis vor kurzem angenommen.

#### **1.3.4 Adhäsive Eigenschaften**

Im Gegensatz zu seinen antiadhäsiven Eigenschaften gegenüber Neuronen und mikroglialen Zellen stellt TNR für die Gliazellen des ZNS ein adhäsives Substrat dar. Es wurde gezeigt, dass TNR die Bindung, nicht aber die stabile Adhäsion von Astrozyten unterstützt (Pesheva et al.,

1989). Ansonsten ist die TNR-Expression eng assoziiert mit O4/Sulfatid<sup>+</sup> OL und Sulfatiden, die relativ früh während der Vertebraten-Entwicklung in Verbindung mit Myelin erscheinen (Bartsch et al., 1993; Kishimoto, 1986; Pesheva et al., 1989). TNR fördert hier die Adhäsion und Fortsatzbildung von O4/Sulfatid<sup>+</sup> OL unabhängig von deren Alter und Abstammung (Pesheva et al., 1997). Dieser Prozess wird einerseits vermittelt durch membranassoziierte Sulfatide, wie durch die Hemmung der Bindung von OL an TNR-Substrate durch den O4-Antikörper (der Sulfatide erkennt; Bansal et al., 1989) und Sulfatide gezeigt werden konnte (Pesheva et al., 1997). In dieser Hinsicht könnte die Fähigkeit von TNR, (i) die Integrin-abhängige Adhäsion von OL-Vorläuferzellen durch einen Disialogangliosid-vermittelten Signalmechanismus zu modulieren (Probstmeier et al., 1999) und (ii) die OL-Adhäsion in einer O4/Sulfatid-abhängigen Art und Weise zu unterstützen (Pesheva et al., 1997), einen alternativen molekularen Mechanismus liefern, der die Migration der ersten GD3<sup>+</sup> OL-Vorläufer im Gehirn reguliert oder die endgültige Positionierung der OL und deren terminale Differenzierung in myelinbildende Zellen bestimmt. Eine weitere wichtige Folge der TNR-Interaktion mit Sulfatid exprimierenden OL ist die Stimulation ihrer Reifung, i.e. Hochregulation der Expression von TNR selbst, Glykolipiden und Myelinproteinen wie MBP („Myelin Basic Protein“), MAG („Myelin Associated Glykoprotein“) und PLP („Proteolipid Protein“), was einen autokrinen, TNR-induzierten und Sulfatid-vermittelten Mechanismus der OL-Differenzierung vermuten lässt (Pesheva et al., 1997). Dies lässt sich mit der Beobachtung vereinen, dass (i) TNR-mRNA und –Protein reichlich in der weißen Substanz während der Myelinisierung vorhanden sind (Fuss et al., 1993; Pesheva et al., 1989) und (ii) in vitro O4<sup>+</sup> Vorläuferzellen komplett auf eine terminale Differenzierung ausgerichtet sind, ohne dass andere Zelltypen anwesend sind (Gard und Pfeiffer, 1989). Eine durch Sulfatide vermittelte adhäsions- und differenzierungsfördernde Wirkung des Moleküls auf OL ist phylogenetisch hoch konserviert (Pesheva et al., 2006). Andererseits ist vermutlich auch die Interaktion mit F3/Contactin an diesem Effekt beteiligt (Hu et al., 2003). Die Migration von OL-Vorläuferzellen wird vermutlich ebenfalls reguliert durch TNR-gebundene CS-GAG, was einen zusätzlichen Mechanismus für die Migrationskontrolle darstellt, bei dem die differentielle Glykosylierung von ECM-Proteinen eine Rolle spielt (Probstmeier et al., 2000a).

Die adhäsiven Eigenschaften von TNR gegenüber OL macht sich ein kürzlich von Prof. P. Pesheva entwickeltes und zum Patent angemeldetes Verfahren zunutze, mit der über ein Einschnittverfahren OL selektiv aus Hirngewebe aufgereinigt werden können. Bisher ließen sich OL nur über relativ komplizierte und langwierige Verfahren gewinnen, wobei zum Beispiel Gehirnzellen unter definierten Kulturbedingungen gehalten werden, wodurch es nach zwei Wochen zur Ausbildung eines homogenen, primär aus Astrozyten, aber auch Mikroglia und OL bestehenden Zellrasens kommt. Durch unterschiedlich starke mechanische Belastung lassen

sich zuerst die Mikrogliazellen, dann die OL von der Astrozytenunterlage ablösen. Andere Aufreinigungsverfahren beruhen auf dem Prinzip des Immunopannings oder der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung. Diese komplexen Verfahren werden durch die Verwendung einer TNR-beschichteten Oberfläche deutlich vereinfacht: Werden auf eine solche Oberfläche Gehirnzellen aufgebracht, haften an diese nach nur eintägiger Kulturzeit ausschließlich OL. Diese Interaktion hat zusätzlich noch eine differenzierungsfördernde Wirkung. Diese Erfindung bildete die Basis für die Gründung der Firma Heraclitus Biosciences, R. Probstmeier & P. Pesheva, Klinik für Nuklearmedizin, Universitätsklinikum Bonn.

Zelluläre Rezeptoren	Bindungsdomäne	ECM-Liganden	Bindungsdomäne
F3/Contactin	EGF-L, FN2-3	FN	CS GAG, unbekannt
$\beta$ -Untereinheit von Natriumkanälen	FN1-2, FN6-8	Kollagene	unbekannt
Neurofascin	FN2-5	TN-C	CS GAG, $Ca^{2+}$ -abhängig
CALEB	FNG	TN-R	unbekannt, abhängig von divalenten Kationen
MAG	EGF-L, FNG	Lektikane	FN3-5, $Ca^{2+}$ -abhängig
Sulfatide	unbekannt	Phosphacan	EGF-L, $Ca^{2+}$ -abhängig
Ganglioside	unbekannt		

**Tabelle 1**

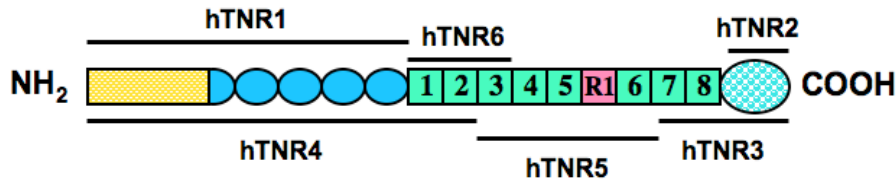
Bindungsstellen für zelluläre Rezeptoren und ECM-Liganden auf TNR. EGF-L, Cys-EGF-Domänen; CALEB, chicken acidic leucine-rich EGF-like domain containing brain protein Nach: Pesheva und Probstmeier, 2000.

#### 1.4 Voraussetzungen und Ziele der Arbeit

Die in Phylogenese Studien (Pesheva et al., 2006) erarbeiteten Befunde über die strukturelle und funktionelle Verwandtschaft des humanen TNR mit TNR-Proteinen anderer Säuger sind hinsichtlich der funktionellen Kartierung und Relevanz des Moleküls in Bezug auf die axonale Regeneration und (Re)Myelinisierung im humanen ZNS von besonderer Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit sollten erstmalig relevante Bindungsstellen für Liganden und funktionell aktive monoklonale TNR-Antikörper auf dem humanen Protein mit Hilfe eukaryotisch exprimierter rekombinanter Proteinfragmente identifiziert und funktionell charakterisiert werden. Ein besonderes Augenmerk sollte hierbei der Klärung der Bindungsstellen (i) für neuronale Rezeptoren, die die repulsive/inhibitorische Wirkung von TNR auf neuronale Zellen vermitteln (i.e. F3/Contactin), einerseits, und (ii) solcher, die für die Wirkung von TNR auf OL als selektives Substrat und insbesondere als Differenzierungsfaktor verantwortlich sind (i.e. Sulfatide, F3/Contactin), andererseits gelten. Zusätzlich sollten die Bindungsstellen der monoklonalen TNR-Antikörper, welche - wie bereits gezeigt werden konnte - die Wirkung von TNR auf neurale Zellen hemmen, bestimmt und relevanten Liganden-Interaktionen oder biologischen Funktionen von TNR zugeordnet werden.

Das humane TNR-Molekül wurde von Heraclitus Biosciences in sechs Fragmente unterteilt (s. Abb. 6). Diese wurden so gewählt, dass sie bereits postulierte Bindungsstellen für verschiedene zelluläre Rezeptoren und ECM-Liganden enthalten.



**Abb. 6 Domänenstruktur des humanen TNR und Position der einzelnen Fragmente**

- hTNR1: Cys-EGF
- hTNR2: FNG
- hTNR3: FN7-8 + FNG
- hTNR4: Cys-EGF + FN1-2
- hTNR5: FN3-6
- hTNR6: FN1-3

In der vorliegenden Arbeit sollten in einem ersten Teil die Fragmente hTNR1, hTNR2 und hTNR3 hergestellt und anschließend in einem zweiten Teil proteinbiochemisch und funktionell charakterisiert werden. Diese Fragmente wurden entsprechend der Domärentypen von TNR ausgewählt, die potentielle Bindungsstellen für F3/Contactin (hTNR1; für Ratten-TNR bereits beschrieben durch Xiao et al., 1996) und Sulfatide (hTNR2 und hTNR3) in einzelnen oder überlappenden Fragmenten enthalten (s. Abb. 6). Dass in den Fragmenten hTNR2 und hTNR3 eine potentielle Sulfatid-Bindungsstelle enthalten ist, wurde von Heraclitus Biosciences aufgrund von Sequenzhomologien innerhalb der FNG-Domäne von TNR mit der Sulfatid-Bindungsstelle von Laminin vermutet (Timpl et al., 2000; Li et al., 2005).

Dies ist der erste Versuch einer funktionellen Kartierung des humanen TNR über die Herstellung rekombinanter Proteinfragmente in humanen Expressionssystemen, die eine Anbindung an biomedizinische Anwendungsmöglichkeiten erlauben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Primer

Primer	Sequenz	Accession-No.	Produktgröße
hTNR1	UP: 5' TCC ATG ATC AAG CCT TCA GAG TG 3' DO: 5' AGG GGC AAC TGC TGA GCA GT 3'	NM_003285	915 bp
hTNR2	UP: 5' ATC ACC TCC ACC GCT TTC ACC 3' DO: 5' GAA CTG TAA GGA CTG CCG TTT TCT3'	NM_003285	717 bp
hTNR3	UP: 5' GTG CAC ACA GCC ATG GAC AA 3' DO: 5' GAA CTG TAA GGA CTG CCG TTT TC 3'	NM_003285	1230 bp
human $\beta$ -actin	UP: 5' GAT TCC TAT GTG GGC GAC GAG 3' DO: 5' CCA GAC GCA GGA TGG CAT GG 3'	NM_001101	384 bp
human Contactin	UP: 5' GAG CGT GTT CAG CAA ATT CA 3' DO: 5' CCC CAG AGG TGC TAA TCT CA 3'	NM_001843	214 bp

Alle Primer wurden von Invitrogen bezogen.

#### 2.1.2 Vektoren und Plasmide

Bezeichnung	Zusammensetzung / Vektorkarte	Bezugsquelle
pFRT/lacZeo	s. 1.3.1.	Invitrogen
pOG44	s. 1.3.1.	Invitrogen
pSecTag/FRT/V5-His TOPO <sup>®</sup> TA	s. 1.3.1.	Invitrogen
hTNR1	TNR-Nukleotide 151-1050 kloniert in pSecTag/FRT/V5-His TOPO <sup>®</sup> TA	Heraclitus Biosciences
hTNR2	TNR-Nukleotide 3463-4155 kloniert in pSecTag/FRT/V5-His TOPO <sup>®</sup> TA	Heraclitus Biosciences
hTNR3	TNR-Nukleotide 2935-4155 kloniert in pSecTag/FRT/V5-His TOPO <sup>®</sup> TA	Heraclitus Biosciences

#### 2.1.3 Antibiotika, Enzyme, Kits

Substanz / Kit	Bezugsquelle
Ampicillin	ICN MP Biomedicals
Hygromycin B	Invitrogen und InvivoGen
Zeocin	Invitrogen
Desoxyribonuklease (DNase)	Promega
Reverse Transkriptase (Superscript II)	Invitrogen
Ribonuklease (RNase)	Promega
GoTaq-Polymerase	Promega
Trypsin	PAA
Accutase	PAA
N-Glykosidase F	Roche Diagnostics
Superscript <sup>™</sup> First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen
TOPO TA Cloning <sup>®</sup> Kit	Invitrogen
Midipräp-Kit	Qiagen
Protein Assay	BioRad
SilverSNAP <sup>®</sup> Stain Kit	Pierce
ECL-Detection Kit	Pierce
SureFIRE <sup>™</sup> HRP Conjugation Kit	KPL

### 2.1.4 Antikörper und Lektine

primäre Antikörper / Lektine	Antigen	Spezies	Bezugsquelle / Referenz
mAb R1	TNR	Maus IgG	Pesheva et al., 1989
mAb R2	TNR	Maus IgG	Pesheva et al., 1989
mAb R3	TNR	Maus IgG	Pesheva et al., 2006
mAb R4	TNR	Maus IgG	Heraclitus Biosciences
mAb R5	TNR	Maus IgG	Pesheva et al., 2006
mAb R6	TNR	Maus IgG	Heraclitus Biosciences
$\alpha$ -His-HRP	6x His-COOH	Maus IgG	Invitrogen
$\alpha$ -V5	V5-Epitop	Maus IgG	Sigma-Aldrich
$\alpha$ -HNK-1	HNK-1-Kohlenhydrat	Maus IgM	Sigma-Aldrich
CS-56	CS-GAG	Maus IgM	Sigma-Aldrich
O4	Sulfatide	Maus IgM	Pesheva et al., 1997
$\alpha$ -MBP	MBP	Ratten IgG	Biozol
$\alpha$ -F3	F3/contactin	Kaninchen IgG	Pesheva et al., 1993
$\alpha$ -NCAM	NCAM	Kaninchen IgG	Pesheva et al., 1993
Lens culinaris Lektin (LCL)	terminale $\alpha$ -D-Mannose- / Glukose	Lens culinaris	Sigma-Aldrich
DIG Glykan Differentiation Kit	verschiedene Kohlenhydrat-Strukturen	pflanzliche Lektine	Roche Diagnostics
<b>sekundäre Antikörper</b>			
$\alpha$ -mouse-AP	Maus IgG	Ziegen IgG	Promega
$\alpha$ -mouse-HRP	Maus IgG	Ziegen IgG	Promega
$\alpha$ -rat-HRP	Ratten IgG	Ziegen IgG	Promega
$\alpha$ -rabbit-HRP	Kaninchen IgG	Ziegen IgG	Promega
$\alpha$ -mouse-Biotin	Maus IgG	Ziegen IgG	Chemicon
$\alpha$ -mouse-Cyanin 3	Maus IgG	Ziegen IgG	Chemicon
$\alpha$ -rat-Alexa 488	Ratten IgG	Ziegen IgG	Invitrogen
$\alpha$ -rat-Biotin	Ratten IgG	Ziegen IgG	Chemicon
Streptavidin-HRP	Biotin	Streptomyces avidinii	DakoCytomation

### 2.1.5 ECM-Moleküle und Glykolipide

Substanz	Quelle	Bezugsquelle
Fibronectin (FN)	Humanes Plasma	Harbor Bio-Products
Laminin (LN)	Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma	Sigma-Aldrich
Rinder-Serumalbumin (BSA)	Rinderserum	Sigma-Aldrich
BSA, lipidfrei (BSA-LF)	Rinderserum	Sigma-Aldrich
Maus TNR	Maus-Gehirn	Pesheva et al., 2006
Poly-D-Lysin (PDL)		Sigma-Aldrich
Poly-L-Lysin (PLL)		Sigma-Aldrich
Sulfatide	Rinderhirn	Sigma-Aldrich

### 2.1.6 Häufig verwendete Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium	1% (w/v) Trypton (Gibco, Großbritannien), 0.5% (w/v) Hefeextrakt (Gibco), 1% (w/v) NaCl, pH 7.0
TAE-Puffer	40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8.0
Nukleinsäure-Probenpuffer	6% (v/v) Glycerin, 50 mM EDTA, 0.001% (w/v)

	Bromphenolblau, 0.001% (w/v) Xylenxyanol
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	1.5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2.5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 150 mM NaCl, pH 7.4
Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)	25 mM 2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol (Tris), pH 7.4, 135 mM NaCl, 25 mM KCl
SDS-Probenpuffer	50 mM Tris, pH 6.8, 6% (v/v) Glycerin, 1.5% (w/v) SDS, 0.2% (v/v) β-ME, 0.05% (w/v) Bromphenolblau
SDS-PAGE-Laufpuffer	1.44% (w/v) Glycin, 0.303% (w/v) Tris, 0.1% (w/v) SDS
Anodenpuffer I für Western Blot	0,3M Tris, pH 10.4, 20% Methanol
Anodenpuffer II für Western Blot	25mM Tris, pH 10.4, 20% Methanol
Kathodenpuffer für Western Blot	25 mM Tris, 40 mM 6-amino-capronsäure), pH 9.2, 20% Methanol
Ponceau-S-Lösung	0.2% in 0.3% Essigsäure (w/v)
Immunoblot Inkubationspuffer	1% Milchpulver, TBS, 0.05% Tween 20 oder 1% Milchpulver, 1x TBS
Immunoblot Waschpuffer	TBS, 0.05% Tween 20 oder 1x TBS
ELISA Blockierungspuffer	2% BSA in PBS oder 2% BSA-LF in PBS, hitzeinaktiviert (BSA-LF-PBS h.i.)
ELISA Inkubationspuffer	1% BSA in PBS, 0.05% Tween 20 oder 1% BSA-LF-PBS h.i.
ELISA Waschpuffer	PBS, 0.05% Tween 20 oder 1x PBS
ELISA Acetatpuffer	0.1M CH <sub>3</sub> COONa, 0.05M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O (auf pH 4.2 eingestellt mit CH <sub>3</sub> COOH)
ELISA Entwicklungslösung	19 ml Acetatpuffer, 1 ml 36 mM ABTS, 5,7 µl 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
ELISA Stopplösung	0.6% SDS in H <sub>2</sub> O
Inkubationspuffer für Immunfluoreszenz	10% Fötales Kälberserum (FCS) in DPBS (Dullbeco's modified PBS)

### 2.1.7 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Sofern nicht anders aufgeführt, wurden anorganische und organische Chemikalien und Lösungsmittel von den Firmen Fluka, MP Biomedicals, Merck oder Sigma-Aldrich bezogen. Es wurden ausschließlich Produkte vom Reinheitsgrad p.A. oder höher verwendet.

Nicht gesondert aufgeführte Produkte für die Molekularbiologie sowie Primer wurden von Invitrogen bezogen.

Reaktionsgefäße, Kulturflaschen, Petrischalen, Pipetten und andere Plastikmaterialien wurden, wenn nicht anders aufgeführt, von den Firmen Sarstedt, Nunc und Greiner bezogen.

### 2.1.8 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Bakterienschüttler	Certomat	B. Braun Biotech
Blotkammer	Semi-dry electroblotting unit Z34,050-2	Sigma-Aldrich
Brutschrank	CB 150	Binder
Digitalkamera	AxioCam	C. Zeiss
ELISA-Reader	Milenia Kinetic Analyser	DPC
Filmentwickler	X-Omat 5000RA	Kodak



Gelelektrophoresekammer für die SDS-PAGE	Multigel G44	Biometra
Gelelektrophoresekammer für die Nukleinsäure-Gelelektrophorese	GNA 100	Pharmacia Biotech
Heizblock	Uniteq HB 130	Peqlab
Mikroskop	Axiovert 200	C. Zeiss
pH-Meter	MP 220	Mettler Toledo
Photometer	GeneQuant	Pharmacia Biotech
Power Supply	E844	Consort
Power Supply	EPS 600	Pharmacia Biotech
Reinstwasseranlage	Milli-Q Biocel	Millipore
Thermocycler	PTC-200	MJ Research
Wasserbad	E100	LAUDA
Ultrazentrifuge	Optima™ LE-80K Rotor type SW32	Beckman Coulter
UV-Transilluminator	GelVue UV-Transilluminator	Syngene
Zentrifuge	Biofuge 15R	Heraeus
Zentrifuge	MiniSpin Plus	Eppendorf

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 RT-PCR-Analysen

Ziel der Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) ist es, zum einen die mRNA-Expression eines bestimmten Proteins nachzuweisen und zum anderen aus mRNA DNA für Klonierungen herzustellen. Für RT-PCR-Analysen wird aus Zellen zunächst die Gesamt-RNA isoliert und diese anschließend durch eine reverse Transkription (mittels reverser Transkriptase) in cDNA umgeschrieben. Mit der entstandenen cDNA wird eine Amplifikation mit spezifischen Primern und einer Taq-Polymerase durchgeführt. Die entstandenen Produkte werden im Agarosegel sichtbar gemacht.

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen erfolgte mittels Trizol-Chloroform-Extraktion. Das Prinzip beruht auf einer Lyse der Zellen, einer Inaktivierung von RNasen und der anschließenden Isolierung der RNA. Die kultivierten Zellen (Flp-In™-Parentalzellen bzw. -Transfektanten oder SHSY5Y) wurden durch Zugabe von 1 ml Trizol pro  $5 \times 10^6$  Zellen homogenisiert. Zum Homogenat wurden 200 µl Chloroform gegeben und sorgfältig geschüttelt. Nach Zentrifugation (15 min, 4°C, 12000 x g) wurde die in der wässrigen Phase gelöste RNA in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit Isopropanol gefällt. Das Pellet wurde mit 75% Ethanol gewaschen und in RNase-freiem DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O gelöst.

Zur Herstellung von cDNA wurde der Kit Superscript II RT™ der Firma Invitrogen verwendet. Die cDNA-Synthese erfolgte mit Random-Primern nach dem Protokoll des Herstellers.

Die typische PCR besteht aus einem Denaturierungsschritt, bei dem die beiden Stränge der Template-DNA getrennt werden, einem Annealingschritt, bei dem die Temperatur so gesenkt wird, dass es zu einer Hybridisierung der Primer an die Einzelstränge der Template-DNA kommt und zuletzt einem Elongationsschritt, bei welchem die Temperatur auf das Optimum der gewählten Polymerase erhöht wird, welche dann die Primer verlängert, bis der gewünschte Genabschnitt wieder als doppelsträngige DNA vorliegt. Hier erfolgte die Amplifikation von Zielgenen mittels einer Standard-PCR (2 min. Denaturierung bei 95°C gefolgt von 35 Zyklen Denaturierung, Annealing und Elongation) mit der GoTaq-Polymerase von Promega. Für jedes Primerpaar wurden die Annealingtemperaturen mittels Gradienten-PCR-Analysen ausgetestet. Es wurden die Primer hTNR1-up und -down (für hTNR1; Annealingtemperatur 61,7°C), hTNR2-up und -down (für hTNR2; Annealingtemperatur 62,0°C), hTNR3up und -down (für hTNR3; 60,8°C) und h- $\beta$ -Actin-up und -down (Annealingtemperatur 64°C) verwendet. Die PCR erfolgte nach folgendem Schema:

<b>Komponente</b>	<b>Endkonzentration</b>
cDNA	50 pg – 1 $\mu$ g
dNTP	0.2 mM (jeweils)
Primer up	0.5 pmol/ $\mu$ l
Primer down	0.5 pmol/ $\mu$ l
GoTaq Green PCR-Buffer (5x)	1x
GoTaq-Polymerase	1 U
H <sub>2</sub> O	x $\mu$ l
<b>Gesamtansatz:</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

Für Nachweis und Analyse der PCR-Produkte wurde eine DNA-Gelelektrophorese durchgeführt. Diese erfolgte in einprozentigen Agarosegelen mit 0.2  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid in TAE-Laufpuffer. Die durch den Reaktionspuffer der GoTaq-Polymerase bereits mit Nukleinsäureprobenpuffer versetzten Nukleinsäuren wurden auf das Gel aufgetragen und bei 90 V getrennt.

## **2.2.2 Herstellung der rekombinanten Proteinfragmente**

### **2.2.2.1 TOPO/TA-Klonierungssystem**

Da gezeigt werden konnte, dass die humane Neuroblastomzelllinie SHSY5Y TNR mit dem gleichen Molekulargewicht und Glykosylierungsmuster exprimiert wie das aus dem Gehirn gewonnene Protein (Woodworth et al., 2004), konnte zur Gewinnung humaner TNR-spezifischer cDNA die Gesamt-RNA aus diesen Zellen aufgereinigt und zur cDNA-Synthese verwendet werden. Zur Herstellung der Fragmente hTNR1, hTNR2 und hTNR3 wurden spezifische Primer verwendet, die in der Linker-Region der entsprechenden Domänen liegen. PCR-Produkte wurden mit Hilfe einer „Proofreading“-Polymerase (Phusion) hergestellt und nach Aufreinigung in

den pcsecTag/FRT/V5-His-TOPO®-Vektor (Invitrogen; s. 2.3.1, S. 44) über TA-Klonierung eingebaut. Chemisch kompetente TOPO-Bakterien (Invitrogen) wurden mit diesem Vektor transformiert und die Plasmide aus 10 Einzelkolonien amplifiziert und sequenziert. Vektoren mit fehlerfreien hTNR-Fragmenten und richtiger Insertorientierung und der pOG44-Vektor (Invitrogen, s. 2.3.1 S. 44), welcher für die Flp-Rekombinase codiert, wurden zur Kotransfektion von Flp-In 293™-Zellen (Invitrogen) verwendet. Der pcsecTag/FRT/V5-His-TOPO®-Vektor erlaubt nach stabiler Integration über ein spezifisches Rekombinasesystem in eukaryontische Flp-In-Zellen (diese enthalten bereits einen integrierten Vektor mit einer spezifischen Rekombinaseregion) die konstitutive Sekretion des gewünschten Proteinfragments, das am C-Terminus mit einem 6xHis-Tag versehen ist, welcher zur Aufreinigung über Chelatchromatographie und zum Nachweis der Proteinfragmente genutzt wird. Dieses System erlaubt die Integration des Zielgens nur an einer definierten Stelle (FRT) im Genom der Empfängerzelle.

#### **2.2.2.2 Transfektion von Flp-In™ 293-Zellen mit hTNR1, 2, 3**

4 x 10<sup>5</sup> bzw. 2 x 10<sup>5</sup> Flp-In™ 293-Zellen wurden im 24-Well-Format mit Hilfe von Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) mit 0.32 µg bzw. 0.64 µg pHtNR1/2/3 und 2.9 µg bzw. 5.8 µg pOG44 (Verhältnis 1:9) nach Angaben des Herstellers kotransfiziert. Am folgenden Tag wurden die Zellen der einzelnen Wells auf jeweils eine 10cm-Schale aufgeteilt. Wiederum einen Tag später wurde das Transfektionsmedium (DMEM, 10% FCS, PS, L-Glut) durch Selektionsmedium (DMEM, 10% FCS, PS, L-Glut, 200 µg/ml Hygromycin) ersetzt. Nach ca. 15 Tagen erfolgte die Selektion einzelner Klone. Hierzu wurden die Schalen mit PBS gewaschen und Klonierungszyylinder mit Hilfe von Silicon über den zuvor markierten Klonen fixiert. Die Zellen innerhalb der Klonierungszyylinder wurden mit 150 µl Accutase gelöst, zentrifugiert, in ein Well einer 24-Well-Platte überführt und im gleichen Medium weiterkultiviert.

### **2.2.3 Proteinbiochemische Methoden**

#### **2.2.3.1 Affinitätschromatographische Aufreinigung von hTNR1, 2 und 3 aus Flp-In™ 293-Zellkulturüberständen**

Die Aufreinigung der drei TNR-Fragmente aus Flp In™ 293-Zellen basierte auf dem Prinzip der Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie mittels des ProBond Purification System (Invitrogen). Innerhalb einer Agarosematrix sind Nickel-Ionen an einen an die Matrix gekoppelten Chelatliganden gebunden. Diese Nickel-Ionen bilden einen Komplex mit dem His-Tag der aufzureinigenden Proteine. Durch Änderung des pH oder Zugabe von Imidazol werden die

Proteine eluiert. Das ausführliche Protokoll kann aufgrund eines patentierten Verfahrens hier nicht dargestellt werden und wird bei Heraclitus Biosciences beschrieben.

### **2.2.3.2 Immunaффinitätschromatographische Aufreinigung von TNR-Proteinen aus Gehirngewebe**

Die Gewinnung von TNR aus Gehirngewebe von Maus und Mensch erfolgte nach Angaben von Heraclitus Biosciences nach Homogenisieren des Hirngewebes in TES-Puffer (versetzt mit Protease-Inhibitoren) über Nacht bei 4°C. Nicht lösliche Gewebereste wurden durch Zentrifugation entfernt (100.000 g bei 4°C). Der Überstand wurde auf eine Immunaффinitätssäule gegeben, in der der monoklonale R2-Antikörper kovalent an CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Amersham Biosciences) gekoppelt ist. An diesen TNR-spezifischen monoklonalen Antikörper binden die TNR-Proteine, während nicht gebundenes Protein bei den Waschschriffen entfernt wird. Die gereinigten Proteine können zum Schluss in einem Elutionsschritt gewonnen werden.

### **2.2.3.3 ELISA**

Der ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) dient dem Nachweis und der Quantifizierung von Proteinen, Peptiden, Antikörpern und Hormonen. Antigene werden auf einer festen Oberfläche beschichtet und anschließend mit einem spezifischen Antikörper komplexiert, der an ein Enzym gebunden ist. Der Nachweis der Antikörperbindung erfolgt durch Inkubation des Enzym-Komplexes mit einem Substrat, welches ein nachweisbares Produkt produziert. Alternativ (bei nicht-gekoppelten Antikörpern) erfolgt der Nachweis der Antikörperbindung durch Bindung eines Sekundärantikörpers (welcher an den Primärantikörper bindet), der wiederum an ein Enzym gekoppelt ist.

Proteine / Proteinfragmente wurden bei 0.2 - 0.5 µg/ml in PBS (100 µl/well) für 2 Stunden bei 37°C oder über Nacht bei 4°C in 96-wells-Platten der Firma Falcon beschichtet. Nach einstündigem Blocken mit 2% BSA, PBS (200 µl/well) und dreimaligem Waschen mit PBS, 0.05% Tween 20 (PBS-Tween) wurde der Ansatz mit dem Primärantikörper für 2 Stunden bei 37°C inkubiert (100 µl/well). Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween erfolgte die Inkubation mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln (100 µl/well). Nach nochmals dreimaligem Waschen mit PBS-Tween wurde die Reaktion entwickelt (100 µl/well) und durch Zugabe von 0.6% SDS (50 µl/well) gestoppt. Die Farbreaktion wurde durch Messen der Extinktion (OD 405 nm) im ELISA-Reader bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte wie unter 2.2.5.2 beschrieben.

#### **2.2.3.4 Sandwich-ELISA**

Diese Methode wurde zur semi-quantitativen Bestimmung der Sekretion humaner TNF-Fragmente durch verschiedene Flp-In<sup>TM</sup>-Transfektanten genutzt. Das Prinzip beruht darauf, dass ein erster Antikörper (Capture-Antikörper) auf einer festen Oberfläche beschichtet wird, auf welchen dann das Proteingemisch mit dem gesuchten Antigen gegeben wird. Durch einen zweiten direkt markierten Antikörper, der das an den ersten Antikörper gebundene Antigen bindet, wird durch eine Farbreaktion die Bindung nachgewiesen. Ist der zweite Antikörper nicht direkt markiert, kann er über einen dritten, Enzym-gekoppelten Antikörper nachgewiesen werden.

Der Primärantikörper (R1 bis R6) wurde bei 20 µg/ml in PBS beschichtet (100 µl/well) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach einstündigem Blockieren mit 2% BSA in PBS (200 µl/well) und dreimaligem Waschen mit PBS-Tween wurde der Ansatz mit den konditionierten Medien von FlpIn-Transfektanten für 2 Stunden bei 37°C inkubiert (100 µl/well). Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween erfolgte die Inkubation mit einem HRP-markierten anti-His-Antikörper (anti-His-HRP; Invitrogen) für zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln (100 µl/well). Nach nochmals dreimaligem Waschen mit PBS-Tween wurde die Reaktion entwickelt und die Extinktion im ELISA-Reader bei 405 nm gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte wie unter 2.2.5.2 beschrieben.

#### **2.2.3.5 HRP-Konjugation der monoklonalen Antikörper R1 und R6**

Affinitätschromatographisch aufgereinigte IgG-Fractionen der monoklonalen TNF-Antikörper wurden zuvor mittels ZEBATEM<sup>TM</sup> Desalt Spin Columns nach Angaben des Herstellers gegen einen Carbonat-Bicarbonat-Puffer, pH 9.3, umdialysiert. Anschließend erfolgte die Konjugation mit HRP mittels des SureFIRE<sup>TM</sup> HRP-Conjugation Kits (KPL) nach dem Protokoll des Herstellers. Die Aktivität und die geeignete Verdünnung der Antikörper-HRP-Konjugate wurden mittels ELISA ausgetestet.

#### **2.2.3.6 Competition-ELISA**

Der Competition-ELISA wurde zur Bestimmung der topographischen Proximität der Epitope der monoklonalen TNF-Antikörper auf TNF verwendet. Sein Prinzip beruht darauf, dass zu dem beschichteten Antigen ein Antikörpergemisch gegeben wird, welches aus einem markierten Antikörper und einem Überschuss an einem nicht markierten Antikörper besteht. Binden beide Antikörper dasselbe oder eng benachbarte Epitope, erfolgt eine Konkurrenz der Bindung des

markierten Antikörpers durch den nicht markierten Antikörper und die Extinktion sinkt gegenüber dem Kontrollwert ab.

TNR / TNR-Fragmente wurden bei 0.2 µg/ml in PBS (100 µl/well) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach einstündigem Blockieren mit 2% BSA-LF in PBS h.i. (200 µl/well) und dreimaligem Waschen mit PBS wurde der Ansatz mit dem HRP-markierten Antikörper, gemischt mit nicht markierten Antikörpern im 2-, 5- und 10-fachen Überschuss (100 µl/well), für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde die Reaktion entwickelt und die Extinktion (OD 405 nm) im ELISA-Reader gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte wie unter 2.2.5.2 beschrieben.

### **2.2.3.7 Proteinbestimmung**

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt. Sie beruht auf dem Prinzip, dass sich das Absorptionsmaximum von Coomassie brilliant blue bei der Bindung an Proteine von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Die Proben wurden mit dem Farbstoff inkubiert und photometrisch gemessen. Die Proteinkonzentrationen wurden anhand einer mitgeführten Standardkurve ermittelt. Es wurde ein Reagenzkit „Protein Assay“ der Firma BioRad verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels Softmax-Pro Software (Versio 3.0).

### **2.2.3.8 SDS-PAGE**

Die gelelektrophoretische Auftrennung unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen erfolgte nach Laemmli (Laemmli, 1970) in 7%- oder 10%igen Flachgelen. Bei dieser Methode werden die Eigenladungen der Proteine mit dem anionischen Detergens SDS überdeckt, so dass SDS-Protein-Komplexe mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen (1.4 g SDS/g Protein). Auf diese Weise können Proteine in einem elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Zur Molekulargewichtsbestimmung der nachzuweisenden Proteine wurden Proteinmarker der Firma Fermentas mitgeführt. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine mit dem SilverSNAP<sup>®</sup> Stain Kit (Pierce) nach Angaben des Herstellers gefärbt oder mittels Western Blot weiter analysiert.

### **2.2.3.9 Western-Blot-Analyse**

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden beim Western Blot nach der von Towbin et al. (Towbin et al., 1979) beschriebenen Methode durch ein elektrisches Feld auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dadurch können nach Inkubation der Nitrocellulose mit

spezifischen Antikörpern die gesuchten Proteine identifiziert und das Molekulargewicht anhand eines mitgeführten Markers bestimmt werden.

Der Transfer der Proteine erfolgte hier bei 2 mA/cm<sup>2</sup>/h. Die Membran wurde nach dem Transfer zur Abklärung der Transfereffizienz mit Ponceau S angefärbt. Der Farbstoff wurde anschließend durch Waschen in PBS entfernt. Danach wurde die Membran zunächst für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 5% Milchpulver in TBS, 0.05% Tween 20 (MP-TBS) blockiert und mit dem Primärantikörper, verdünnt in 1% MP-TBS für weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBS, 0.05% Tween 20 (TBS-Tween) wurde die Membran mit einem Sekundärantikörper (je nach Ansatz HRP-, Biotin- oder AP-konjugiert), verdünnt in 1% MP-TBS für 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in TBS-Tween und einmaligem Waschen in TBS wurde die Nitrocellulose mit ECL-Substratlösung („Super Signal<sup>®</sup>“, Pierce) nach Angaben des Herstellers inkubiert und die immunochemische Reaktion durch Exponieren eines Röntgenfilms (Biomax, Kodak) bestimmt.

#### **2.2.3.10 Dot-Blot-Analysen**

Das Prinzip der Dot-Blot-Analyse ist weitestgehend mit dem des Western Blots identisch, bis auf den Punkt, dass die Proteine nicht durch SDS-PAGE aufgetrennt, sondern direkt unverdünnt auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen werden.

Die Proteine / Proteinfragmente / Zellkulturüberstände wurden in 2 µl Spots auf die Membran aufgetragen. Danach wurde die Membran zunächst für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 5% Milchpulver in TBS-Tween (MP-TBS) blockiert und wie unter 2.2.3.9 beschrieben weiterbehandelt.

#### **2.2.3.11 N-Deglykosylierung von Proteinen**

Die N-Deglykosylierung erfolgte mittels N-Glykosidase F (Roche Diagnostics) nach Angaben des Herstellers. Das Prinzip beruht auf der Abspaltung N-glykosidisch gebundener Zuckerreste des untersuchten Proteins. Durch diese Behandlung ist es möglich, die Stärke der Glykosylierung eines Proteins nach Durchführung von SDS-PAGE durch die Verschiebung des Molekulargewichtes abzuschätzen.

## 2.2.4 Zellkultur

### 2.2.4.1 Zelllinien

Bezeichnung	Spezies / Typ	Bezugsquelle / Referenz
Flp-In <sup>TM</sup> 293 (Human Embryonic Kidney)	Mensch	Invitrogen
CHO (Chinese Hamster Ovary)	Hamster	Gennarini et al., 1991
F3-Transfektant 1a	CHO-Zellen transfiziert mit Maus-F3	Gennarini et al., 1991
F3-Transfektant E12	CHO-Zellen transfiziert mit Maus-F3	Gennarini et al., 1991
SHSY5Y (Neuroblastom-Zelllinie)	Mensch	Woodworth et al., 2004
U 373 (Glioblastom-Zelllinie)	Mensch	Ponten et al., 1968

### 2.2.4.2 Medien

Sämtliche Medien wurden entweder von PAA oder von Sigma bezogen. Alle weiteren in der Zellkultur verwendeten Seren, Antibiotika und Lösungen stammten von PAA.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Alle Medien enthielten 2 mM L-Glutamin (L-Glut; PAA) und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (PS; PAA).

Die Flp-In<sup>TM</sup> 293-Zellen wurden in DMEM, 10% FCS und 100 µg/ml Zeocin kultiviert. Für die Transfektion der Flp-In<sup>TM</sup> 293-Zellen wurden diese in DMEM mit 10% FCS ausplattiert. Nach der Transfektion wurden die Zellen in DMEM, 10% FCS und 200 µg/ml Hygromycin kultiviert. Die Produktion der Proteinfragmente erfolgte unter definierten serumfreien Bedingungen (patentiert; Heraclitus Biosciences). Die F3-Transfektanten (1a und E12) und die CHO-Parentalzellen wurden in MEM und 10% FCS kultiviert. Für Bindungsstudien wurden sie in BME-Medium mit 0.1% BSA-LF-PBS h.i. resuspendiert.

SHSY5Y-Zellen wurden zunächst in MEM, 15% FCS und 1x Nutrient Essential Amino Acids (NEAA) kultiviert. Für funktionelle In vitro-Studien wurden sie auf serumfreies Medium (DMEM/Ham's F-12 mit B-27-Supplement) gesetzt und neuronal differenziert.

Primärzellkulturen wurden aus Kleinhirnen von 7-8 Tage alten Mäusen vom CD1-Stamm (Haus für Experimentelle Therapie der Uniklinik Bonn, HET) hergestellt und in definierten serumfreien Medien (Heraclitus Biosciences) kultiviert.

Zum Passagieren und Ernten der Zellen wurden diese mit PBS gewaschen, mit 0.05% Trypsin/EDTA gelöst und 5 min. bei 500 x g zentrifugiert. Zum Lagern wurden die Zellen geerntet, in DMEM, 50% FCS, 10% DMSO resuspendiert und in Ampullen langsam auf -80°C gekühlt. Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.



### **2.2.4.3 Zelladhäsions- und Neuritenwachstumsstudien**

#### **2.2.4.3.1 Zellbindungsstudien mit Erythrozyten**

Zur Untersuchung der Sulfatid-vermittelten Interaktion von Erythrozyten mit TNR-Proteinfragmenten wurden Kurzzeitbindungsstudien durchgeführt. Es wurden Kaninchen- und Ziegen-Erythrozyten, die zur Gewinnung einer proteinfreien Membranoberfläche mit 1% Trypsin in PBS behandelt und anschließend in 1% Glutaraldehyd in PBS fixiert wurden (s. Pesheva et al., 1997), sowie humane Erythrozyten (Sigma-Aldrich) verwendet. Die Fragmente hTNR1, hTNR2, hTNR3 und natives TNR wurden nach Angaben von Heraclitus Biosciences auf Zellkulturschalen beschichtet. Anschließend wurden die Schalen kurz gewaschen und blockiert. Für Wettbewerbsansätze wurden entweder die Substrate mit monoklonalen TNR-Antikörpern (50 µg/ml in PBS) oder Sulfatiden (2 und 5 µg/ml in PBS) oder aber die Erythrozytenlösung mit dem O4-Antikörper (1:30 verdünnt) vorinkubiert. Nach nochmaligem Waschen erfolgte die Zugabe einer 0.1%igen Erythrozytensuspension. Nach 2 h wurden nicht gebundene Erythrozyten mit PBS gewaschen und die Bindung lichtmikroskopisch analysiert. Die Quantifizierung der Zelladhäsion und die statistische Auswertung erfolgte wie unter 2.2.5.1 beschrieben.

#### **2.2.4.3.2 Zelladhäsionsstudien mit F3-Transfektanten**

Die Untersuchung der Adhäsion der F3-Transfektanten an die TNR-Proteinfragmente erfolgte mittels Kurzzeit (60 min.) und Langzeit-(20 h) Adhäsionsstudien. Die Fragmente hTNR1, hTNR2, hTNR3 und natives TNR wurden nach Angaben von Heraclitus Biosciences auf Zellkulturschalen beschichtet, die Schalen mit PBS gewaschen und bei den Ansätzen zur Kurzzeitadhäsion blockiert. Für Wettbewerbsansätze wurden die Substrate mit monoklonalen TNR-Antikörpern (50 µg/ml) vorinkubiert bzw. die Zellen mit dem F3-Antikörper zusammengegeben (50 µg/ml). Nach nochmaligem Waschen der Schalen wurde die Zellsuspension der F3-Transfektanten ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) in BME + 0.1% BSA-LF-PBS h.i. zugegeben. Die erfolgte Adhäsion wurde lichtmikroskopisch analysiert. Die Quantifizierung der Zelladhäsion und die statistische Auswertung erfolgte wie unter 2.2.5.1 beschrieben.

#### **2.2.4.3.3 SHSY5Y-Zellen**

Einzelzellsuspensionen von SHSY5Y-Zellen ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden durch Accutase-Behandlung hergestellt, in serumfreiem Medium und auf mit den Substraten (TNR bzw. TNR-Fragmente) beschichtete Zellkulturschalen oder -platten gegeben. Jeweils nach 24, 36 und 48 Stunden erfolgte die lichtmikroskopische Analyse der Zelladhäsion und des Neuritenwachstums,

die Quantifizierung der Zellbindung und die statistische Auswertung wie unter 2.2.5.1 beschrieben.

#### **2.2.4.3.4 Kleinhirn-Mikroexplantate**

TNR-Proteine (natives TNR und die Fragmente hTNR1, hTNR2, hTNR3) wurden auf mit PDL (50 µg/ml; 2 Stunden bei 37°C) beschichteten Zellkulturplatten beschichtet. Kleinhirn-Mikroexplantate (100 µm Durchmesser) wurden von 7-8 Tage alten Mäusen präpariert und in einem definierten serumfreien Medium auf die beschichteten Platten gegeben. Nach 48 h in vitro wurden die Kulturen mit 4% Paraformaldehyd, 5% Sucrose in PBS (bei 37°C vorgewärmt) fixiert und anschließend mit Crystal Violet (0.005% in H<sub>2</sub>O, 30 min. bei RT) gefärbt. Nach einmaligem Waschen mit H<sub>2</sub>O wurden die Platten getrocknet und das Neuritenwachstum lichtmikroskopisch analysiert.

#### **2.2.4.4 Kleinhirnkulturen**

Kleinhirne wurden von 7 Tage alten Mäusen präpariert. Dabei wurden die Hirnhäute unter dem Mikroskop entfernt und das mit einer Pinzette zerkleinerte Gewebe durch Zugabe von 1% Trypsin-Lösung für 10 min. bei RT in Petrischalen dissoziiert. Anschließend wurde das Gewebe nach Zugabe einer größeren Menge Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) in ein 15 ml-Röhrchen überführt und für 10 min. bei 600 x g und 4°C abzentrifugiert. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde das Pellet mit 2 ml DNase mit einer Pasteurpipette mit verengter Spitze vorsichtig resuspendiert, mit Medium verdünnt und nicht dissoziierte Gewebestücke durch Sedimentation entfernt. Kleinhirnzellen (hauptsächlich Kleinhirnneurone, Oligodendrozyten und Mikroglia) wurden in serumfreiem Kulturmedium über mehrere Tage hinweg kultiviert.

#### **2.2.4.5 Oligodendrozytendifferenzierung mittels rekombinanter TNR-Fragmente**

In mit PLL beschichtete 4-well-Zellkulturplatten wurden die oben hergestellten Kleinhirnzellkulturen (500 µl Zellsuspension/well) gegeben und für einen Tag bei 37°C kultiviert. Das Medium wurde abgenommen und in jeweils zwei wells hTNR1, hTNR2 und hTNR1 + hTNR2 (jeweils 10 µg/ml in frischem Medium; zwei Kontrollansätze: nur PBS) gegeben. Anschließend wurden die Zellen in Gegenwart der TNR-Fragmente für 2-4 Tage bei 37°C kultiviert. Die Analyse der Zellmorphologie und des Differenzierungsgrades erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbungen.

#### **2.2.4.6 Immunfluoreszenzfärbungen von Kleinhirnkulturen**

Die Zellmorphologie und der Differenzierungsgrad der oben hergestellten Kleinhirnzellkulturen wurden nach 2-4 Tagen in Kultur mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Dabei wurden die Zellen zunächst mit dem O4-Antikörper gefärbt, um OL zu identifizieren und dann mit dem MBP-Antikörper doppelmarkiert, um reife OL sichtbar zu machen. Der O4-Antikörper wurde 1:2 in Inkubationspuffer (10% FCS in Dullbeco's modified PBS, DPBS) verdünnt und für 20 min. mit der Monolayer-Zellkultur inkubiert. Nach zwei- bis dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem Anti-Maus-Cyanin 3-Antikörper (1:200) für 20 min. Anschließend wurden die Zellen für 10 min. mit 4% Formaldehyd + 5% Sucrose in PBS fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mittels einer zehnmütigen Inkubation mit 0.1% Triton X-100 in PBS permeabilisiert und nach zwei weiteren Waschschritten nochmals für 5 min. fixiert. Nach nochmaligem Waschen wurden die Zellen für 15 min. mit Blockierungspuffer (10% FCS in DPBS) inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des MBP-Antikörpers (1:200) für 30 min. und eine weitere Inkubation mit dem Anti-Ratten-Fluoreszenzantikörper (Alexa 488; 1:200) für 20 min. Die Analysen erfolgten mittels Fluoreszenzmikroskop.

#### **2.2.5 Statistische Auswertung**

##### **2.2.5.1 Zellbindungsstudien**

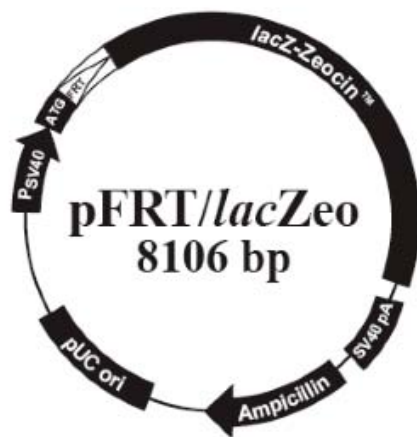
Zur Quantifizierung von Zellbindungen wurden pro Ansatz jeweils 6 Quadranten identischer Größe (jeweils etwa 50 – 150 Zellen/Quadrant) mit der AxioVision-Software (Zeiss) ausgezählt. Es wurden Mittelwerte gebildet, die Standardabweichung berechnet und der jeweilige Kontrollansatz (Adhäsion auf dem Substrat ohne Zugabe von Kompetitoren) als 100% gesetzt. Von den jeweiligen Mittelwerten der untersuchten Substrate wurde der gemittelte Background abgezogen (Zellzahl nur auf Zellkulturplastik; ebenfalls 6 ausgezählte Quadranten) und die Werte mit den zugehörigen Kontrollen in prozentuale Relation gesetzt. Die statistische und graphische Auswertung erfolgte mittels Prism-Software Version 4.0a für Macintosh (GraphPad Software, Inc.). Basierend auf der Annahme einer Normalverteilung der Messwerte, wurde bei jeder Quantifizierung ein Student's t-Test durchgeführt und dessen statistische Signifikanz anhand von p-Werten veranschaulicht. Zur weiteren Absicherung der ermittelten p-Werte wurden bei den entsprechenden Studien zusätzlich 2-Faktoren-Varianzanalysen (2-way-ANOVA) durchgeführt, welche jederzeit fast identische p-Werte wie diese des t-Tests ergaben. Aus diesem Grunde wurde auf die Angabe der auf diese Weise ermittelten p-Werte in den graphischen Darstellungen verzichtet.

### 2.2.5.2 ELISA-Studien

Die Mittelwerte von 3- bis 5-fachen Messwerten wurden ausgewertet, wobei die einzelnen Messerwerte nahezu identisch und die daraus resultierenden Standardabweichungen sehr gering waren. Die graphische und statistische Auswertung erfolgte mittels Prism-Software Version 4.0a für Macintosh (GraphPad Software, Inc.). Auch hier wurden die Messwerte mittels Student's t-Test analysiert und dessen statistische Signifikanz anhand von p-Werten veranschaulicht. Zur weiteren Absicherung der ermittelten p-Werte wurden bei den entsprechenden Studien zusätzlich 2-Faktoren-Varianzanalysen (2-way-ANOVA) durchgeführt, welche jederzeit fast identische p-Werte wie diese des t-Tests ergaben.

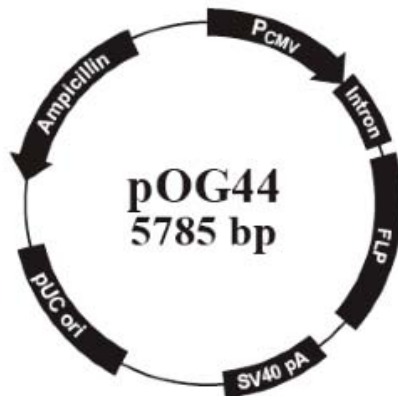
## 2.3 Anhang

### 2.3.1 Vektoren und Plasmide



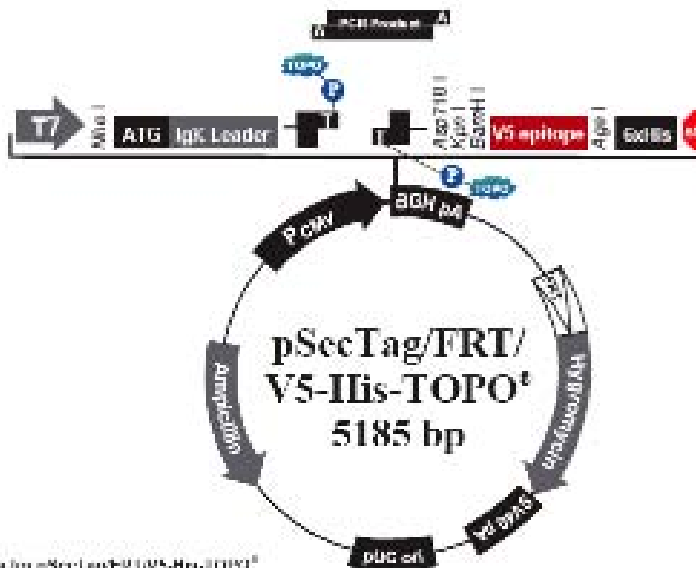
#### Comments for pFRT/lacZeo 8106 nucleotides

SV40 early promoter and origin: bases 278-604  
 ATG initiation codon: bases 609-611  
 FRT site: bases 614-661  
 LacZ-Zeocin<sup>™</sup> fusion gene  
 LacZ ORF (no ATG): bases 675-3722  
 Zeocin<sup>™</sup> resistance gene (no ATG): bases 3810-4181  
 SV40 early polyadenylation signal: bases 5102-5425  
 bla promoter: bases 6201-6299  
 Ampicillin (bla) resistance gene: bases 6300-7160  
 pUC origin: bases 7305-7978



**Comments for pOG44**  
5785 nucleotides

CMV promoter: bases 234-821  
 Synthetic intron: bases 871-1175  
 FLP ORF: bases 1202-2473  
 SV40 late polyadenylation signal: bases 2597-2732  
 pUC origin: bases 3327-3993 (complementary strand)  
*bla* promoter: bases 4999-5097 (complementary strand)  
 Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 4136-4996 (complementary strand)



**Comments for pSecTag/FRT/V5-IIIis-TOPO**  
5185 nucleotides

CMV promoter: bases 332-619  
 CMV forward priming site: bases 709-709  
 T7 promoter/priming site: bases 803-803  
 Igk leader signal: bases 925-987  
 TOPO<sup>®</sup> Cloning site: bases 1012-1013  
 V5 epitope: bases 1048-1057  
 Polyhistidine (6xHis) region: bases 1097-1114  
 BGH reverse priming site: bases 1137-1137  
 BGH polyadenylation signal: bases 1143-1307  
 FRT site: bases 1051-1056  
 Hygromycin resistance gene (no ATG): bases 1700-2725  
 SV40 early polyadenylation signal: bases 2855-2889  
 pUC origin: bases 3971-4049 (complementary strand)  
 bla promoter: bases 5050-5143 (complementary strand)  
 Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 4166-5045 (complementary strand)

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Erzeugung und Selektion humaner TNR-Transfektanten

Die Produktion der rekombinanten TNR-Proteinfragmente (schematische Darstellung s. Abb. 6 S. 29) erfolgte durch Klonierung der entsprechenden Sequenzen in TOPO-Bakterien, Selektion und anschließende Plasmidaufreinigung. Die die Zielgene in richtiger Orientierung enthaltenden Plasmide wurden in Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen transfiziert, welche daraufhin die Proteinfragmente konstitutiv exprimierten. Die TNR-Proteinfragmente wurden anschließend aus dem Zellkulturmedium-Überstand durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie aufgereinigt.

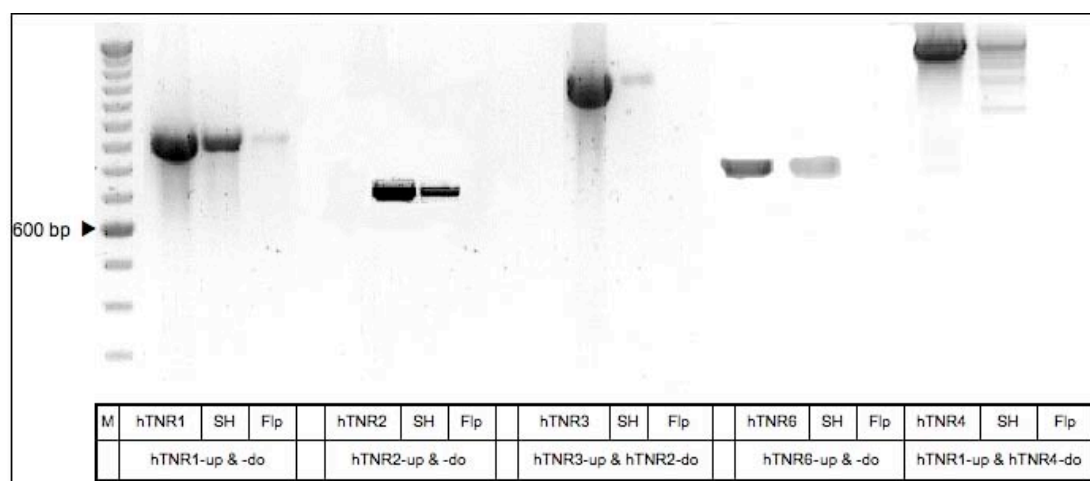
#### 3.1.1 Herstellung produzierender Transfektanten

Als Produzenten der Proteinfragmente wurden Flp-In 293-Zellen (Invitrogen) verwendet, die sich von der menschlichen Nierenzelllinie HEK 293 ableiten. In Flp-In-Zellen ist das Plasmid pFRT/lacZeo (Invitrogen) stabil integriert, welches eine für die Flp-Rekombinase spezifische FRT-Stelle enthält. Bei gleichzeitiger Transfektion der Flp-In 293-Zellen mit dem pOG44-Plasmid, das die Expression der Flp-Rekombinase ermöglicht, und dem Fremdprotein kodierenden pSecTag/FRT/V5-His-TOPO<sup>®</sup>-Vektor (hergestellt durch TOPO/TA-Klonierung) kommt es präferentiell an der FRT-Stelle zu dessen Einbau. Durch die Spezifität der Vektorintegration kommt es zum Verlust der in Flp-In-Zellen vorhandenen Zeocin- und der Etablierung einer Hygromycin-Resistenz, was die Selektion relevanter Klone erlaubt. Konstitutiv exprimierte, polyHis-tragende Proteinfragmente können dann über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie aus Zellkulturüberständen aufgereinigt werden. Genaueres zum TOPO/TA-Klonierungssystem und zum Flp-In<sup>TM</sup>-System ist nachzulesen im Kapitel „Material und Methoden“ unter 2.2.2, S. 34 f.

Vor der Transfektion wurden die Plasmide durch Sequenzanalysen verifiziert und auf die richtige Orientierung des eingebauten Zielgens untersucht. Nach erfolgreicher Transfektion und Selektion standen für das Fragment hTNR1 sechs, für hTNR2 zwölf und für hTNR3 dreizehn positiv getestete Klone zur Verfügung, welche anhand von RT-PCR-, ELISA- und Western Blot-Analysen auf ihre mRNA- bzw. Proteinproduktion gescreent werden konnten. Auf diese Weise sollte für jedes Fragment jeweils der Klon identifiziert werden, der am meisten Proteinfragment exprimiert.

### 3.1.2 RT-PCR-Analysen humaner TNR-Transfektanten

Um auf mRNA-Ebene nachzuweisen, dass die Transfektanten tatsächlich den entsprechenden Vektor in ihr Genom integriert haben, wurden RT-PCR-Analysen mit T7-up/BGH-do-Primern (zum Nachweis der Gesamtvektorsequenz; nicht gezeigt) und mit Insert-spezifischen Primern (hTNR1-up/hTNR1-do für hTNR1, hTNR2-up/hTNR2-do für hTNR2 und hTNR3-up/hTNR3-do für hTNR3) durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten jeweils SHSY5Y-Zellen, welche TNR exprimieren und die zur Gewinnung der TNR-spezifischen cDNA für die Fragmentproduktion herangezogen worden waren. Die Negativkontrolle stellten die Flp-In 293-Parentalzellen dar. Außer den im Rahmen dieser Promotionsarbeit geplanten Experimenten wurden zwei weitere Transfektionen (mit hTNR 4 und hTNR 6) durchgeführt (s. Abb. 7), die zur Zeit analysiert werden.



**Abb. 7 RT-PCR-Analysen der Klone hTNR1-3, hTNR2-11, hTNR3-12, hTNR4-11 und hTNR6-13 mit Insert-spezifischen Primern**

Die PCR erfolgte mittels GoTaq-Polymerase (s. Material und Methoden 2.2.1, S. 33), die Analyse der PCR-Produkte in einem 1%igen Agarosegel durch DNA-Elektrophorese. M: Marker (100 bp DNA-Leiter); hTNR1: Transfektant hTNR1-3 (915 bp); SH: SHSY5Y-Zellen; Flp: FlpIn-293-Zellen; hTNR2: Transfektant hTNR2-11 (717 bp); hTNR3: Transfektant hTNR3-12 (1230 bp); hTNR6: Transfektant hTNR6-13 (816 bp); hTNR4: Transfektant hTNR4-11 (1449 bp). Die verwendeten Primer sind in der zweiten Zeile angegeben.

Es konnte gezeigt werden, dass in jedem der untersuchten Klone das gewünschte Fragment eingebaut wurde. Die PCR-Produktgrößen entsprechen den zu erwartenden Inserts für die einzelnen Fragmente.

### 3.1.3 Immunbiochemische Analysen humaner rekombinanter TNR-Proteinfragmente

Mit Hilfe des pSecTag-Vektors wurden bei jedem Fragment C-terminal zwei Tags exprimiert: das V5-Epitop und ein Poly-His-Schwanz (6x His) (s. Vektorkarte S. 44 f.). Diese dienten dem

Nachweis der Fragmente mit Tag-spezifischen Antikörpern und der Aufreinigung auf Nickel-Agarose (His-Schwanz).

Zur Gewinnung von rekombinanten Proteinfragmenten aus Zellkulturüberständen wurden FlpIn-293-Tranfektanten unter definierten serumfreien Bedingungen kultiviert (nach Angaben von Heraclitus Biosciences). Mit den konditionierten Medien konnten nun weitergehende Analysen durchgeführt werden, um jeweils den Klon zu bestimmen, der das entsprechende Fragment auf Proteinebene am stärksten exprimiert. Diese Untersuchungen geschahen in Parallelansätzen zum einen mittels ELISA und zum anderen mittels Dot Blot- und Western Blot-Analysen.

In einem ersten Durchgang wurden die produktivsten Klone anhand des Poly-His-Schwanzes der von ihnen exprimierten Fragmente durch Bindung eines Anti-His-HRP-Antikörpers identifiziert. Die Produkte der stark positiven Klone wurden anschließend auf ihre Kreuzreaktivität mit verschiedenen monoklonalen TNR-Antikörpern (R1, R2, R3, R4, R5, R6) unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen getestet, um schließlich anhand der gesamten Reaktionen für jedes Fragment den Klon auszuwählen, der am meisten Proteinfragment produziert.

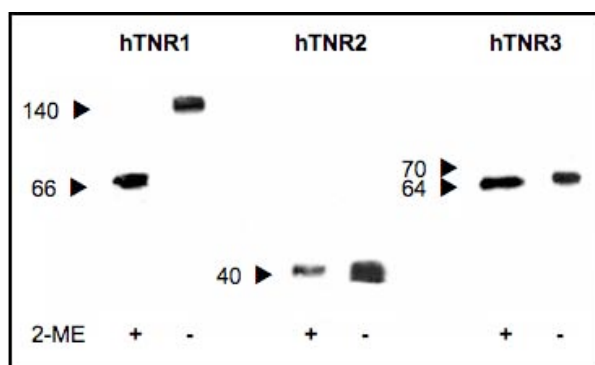
Zusätzlich sollten mit diesem Ansatz die Bindungsstellen der monoklonalen TNR-Antikörper auf den drei TNR-Fragmenten identifiziert werden. Die Analysen wurden sowohl mit den unbehandelten Zellkulturmedium-Überständen als auch mit den über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie aufgereinigten Proteinen durchgeführt, um die Effizienz der Aufreinigung zu überprüfen.

Zur Bestimmung der Molekulargewichte der einzelnen Proteinfragmente wurden Western Blot-Analysen sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt (s. Abb. 8 S. 49). Da das hTNR1-Fragment dem N-Terminus des TNR-Moleküls entspricht, sollte auf diese Weise überprüft werden, ob dieses Fragment an der Multimerbildung beteiligt ist und die Ergebnisse auf dem Gesamtmolekül bestätigen kann.

Aus den Analysen ging hervor, dass die Klone hTNR1-3, hTNR2-11 und hTNR3-12 am meisten Proteinfragment herstellen (nicht gezeigt). Sie wurden für die weitere Proteinproduktion und Aufreinigung gezüchtet. Die Western Blot-Analysen zeigen, dass sich das Molekulargewicht von hTNR1 unter nicht reduzierenden Bedingungen nahezu verdreifacht (66 kD vs. 140 kD), während die anderen beiden Fragmente ihr Molekulargewicht beibehalten (hTNR2 unverändert 40 kD und hTNR3 67 bzw. 70 kD). Daraus geht hervor, dass hTNR1 Trimere formt (wie das native TNR 180-Molekül), hTNR2 und hTNR3 jedoch als Monomere vorliegen. Die auf dem



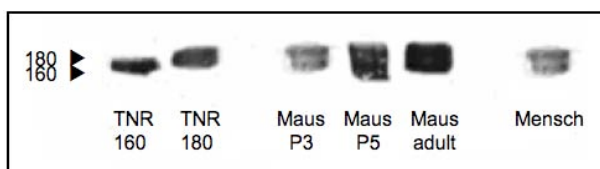
Niveau des Gesamtmoleküls erzielten Ergebnisse (Pesheva et al., 1989; Nörenberg et al, 1992) konnten somit bestätigt werden.



**Abb. 8 Western Blot-Analysen der TNR-Fragmente hTNR1, hTNR2 und hTNR3**

Untersuchung der Fragmente hTNR1, hTNR2 und hTNR3 unter reduzierenden (+ 2-ME) und unter nicht reduzierenden (- 2-ME) Bedingungen. Für die Analyse wurden aus konditionierten Überständen der Klone hTNR1-3, hTNR2-11 und hTNR3-12 aufgereinigte Proteinfragmente benutzt. Der Nachweis erfolgte mit V5-Antikörper. Jeweils links der Banden die entsprechenden Molekulargewichte in Kilodalton (kD).

Für Kontrollansätze bei allen immunbiochemischen und anschließenden funktionellen Analysen wurde das native TNR-Protein von unterschiedlichen Spezies (Maus in verschiedenen Altersstufen und Mensch) verwendet, welches über immunaffinitätschromatographische Aufreinigung aus Gehirngewebe (s. 2.2.3.2 S. 36) gewonnen wurde. Dass in allen verwendeten Präparationen die zwei molekularen Hauptformen von TNR (160/180 kD) vorliegt, zeigt der Western Blot in Abb. 9.



**Abb. 9 Western Blot-Analysen verschiedener TNR-Präparationen**

Untersuchung der aufgereinigten TNR-Proteine aus Mäusegehirnen unterschiedlicher Entwicklungsstufen und aus menschlichem Hirngewebe mit dem monoklonalen TNR-Antikörper R6. Das Gehirngewebe adulter Mäuse zeigt die größte Proteinmenge. Links TNR160 und TNR180 aus adultem Mausgehirn als Kontrollproteine. P, Postnataltag

## 3.2 Strukturelle und biochemische Analyse humaner rekombinanter TNR-Proteinfragmente

### 3.2.1 Bestimmung der Epitope monoklonaler TNR-Antikörper

In einem ersten Teil der biochemischen Charakterisierung der drei TNR-Fragmente sollten die Bindungsstellen der monoklonalen TNR-Antikörper R1, R2, R3, R4, R5 und R6 bestimmt werden. In vorherigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass einige dieser Antikörper mit

funktionellen Eigenschaften (insbesondere mit dem inhibitorischen Effekt auf das Neuritenwachstum) des nativen TNR-Moleküls interferieren (Pesheva et al., 2006). Diese Interaktionen könnten Hinweise darauf liefern, welche TNR-Domänen an bestimmten funktionellen Eigenschaften des Moleküls beteiligt sind. In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, in welchen Domänenbereichen von TNR die Bindungsstellen der Antikörper lokalisiert sind, um in funktionellen Studien später deren Effekte in den einzelnen TNR-Domänen zu lokalisieren und zu charakterisieren. Hierfür wurden mit den aufgereinigten Proteinen ELISA-, Dot Blot- und Western Blot-Analysen sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt (falls die Erkennung durch einen der Antikörper konformationsabhängig ist). Zusätzlich wurden die Antikörperbindungen nach einer N-Deglykosylierung untersucht, um zum einen die Stärke der Glykosylierung abschätzen zu können und zum anderen festzustellen, ob die Antikörper Proteinepitope und nicht etwa Kohlenhydratstrukturen erkennen. Als Kontrolle dienten Tag-spezifische monoklonale Antikörper (V5-, His-Tag, die C-terminal an dem rekombinanten Fragment exprimiert wurden – s. Vektorkarte S. 44 f.). Die Ergebnisse der Analysen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Antikörper	hTNR1	hTNR2	hTNR3
Anti-V5	+	+	+
Anti-His	+	+	+
R1	+	-	+
R2	-	-	-
R3	+	-	-
R4	+	+	+
R5	+	-	-
R6	+	-	-

**Tabelle 2. Bindung von Tag- und TNR-spezifischen Antikörpern an hTNR1, hTNR2 und hTNR3**

Zusammengefasste Ergebnisse aus ELISA-, Western Blot- und Dot-Blot-Analysen. Antikörper: Anti-V5, Anti-His-Antikörper (= Tag-spezifische Antikörper), R1-R6 = monoklonale TNR-Antikörper; +, Reaktion; -, keine Reaktion

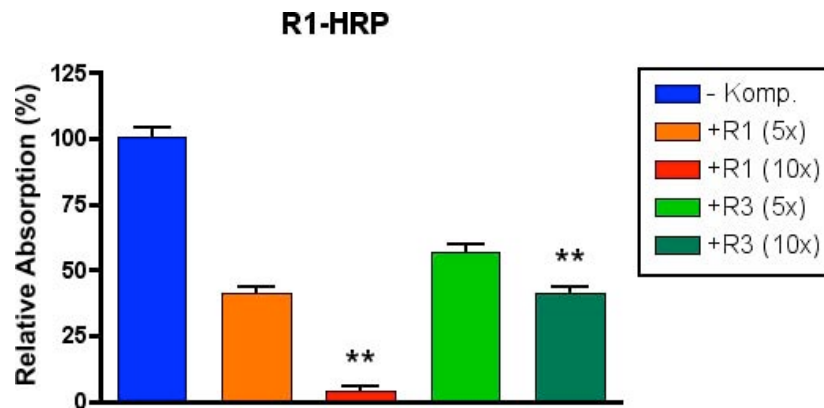
Bei allen Ansätzen wird der Poly-His-Schwanz der Proteinfragmente durch den Anti-His-HRP-Antikörper erkannt. Es handelt sich somit bei allen untersuchten Fragmenten um die aufgereinigten rekombinanten Proteine, da sie durch das TOPO/Flp-System mit dem His-Tag versehen und über diesen aufgereinigt wurden. Der V5-Antikörper erkennt bei allen Fragmenten das V5-Epitop. Vier aus sechs monoklonalen TNR-Antikörpern (R1, R3, R5, R6) binden reproduzierbar an das hTNR1-Fragment, wobei R1 auch an das hTNR3-Fragment bindet. R4 bindet reproduzierbar an hTNR2 und hTNR3 und erkennt unter nicht reduzierenden Bedingungen auch das hTNR1-Fragment. Die Bindungsstelle des R2-Antikörpers muss sich aufgrund der negativen Reaktion mit den drei Fragmenten und weiteren Analysen unabhängig

der vorliegenden Arbeit in den übrigen Domänen des TNR-Moleküls befinden. Da die monoklonalen TNR-Antikörper genauso wie der V5-Antikörper auch nach N-Deglykosylierung (s. 2.2.3.11 S. 39) an die Fragmente binden, ist sichergestellt, dass die TNR-Antikörper Proteinepitope (und keine Zuckerstrukturen) erkennen.

Die Antikörperbindung ist mit zwei Ausnahmen unter beiden untersuchten Western Blot-Bedingungen (reduzierend vs. nicht reduzierend) identisch. Die Ausnahme stellen R3 und R4 dar, welche mit hTNR1 nur unter nicht reduzierenden Bedingungen reagieren. Dies ist ein Indiz dafür, dass diese beiden Antikörper ihre Bindung konformationsabhängig entfalten (S-S-Brücken sind unter nicht reduzierenden Bedingungen noch intakt, was unter anderem anhand der Trimerbildung bei hTNR1 verdeutlicht wird).

Da R1 und R3 (unter nicht reduzierenden stärker als unter reduzierenden Bedingungen) das Fragment hTNR1 sowie natives TNR 180 erkennen, nicht aber TNR160, stellt sich die Frage, ob sich die Bindungsstellen der beiden Antikörper an der gleichen oder einer eng benachbarten Stelle im Molekül befinden. Ähnliche Überlegungen gab es für R5 und R6, da diese sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen hTNR1 und natives TNR160 und TNR180 erkennen. Es wurden deshalb zwei Studien zur topographischen Proximität angeschlossen (eine für R1/R3 und eine für R5/R6), welche mittels Competition-ELISA mit HRP-markierten monoklonalen TNR-Antikörpern erfolgten. Im ersten Ansatz wurde untersucht, ob die Bindung von R1 (dieser wurde zuvor mit HRP markiert) an hTNR1 durch 5- und 10-fachen Überschuss nicht markierter Antikörper R1, R3 und R4 (Kontrolle, da er – wie aus der biochemischen Charakterisierung hervorgeht – viel schwächer an hTNR1 bindet) kompetierbar ist (s. Abb. 10 S. 52). Parallel wurde die Bindung von R1-HRP ganz ohne Kompetitor sowohl an hTNR1 (Positivkontrolle) und an Rinderserumalbumin (BSA; Negativkontrolle) untersucht.

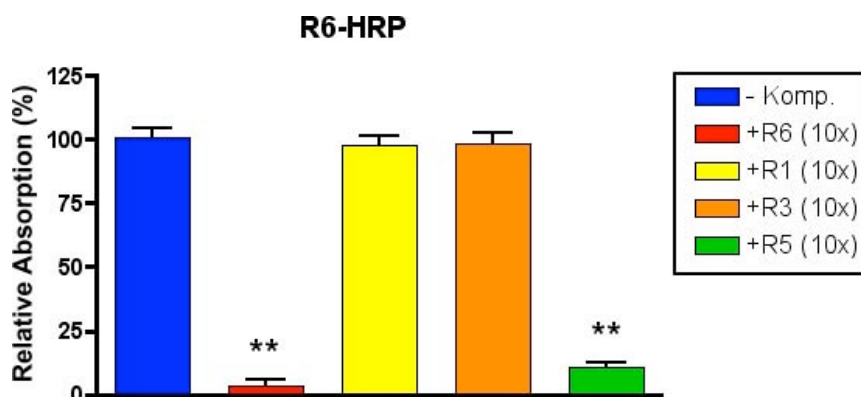
Die Absorption für die Bindung von R1-HRP, gemischt mit dem nicht markierten R1, nimmt bei 5-fachem Überschuss des Kompetitors deutlich ab (um etwa 60%) und tendiert bei 10-fachem Überschuss gegen Null. Somit hat eine vollständige Competition stattgefunden. Gibt man statt R1 nun R3 als Kompetitor hinzu, sinkt die Absorption zwar ebenfalls ab, es ist aber kein wesentlicher Unterschied zwischen 5- und 10-fachem Überschuss zu erkennen. Es kommt also zu keiner vollständigen Competition, sondern nur zu einer Abschwächung der Absorption um etwa 60%. Daraus lässt sich schließen, dass die Epitope von R1 und R3 auf hTNR1 eng benachbart liegen, aber nicht identisch sind. Mit R4 ist keinerlei Competition zu erkennen (nicht gezeigt).



**Abb. 10 Competition-ELISA zur Bestimmung der topographischen Proximität der Epitope für R1 und R3 auf hTNR1-Fragment**

OD<sub>405</sub>-Werte (Mittelwerte von dreifachen Messwerten) für die Bindung von R1-HRP ohne (- Komp.) und mit Kompetitoren in 5- und 10-fachem Überschuss (5x, 10x). Die Antikörper-Bindung in Abwesenheit von Kompetitor (nach Abzug der Hintergrundbindung auf BSA) wurde gleich 100% gesetzt. Alle anderen Werte wurden mit diesem Wert in Relation gesetzt. \*\*,  $p < 0.01$  versus Kontrolle (- Komp.).

Im zweiten Ansatz wurde mit der R6-Bindungsstelle auf die gleiche Weise verfahren (R6 mit HRP markiert, Konkurrenz durch R6, R1, R3, R4 und R5 in 10-fachem Überschuss) (s. Abb. 11). In einem weiteren Ansatz wurde auf die gleiche Art und Weise die Bindung an natives TNR180 bzw. TNR160/180 untersucht (nicht gezeigt), um sicherzugehen, dass die Effekte bei nativem TNR und hTNR1 vergleichbar sind.



**Abb. 11 Competition-ELISA zur Bestimmung der topographischen Proximität der Epitope für R6, R1, R3 und R5 auf hTNR1-Fragment**

OD<sub>405</sub>-Werte (Mittelwerte von dreifachen Messwerten) für R6-HRP ohne und mit Kompetitoren in 10-fachem Überschuss (10x). Die Antikörper-Bindung in Abwesenheit von Kompetitor (nach Abzug der Hintergrundbindung auf BSA) wurde gleich 100% gesetzt. Alle anderen Werte wurden mit diesem Wert in Relation gesetzt. \*\*,  $p < 0.01$  versus Kontrolle (- Komp.).

Auch bei diesem Ansatz nimmt bei Zugabe von nicht markiertem R6 zu dem HRP-markierten R6 in 10-fachem Überschuss die Absorption um nahezu 100% ab. Bei Zugabe von R1 und R3 hingegen tritt keinerlei Konkurrenz ein, die Antikörper-Bindung wird nicht abgeschwächt. Bei dem Konkurrenzansatz mit R5 ist wie bei jenem mit R6 eine fast vollständige Abnahme der

Absorption zu beobachten. Die Epitope von R6 und R1 bzw. R6 und R3 liegen somit wie erwartet nicht benachbart, sondern auf verschiedenen Abschnitten des hTNR1-Fragments. Die Bindungsstellen von R5 und R6 hingegen liegen sehr eng benachbart oder sind sogar identisch.

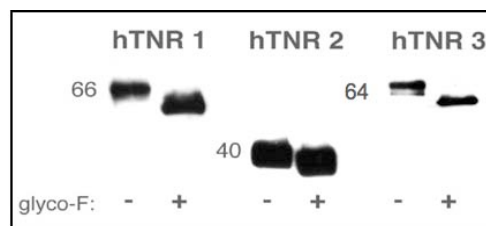
Basierend auf diesen Ergebnissen wurde R5, der an kein anderes Fragment als hTNR1 bindet, von der weiteren funktionellen Analyse ausgeschlossen, da sich in Kontrollansätzen bestätigte, dass seine Bindung an hTNR1 die gleichen Effekte nach sich zieht, wie die Bindung von R6.

### 3.2.2 Analysen der Glykosylierung von humanen TNR-Proteinfragmenten

TNR ist ein stark glykosyliertes Glykoprotein – ca. 20 kD seines Molekulargewichtes machen Kohlenhydrate aus (Pesheva et al., 1989). In vorangegangenen Studien konnte durch Analysen mit Lektinen und Kohlenhydrat-spezifischen Antikörpern gezeigt werden, dass TNR eine Reihe von komplexen N- und O-Glykanen exprimiert (Pesheva et al., 2006; Woodworth et al., 2004). Demnach enthalten TNR-Glykane im Vertebraten-ZNS insbesondere terminale Sialinsäure ( $\alpha(2-6)$  oder  $\alpha(2-3)$  an Gal $\beta$  oder GalNAc gebunden), Gal $\beta(1-4)$ GlcNAc und sulfatierte N-gebundene Oligosaccharidstrukturen wie HNK-1 (GlcUA-3-SO<sub>4</sub>) und GalNAc-4-SO<sub>4</sub>. Auf TNR höherer Vertebraten finden sich zudem O-gebundene GAG und Gal $\beta(1-3)$ -GalNAc. In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit die rekombinanten TNR-Fragmente, welche in humanen Zellen exprimiert wurden, das Glykosylierungsmuster des nativen Glykoproteins widerspiegeln.

Zunächst wurde eine N-Deglykosylierung mittels N-Glykosidase F (Roche) der Fragmente vorgenommen, um die Stärke der N-Glykosylierung anhand der Veränderung des Molekulargewichtes abschätzen zu können. Der Nachweis im Western Blot erfolgte mit den monoklonalen TNR-Antikörpern R6 (für hTNR1; nicht gezeigt) und R4 (für hTNR2 und hTNR3; nicht gezeigt) sowie mit dem monoklonalen V5-Antikörper, welcher gegen das V5-Epitop der rekombinanten Fragmente gerichtet ist (s. Abb. 12 S. 54).

Die Abb. 12 zeigt eine deutliche Änderung im Molekulargewicht nach N-Deglykosylierung bei hTNR1 (Shift um 14 kD) und hTNR3 (Shift um 11 kD), während hTNR2 nahezu gleich groß bleibt. Alle monoklonalen TNR-Antikörper erkennen die Fragmente auch nach N-Deglykosylierung (nicht gezeigt), was belegt, dass die Antikörper Proteinepitope und nicht etwa Kohlenhydratstrukturen erkennen.



**Abb. 12 Western Blot-Analysen der TNR-Fragmente hTNR1, hTNR2 und hTNR3 nach N-Deglykosylierung**

Aufgereinigte Proteinfragmente wurden nach Behandlung in An- und Abwesenheit von Glykosidase-F im Western Blot analysiert. Der Nachweis erfolgte mit dem V5-Antikörper. Jeweils links der Banden die entsprechenden Molekulargewichte in kD. - glyko-F, glykosyliert; + glyko-F, nach N-Deglykosylierung

Die Analyse der Kohlenhydratstrukturen erfolgte mittels Dot Blot- und Western Blot-Analysen mit Hilfe verschiedener Lektine und spezifischer Antikörper gegen bestimmte Kohlenhydratstrukturen – auch hier unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen, um eventuelle konformationsabhängige Lektin- und Antikörperbindungen zu untersuchen. Als Kontrollproteine dienten auch hier verschiedene native TNR-Präparationen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Fragment	hTNR1		hTNR2		hTNR3		TNR	
	gl.	degl.	gl.	degl.	gl.	degl.	gl.	degl.
Molekulargewicht (kD)	66	52	40	37	64	56	180	160
SA $\alpha$ (2–6)-Gal oder SA $\alpha$ (2–6)-GalNAc (SNA)	-	-	-	-	+	+	+	+
SA $\alpha$ (2–3)-Gal oder SA $\alpha$ (2–6)-Gal oder SA $\alpha$ (2–6)-GalNAc (MAA)	+	-	-	-	+	+	+	+
Gal $\beta$ (1–3)GalNAc (PNA)	-	-	-	-	-	-	+	+
Gal $\beta$ -(1–4)GlcNAc (DSA)	+	+	+	+	+	+	+	+
terminale $\alpha$ -D-Mannose oder $\alpha$ -D-Glukose (LCL)	-	+	+	+	+	+	+	+
GlcUA-3-SO <sub>4</sub> (HNK-1-Antikörper)	+	-	-	-	+	+	+	+
CS GAG (CS-56-Antikörper)	-	-	-	-	-	-	+	+

**Tabelle 3 Glykosylierung der Fragmente hTNR1, hTNR2 und hTNR3**

Zusammenfassung der Ergebnisse aus Western Blot-, ELISA- und Dot-Blot-Analysen. Oben die Molekulargewichte (in kD) der drei Fragmente hTNR1, hTNR2 und hTNR3 im glykosylierten (gl.) und im deglykosylierten (degl.) Zustand. Darunter die Reaktionen mit den einzelnen Lektinen und monoklonalen Antikörpern (in Klammern) und somit Nachweis von bestimmten Zuckerstrukturen. SA, Sialinsäure; Gal, Galaktose; GalNAc, N-Acetyl-Galaktosamin; SNA, Sambucus nigra agglutinin; MAA, Maackia amurensis agglutinin; PNA, Peanut agglutinin; GlcNAc, N-Acetyl-Glukosamin; DSA, Datura stramonium agglutinin; LCL, Lens culinaris Lektin; HNK-1, HNK-1-Kohlenhydratepitop; CS GAG, Chondroitinsulfat-Glykosaminoglykane; +, Reaktion; -, keine Reaktion.

Unter beiden untersuchten Bedingungen (reduzierend vs. nicht reduzierend) waren die Reaktionen der Lektine und Antikörper identisch. Es handelt sich demnach nicht um eine konformationsabhängige Bindung. Auf hTNR1 finden sich terminale Sialinsäure-Reste, N-Acetylglukosamin und das HNK-1-Kohlenhydratepitop. hTNR2 exprimiert Gal $\beta$ -GlcNAc und terminale Mannose (oder Glukose). hTNR3 ist modifiziert mit terminalen Sialinsäure-Resten, Gal $\beta$ -GlcNAc, terminalen Mannoseresten und dem HNK-1-Kohlenhydratepitop. Keines der Fragmente trägt N-Acetylgalaktosamin oder CS GAG. Bei allen drei Fragmenten finden sich demnach komplexe Glykosylierungsmuster wieder, welche jene des nativen TNR widerspiegeln.

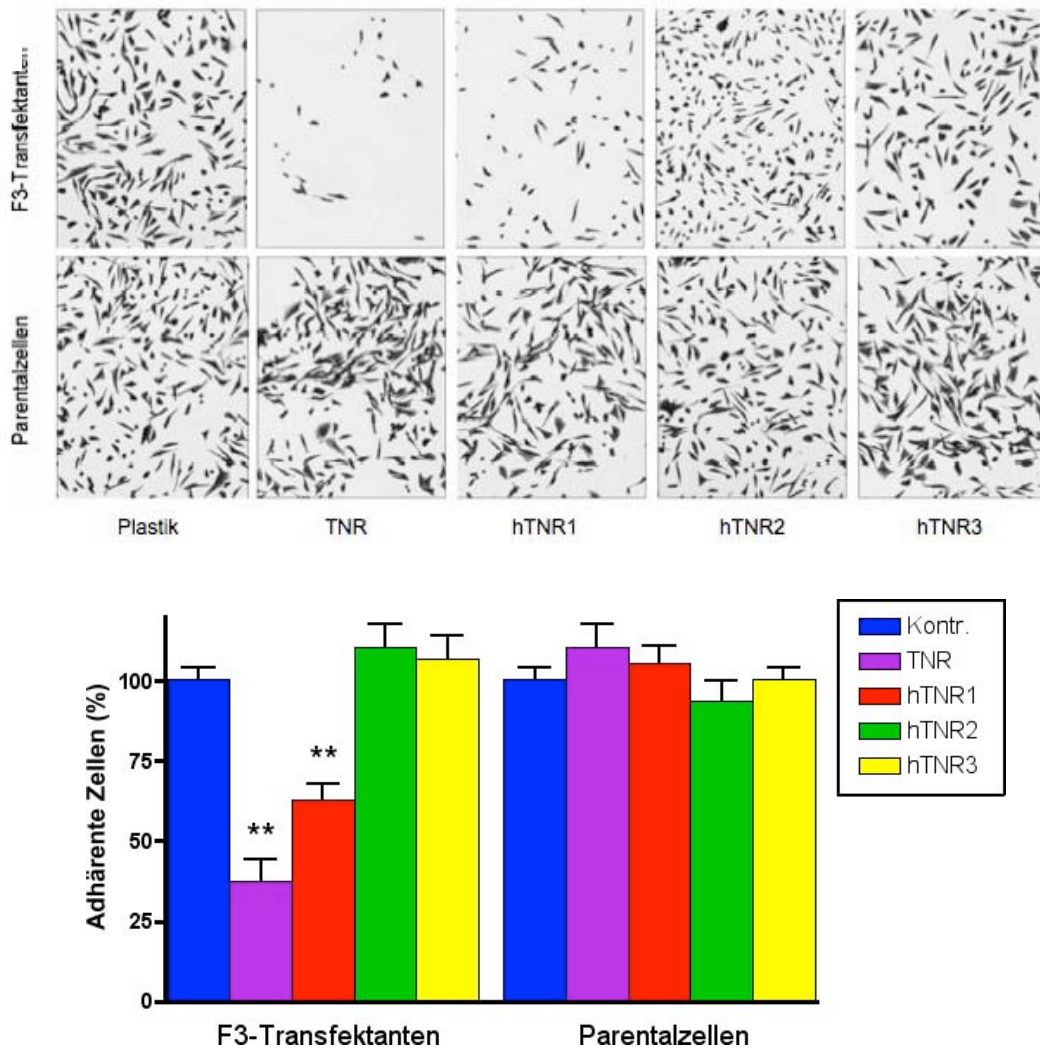
### **3.3 Funktionelle Charakterisierung humaner rekombinanter TNR-Proteinfragmente**

#### **3.3.1 Antiadhäsive Eigenschaften**

##### **3.3.1.1 Zelladhäsionsstudien mit F3/Contactin-Transfektanten**

Vorangegangene In vitro-Experimente haben gezeigt, dass gereinigte TNR-Proteine aus dem Nagerhirn antiadhäsiv für ZNS-Neurone sind und, angeboten als homogene Substrate kombiniert mit adhäsiven Molekülen (i.e. LN oder poly-L-Lysin (PLL)), Zellablösung und starke Faszikulation der Neuriten auslösen (Pesheva et al., 1989). Als ein neuronaler Rezeptor, der diese zelluläre Antwort auf TNR auslöst, wurde das GPI-verankerte Protein F3/Contactin identifiziert. Es findet sich als Oberflächenmolekül am Wachstumskegel und vermittelt ebenfalls die Inhibition des axonalen Wachstums in TNR-haltige Substratgebiete (Pesheva et al., 1993).

Trotz der großen Sequenzhomologie zwischen Hühner- und Ratten-TNR wurden bereits verschiedene Bindungsstellen für F3/Contactin beschrieben. Xiao et al. (1996) lokalisierten eine solche innerhalb der EGF-Domänen bei Ratten-TNR, Nörenberg et al. (1995) in den Domänen FN2-3 von Hühner-TNR. In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob die beschriebene Zellablösung und Neuritenfaszikulation über einen F3/Contactin-abhängigen Mechanismus vermittelt werden und wo sich die F3/Contactin-Bindungsstelle im humanen TNR-Molekül befindet. Dies sollte nun in Kurz- und Langzeit-Zelladhäsionsstudien untersucht werden. Dabei wurde die Zelladhäsion von F3/Contactin-transfizierten CHO-Zellen auf hTNR1 im Vergleich zu den nicht transfizierten Parentalzellen zunächst über 20 Stunden hinweg beobachtet (s. Abb. 13 S. 56). Natives TNR diene als Vergleich, die unbehandelte Plastikoberfläche als Kontrolle.



**Abb. 13** Langzeit Zelladhäsion der F3-Transfektanten auf den Fragmenten hTNR1, hTNR2 und hTNR3

(A) Adhärenz Zellen (F3-Transfektanten und CHO-Parentalzellen) auf Plastik (Kontrolle), TNR, hTNR1, hTNR2 und hTNR3. Die Zellen wurden zuvor mit Crystal Violet angefärbt.

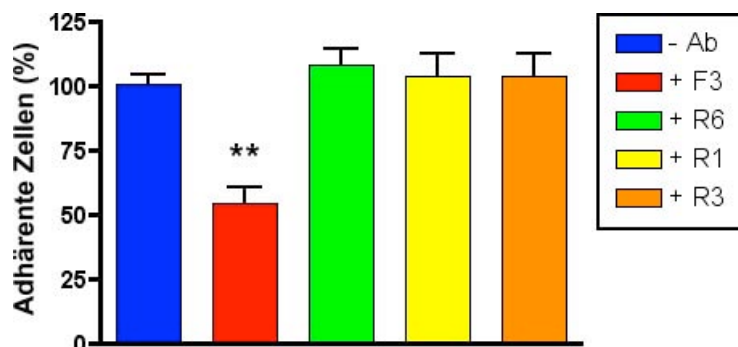
(B) Quantifizierung der Zelladhäsion (F3-Transfektanten vs. CHO-Parentalzellen) auf Plastik (Kontrolle), TNR, hTNR1, hTNR2 und hTNR3. Die Kontrolle wurde gleich 100%, alle anderen Werte damit in Relation gesetzt. \*\*,  $p < 0.01$  versus Kontrolle (Kontr.).

Es konnte gezeigt werden, dass natives TNR wie in früheren Studien durch Bindung an F3/Contactin die Zellabstoßung des F3-Transfektanten initiiert, die Adhäsion von nicht transfizierten CHO-Zellen aber unbeeinflusst bleibt (s. Abb. 13). Ähnliches geschieht bei hTNR1, die Zellabstoßung ist allerdings nicht so ausgeprägt wie bei TNR (30% bei hTNR1 vs. 70% bei TNR). hTNR2 und hTNR3 zeigen keinen Einfluss auf die Zelladhäsion. Die Effekte zeigen, dass es sich um eine F3-vermittelte Zellantwort handelt. Ähnlich wie das Gesamtmolekül vermittelt das hTNR1-Fragment eine F3/Contactin-abhängige Inhibierung der Zelladhäsion nach längeren Kultivierungszeiten.



An die Langzeitstudien wurden Kurzzeitstudien angeschlossen, um zu analysieren, ob die F3/Contactin-vermittelte Zellerkennung des hTNR1-Fragments auf die Interaktion mit F3/Contactin an der Zelloberfläche von F3-Transfektanten zurückzuführen ist. In vorausgegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass auf die Interaktion neuronaler Zellen mit TNR zunächst eine Adhäsion dieser Zellen folgt, welche erst nach einiger Zeit in ein Ablösen der Zellen umschlägt (Pesheva et al., 1993). Daraus folgte die Vermutung, dass es primäre, F3/Contactin-vermittelte Erkennungsmechanismen gibt, welche Signaltransduktionswege einleiten, die dann erst zu den antiadhäsiven Wirkungen führen. Da mit den oben beschriebenen Langzeitbindungsstudien die zelluläre Antwort nach der Ligand-Rezeptor-Bindung (also einem extrazellulären Signal, welches intrazelluläre Veränderungen hervorruft) analysiert wurde, sollten nun mit Kurzzeitbindungsstudien die primären Zellerkennungsmechanismen untersucht werden.

Um zu untersuchen, ob sich auf hTNR1 genau wie auf TNR tatsächlich eine F3/Contactin-Bindungsstelle befindet, wurde in diesen Kurzzeitadhäsionsstudien die Zelladhäsion der F3-Transfektanten auf hTNR1 im Vergleich zu den Parentalzellen in An- und Abwesenheit von F3- und monoklonalen TNR-Antikörpern untersucht (s. Abb. 14). In vorausgegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass der R6-Antikörper die Inhibition des axonalen Wachstums bei humanem TNR aufhebt, die TNR-Antikörper R1 und R3 jedoch keinen solchen Einfluss haben (Pesheva et al., 2006). Es sollte hier untersucht werden, ob das R6-Epitop von TNR der F3/Contactin-Bindungsstelle entspricht und somit an F3/Contactin-vermittelten Mechanismen beteiligt ist.



**Abb. 14 Einfluss von F3- und TNR-Antikörpern auf die Kurzzeitadhäsion (nach 60 min. in vitro) von F3-Transfektanten auf hTNR1**

Adhärenz Zellen (F3-Transfektanten vs. CHO-Parentalzellen) auf hTNR1 ohne Konkurrenz (-Ab; Kontrolle) bzw. auf hTNR1 mit Konkurrenz durch F3-, R6-, R1- und R3-Antikörper (+F3, +R6, +R1, +R3). Die Kontrolle wurde gleich 100%, alle anderen Werte damit in Relation gesetzt. \*\*,  $p < 0.01$  versus Kontrolle (- Ab).

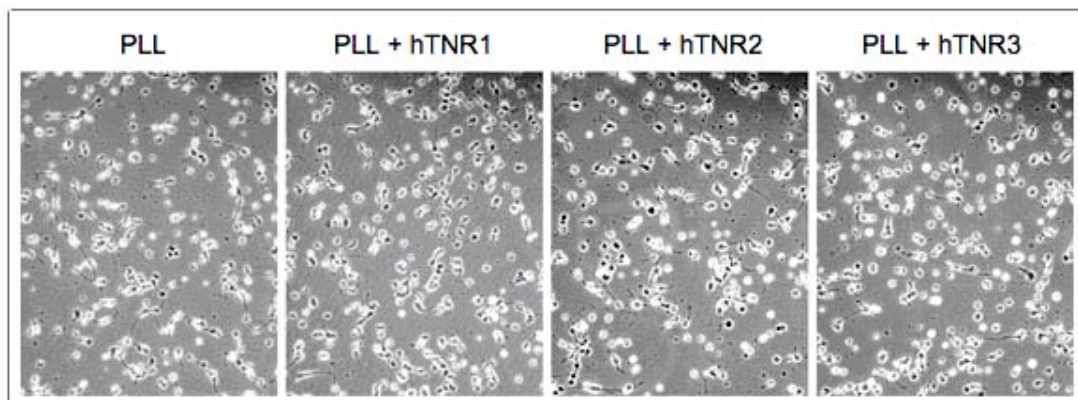
Die Zellen binden nach einer Stunde in Kultur gut an hTNR1 und TNR als Kontrolle (nicht gezeigt) (s. Abb. 13 S. 56). Zudem lässt sich erkennen, dass die F3/Contactin-vermittelte

Adhäsion des F3-Transfektanten an hTNR1 durch den F3-Antikörper stark abgeschwächt wird. Im Gegensatz dazu zeigt der F3-Antikörper keinen Effekt auf die Bindung der CHO-Parentalzellen (nicht gezeigt). Die monoklonalen TNR-Antikörper R1, R3 und R6 haben keinen Einfluss auf die Zellerkennung der F3-Transfektanten und der Parentalzellen.

### 3.3.1.2 Untersuchung der neuronalen Zelladhäsion und des axonalen Wachstums von Kleinhirnneuronen

In diesem Teil der Arbeit sollte festgestellt werden, welche Teile des TNR-Moleküls für die oben beschriebenen antiadhäsiven Eigenschaften für ZNS-Neurone verantwortlich sein könnten und ob es sich hierbei um einen F3/Contactin-vermittelten Mechanismus handelt.

Zunächst sollte die Langzeitadhäsion von Kleinhirnneuronen der Maus auf einem adhäsiven Substrat (PLL oder PDL), welches die verschiedenen TNR-Fragmente enthält, nach 24 h (nicht gezeigt) und 48 h in vitro untersucht werden. Im Vergleich wurde die Adhäsion auf dem nativen TNR-Molekül und nur auf PLL beobachtet (s. Abb. 15). Anschließend sollte das Neuritenwachstum nach 48 h in vitro anhand von Kleinhirn-Mikroexplantaten untersucht werden, welche ebenfalls auf PLL  $\pm$  TNR-Fragmente hTNR1, hTNR2 und hTNR3 kultiviert wurden (s. Abb. 16 S. 56).

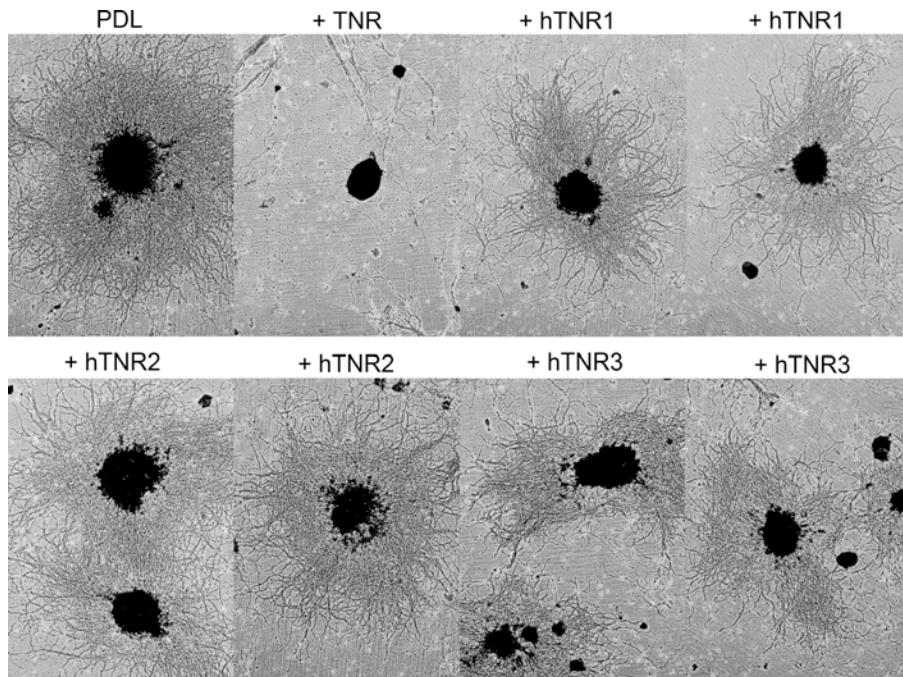


**Abb. 15** Langzeitadhäsion von Kleinhirnneuronen auf den Substraten PLL  $\pm$  hTNR1, hTNR2, hTNR3

Die Zellen wurden unter serumfreien Bedingungen kultiviert und nach 48 h in vitro lichtmikroskopisch analysiert.

Bei der Zelladhäsion der Kleinhirnneurone (s. Abb. 15) sind nach 24 bzw. 48 h in Gegenwart von adhäsiven Substraten (PLL) auf keinem der Fragmente, insbesondere auch nicht auf hTNR1, inhibitorische Wirkungen zu sehen. Bei der Untersuchung der Kleinhirn-Mikroexplantate (s. Abb. 16 S. 59) zeigt sich nach 48 h in vitro auf PDL ausgeprägtes Neuritenwachstum in alle Richtungen. Auch auf hTNR2 und hTNR3 erfolgt ein uneingeschränktes Wachstum der Neuriten, welches nicht von jenem auf PDL zu unterscheiden ist. Auf TNR-haltigem PDL-

Substrat hingegen erfolgt so gut wie kein Wachstum und die wenigen auswachsenden Neuriten weisen eine sehr starke Faszikulierung auf. Die inhibitorische und faszikulierende Wirkung des nativen TNR-Moleküls auf das Neuritenwachstum sind somit auch hier reproduzierbar. Auf dem hTNR1-Molekül erfolgt fast genauso gutes Neuritenwachstum wie auf den anderen Fragmenten und somit keine Faszikulierung und Inhibition des axonalen Wachstums.



**Abb. 16** Neuritenwachstum aus Kleinhirn-Mikroexplantaten auf den Substraten PDL  $\pm$  TNR, hTNR1, hTNR2 und hTNR3

Jeweils eine (PDL, TNR) bzw. zwei (hTNR1, hTNR2, hTNR3) repräsentative Aufnahmen des Neuritenwachstums aus Kleinhirn-Mikroexplantaten, die auf PDL  $\pm$  TNR-, hTNR1-, hTNR2- und hTNR3-Substraten für 48 h kultiviert wurden. Mikroexplantate wurden zuvor fixiert und mit Crystal Violet gefärbt.

### **3.3.1.3 Untersuchung der Zelladhäsion und des axonalen Wachstums neuronal differenzierter humaner Neuroblastomzellen**

In einem nächsten Schritt sollten Zelladhäsion und axonales Wachstum von humanen neuronalen Zellen untersucht werden, welche F3/Contactin nachgewiesenermaßen exprimieren. Hierfür wurden zunächst humane Neuroblastomzellen (SHSY5Y-Zellen) auf ihre F3/Contactin-Expression (135 kD) sowohl nach Kultivierung in serumhaltigem Medium als auch nach neuronaler Differenzierung unter definierten serumfreien Mediumbedingungen mittels RT-PCR- und Western Blot-Analysen untersucht (s. Abb. 17 S. 60), um festzustellen, ob unter serumfreien Bedingungen F3/Contactin exprimiert wird. Auf diese Weise sollten die Kulturbedingungen für die funktionellen Studien festgelegt werden. Anschließend wurde das zelluläre Verhalten und das Neuritenwachstum auf den TNR-Proteinfragmenten in An- und Abwesenheit (s. Abb. 19 S. 62) eines adhäsiven Substrats (PLL) untersucht.



**Abb. 17 RT-PCR und Western Blot-Analysen der F3/Contactin-Expression humaner Neuroblastomzellen (SHSY5Y) und humaner Gliomzellen (U373)**

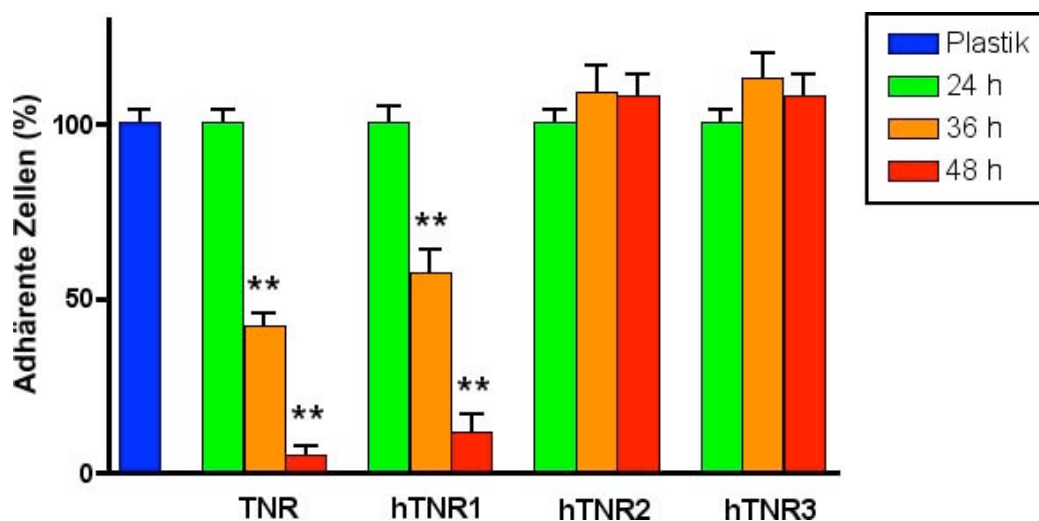
Links: RT-PCR-Analysen der F3/Contactin-Expression (214 bp) mittels hContactin-up- und -do-Primern. Die PCR erfolgte mittels GoTaq-Polymerase (s. Material und Methoden 2.2.1), die Analyse der PCR-Produkte in einem 1%igen Agarosegel. Die Pfeile kennzeichnen die entsprechenden Insertgrößen. M: Marker (100 bp DNA-Leiter); SH: SHSY5Y-Zellen; U 373: humane Gliomzellen.

Rechts: Western Blot-Analysen der F3/Contactin-Expression (135 KD) mittels Anti-F3-Antikörper. PLC: Phospholipase-C-Extrakt aus Rinderhirn (enthält die GPI-verankerten Proteine des Gehirns); U 373: humane Gliomzellen; SH: SHSY5Y-Zellen.

Die RT-PCR und Western Blot-Analysen zeigen, dass die humanen Neuroblastomzellen sowohl unter normalen Mediumbedingungen als auch unter definierten serumfreien Bedingungen (welche eine neuronale Differenzierung auslösen) F3/Contactin in vergleichbarer Menge (nur serumfreie Bedingungen gezeigt) exprimieren, die Gliomzellen hingegen nicht. Die F3/Contactin-negativen Gliomzellen U373 (Ponten et al., 1968) wurden bei den folgenden Studien als Kontrolle mitgeführt.

Parallel zu diesen Untersuchungen wurde die Kinetik der Zelladhäsion auf Plastik  $\pm$  TNR, hTNR1, hTNR2 und hTNR3 studiert, wobei die Zellzählung nach 24, 36 und 48 h in vitro erfolgte (s. Abb. 18 S. 61).

Die Zahl der Zellen auf Plastik (Kontrolle) blieb während des gesamten Beobachtungszeitraumes unverändert (in einem einzigen blauen Balken zusammengefasst). Auch bei den TNR-Fragmenten hTNR2 und hTNR3 findet keinerlei Inhibition der Zelladhäsion statt, die Zellzahl bleibt in etwa gleich. TNR hat einen eindeutigen inhibitorischen Effekt auf die Neuroblastomzelladhäsion. hTNR1 entfaltet auf Plastik eine vergleichbare und somit ebenfalls antiadhäsive Wirkung wie TNR. Im Gegensatz hierzu findet bei der Langzeit-Adhäsion der F3/Contactin-negativen U373-Gliomzellen auf TNR- und hTNR1-Substraten keine Zellablösung statt (nicht gezeigt).



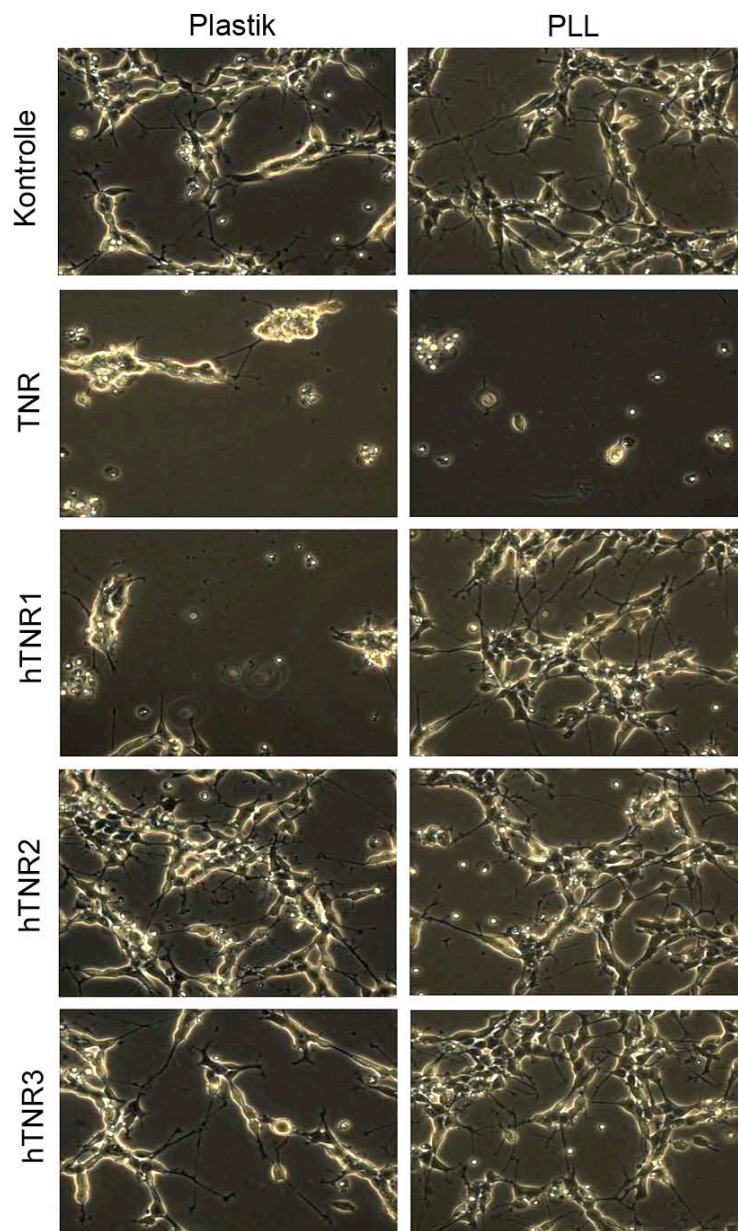
**Abb. 18 Kinetik der SHSY5Y-Zelladhäsion auf Plastik ± TNR, hTNR1, hTNR2, hTNR3**

Adhärente Zellen in Prozent nach 24, 36 und 48 h in vitro. Der Kontrollansatz (nur Plastik) wurde gleich 100% gesetzt, ebenso die Zahl der adhärenen Zellen nach 24 h in vitro. Alle anderen Werte wurden dazu in Relation gesetzt. \*\*,  $p < 0.01$  versus Kontrolle (Plastik).

In Gegenwart von adhäsivem Substrat (PLL) übt das Gesamtmolekül weiterhin seine inhibitorische Wirkung, wobei die Inhibition der Zelladhäsion noch schneller erfolgt, als ohne adhäsives Substrat (bereits nach 24 h sind kaum noch Zellen adhären; nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu zeigt sich bei hTNR1 in Kombination mit PLL keinerlei Inhibition der Zelladhäsion (s. Abb. 19 S. 62).

Bei beiden Kontrollansätzen (Plastik bzw. PLL; s. Abb. 19) erfolgen ausgeprägte Zelladhäsion und deutliches Neuritenwachstum. Wie bei den vorangegangenen Experimenten mit Kleinhirnneuronen zeigt sich weder auf Plastik noch auf PLL nach 48 h eine inhibitorische Wirkung von hTNR2 und hTNR3 auf Zelladhäsion und axonales Wachstum. Natives TNR hingegen zeigt eine deutliche inhibitorische Wirkung sowohl auf Plastik als auch auf PLL. Diese Wirkung äußert sich durch verschiedene Aspekte, einerseits durch die verminderte Zahl adhärenen Zellen, andererseits aber auch durch morphologische Veränderungen wie das Kollabieren von Wachstumskegeln und das Zusammenklumpen und Ablösen der Zellen (s. Abb. 19). hTNR1 entfaltet auf Plastik eine nicht ganz so starke, aber ebenfalls antiadhäsive Wirkung, die mit den gleichen morphologischen Erscheinungen einhergeht wie bei TNR (s. Abb. 19 links). Bei PLL-Vorbeschichtung hingegen wirkt hTNR1 in keiner Weise inhibitorisch (s. Abb. 19 rechts), ähnlich den Ergebnissen der Untersuchungen mit Kleinhirnneuronen. Die Ergebnisse hinsichtlich der F3/Contactin-TNR-Interaktion befinden sich derzeit in Vorbereitung zur Publikation (Baeßler et al., in Vorbereitung).





**Abb. 19 Analyse von Zelladhäsion und Neuritenwachstum humaner Neuroblastomzellen auf den TNR-Fragmenten hTNR1, hTNR2 und hTNR3**

Beschichtung der Fragmente auf Zellkulturplastik (Kontrolle: nur Plastik) (links) bzw. auf PLL-vorbeschichteten Zellkulturschalen (Kontrolle: nur PLL) (rechts). Die lichtmikroskopische Analyse erfolgte nach 48 h in vitro.

### 3.3.2 Adhäsive Eigenschaften

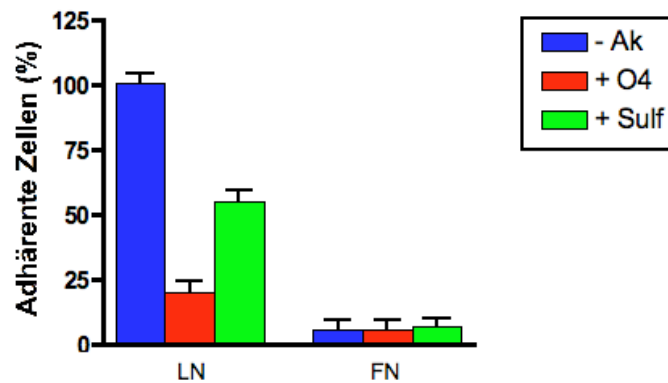
#### 3.3.2.1 Untersuchung der Sulfatid-vermittelten Interaktionen von Erythrozyten mit TNR-Fragmenten

In diesem Teil der Arbeit sollte die Grundlage der Wirkung der drei TNR-Fragmente auf OL als selektives Substrat und Differenzierungsfaktor untersucht werden. Da der TNR-Interaktion mit

OL wie bereits gezeigt ein Sulfatid-vermittelter Mechanismus zu Grunde liegt (Pesheva et al., 1997), sollte dieser zunächst durch Studien mit anderen Sulfatid exprimierenden Zellen, i.e. Erythrozyten (Hansson et al., 1978), untersucht werden. Die verwendeten Erythrozyten stammten von verschiedenen Spezies (Kaninchen, Ziege und Mensch) und wurden einer starken Trypsinisierung mit anschließender Fixierung unterzogen, um - befreit von den auf der Zellmembran vorhandenen Proteinen - als Modell für ausschließlich Glykolipid-vermittelte Interaktionen dienen zu können. Als Kandidat-Fragmente, die eine Sulfatid-Bindungsstelle enthalten können, wurden aufgrund von Sequenzvergleichen mit der potentiellen Sulfatid-Bindungsstelle, welche für LN (Li et al., 2005) beschrieben wurde, solche ausgewählt, die eine FNG-Domäne enthalten (hTNR2 und hTNR3). Zur Klärung der TNR-Sulfatid-Interaktionsmöglichkeiten sollte die Zellbindung von Erythrozyten auf TNR-Substraten, i.e. hTNR1, hTNR2, hTNR3 und nativem TNR, in An- und Abwesenheit löslicher Sulfatide und des O4-Antikörpers (welcher Sulfatide erkennt; Bansal, 1989) untersucht werden.

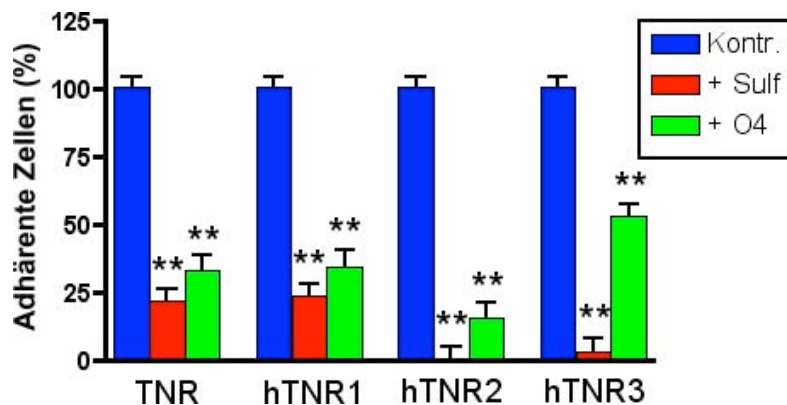
Für diese Zelladhäsionsstudien wurden zunächst die Erythrozyten verschiedener Spezies ausgetestet, um diejenigen mit der besten Bindung an die humanen Fragmente zu identifizieren. Nach Austesten von Ziegen-, Kaninchen- und humanen Erythrozyten stand fest, dass sowohl die Kaninchen- als auch die humanen Erythrozyten gut an die Substrate binden. Da die Kaninchen-Erythrozyten die beste und stabilste Bindung aufwiesen, wurden sie für die weiteren Studien ausgewählt. Während der ersten Wettbewerbsversuche wurden zusätzlich einige Negativ- und Positivkontrollen durchgeführt, um zu überprüfen, ob das gewählte System tatsächlich funktionsfähig ist. Da FN-Rezeptoren wie Integrine und PG, i.e. intakte Proteine auf der Zelloberfläche der behandelten Erythrozyten fehlen, dürfte - im Gegensatz zu unbehandelten Erythrozyten - keine Bindung auf FN-Substraten stattfinden. Bei Beschichtung von FN und BSA ist dementsprechend auch so gut wie keine Bindung der Erythrozyten an diese Substrate zu sehen (s. Abb. 20 S. 64). Auf LN-Substrat, welches eine Sulfatid-Bindungsstelle aufweist (Li et al., 2005), erfolgt eine starke Bindung der Erythrozyten, die durch Sulfatide und den O4-Antikörper kompetierbar ist (s. Abb. 20). Die Erythrozyten-Bindung ist somit eindeutig Sulfatid-vermittelt und die gewählte Versuchsmethode funktionsfähig.

Im Anschluss an die Kontrollversuche wurde nun die Zellbindung der Erythrozyten auf den TNR-Substraten, i.e. hTNR1, hTNR2, hTNR3 und nativem TNR, ebenfalls in An- und Abwesenheit löslicher Sulfatide und des O4-Antikörpers untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 21 S. 64 zusammengefasst.



**Abb. 20 Einfluss von O4-Antikörper und Sulfatiden auf die Erythrozyten-Bindung an LN und FN**

Prozentualer Anteil adhärenter Erythrozyten auf den Substraten LN (20 µg/ml) und FN (20 µg/ml) und Konkurrenz durch O4-Antikörper (+ O4; 1:30) und Sulfatide (+Sulf; 2 µg/ml). Der Kontrollansatz auf LN ohne Antikörperkonkurrenz (-Ak) wurde gleich 100%, alle anderen Werte dazu in Relation gesetzt.



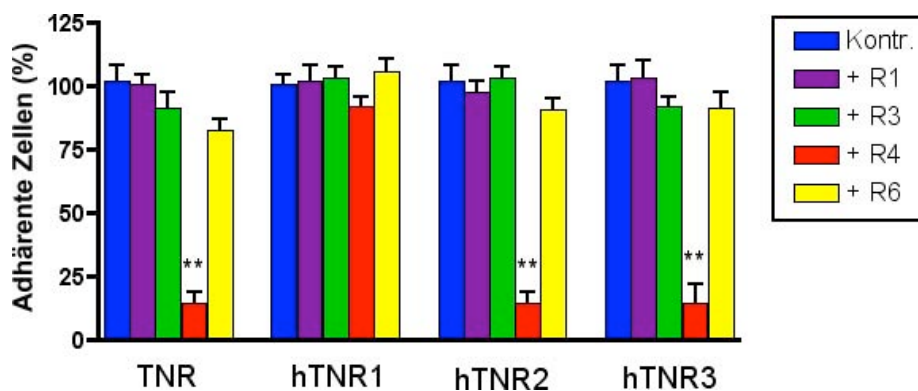
**Abb. 21 Einfluss von Sulfatiden und O4-Antikörper auf die Erythrozyten-Bindung an hTNR1, hTNR2 und hTNR3**

Prozentualer Anteil adhärenter Erythrozyten auf den Substraten TNR, hTNR1, hTNR2 und hTNR3 mit Konkurrenz durch Sulfatide (2 µg/ml) und O4-Antikörper (1:30). Der Kontrollansatz ohne Konkurrenten (Kontr.) wurde gleich 100%, alle anderen Werte dazu in Relation gesetzt. Sulf: Sulfatide; O4: O4-Antikörper. \*\*,  $p < 0.01$  versus Kontrolle (Kontr.).

Bei Konkurrenz mit Sulfatiden findet sich bereits bei geringen Konzentrationen des Konkurrenten auf allen Fragmenten und auf dem Gesamtmolekül eine eindeutig verminderte Zellbindung. Bei hTNR2 und hTNR3 ist diese Wirkung besonders ausgeprägt. Da bei hTNR2 die Zellbindung um 100% zurückgeht (bei hTNR3 ähnlich stark, was sich durch das hier ebenfalls enthaltene hTNR2-Fragment erklärt), lässt sich sagen, dass in der FNG-Domäne die Hauptbindungsstelle für Sulfatide liegt. Da auch bei hTNR1 die Zahl der adhärenter Erythrozyten bei Konkurrenz mit Sulfatiden in etwa genauso stark zurückgeht, wie bei nativem TNR, lässt sich schließen, dass sich in diesem Fragment eine zusätzliche Sulfatid-Bindungsstelle befindet. Die inhibitorische Wirkung des O4-Antikörpers untermauert diese Ergebnisse – er kompetiert bei allen Fragmenten die Zellbindung, auch hier besonders bei hTNR2, und bestätigt somit die Position der Sulfatid-Bindungsstellen.



Zusätzlich zu diesen Studien sollte die Interaktion der sechs monoklonalen TNR-Antikörpern mit den Sulfatid-vermittelten Mechanismen untersucht werden, um festzustellen, ob die Antikörper Epitope erkennen, welche an der Sulfatid-Bindung beteiligt sind. Hierzu wurden ebenfalls Zelladhäsionsstudien mit Erythrozyten durchgeführt, wobei zunächst die Antikörper R1, R3, R4 und R6 (R2 bindet nachweislich nicht an die drei Fragmente, weshalb er nach einigen Kontrollansätzen bei Seite gelassen wurde) mit den zuvor beschichteten Substraten inkubiert und dann die trypsinisierten Erythrozyten aufgebracht wurden. Die Bindung der Erythrozyten wurde anschließend lichtmikroskopisch analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 22 zusammengefasst.



**Abb. 22 Einfluss der monoklonalen TNR-Antikörper R1, R3, R4 und R6 auf die Erythrozytenbindung an TNR, hTNR1, hTNR2 und hTNR3**

Prozentualer Anteil adhärenter Erythrozyten auf den Substraten TNR, hTNR1, hTNR2 und hTNR3 ohne und mit Konkurrenz durch die monoklonalen Antikörper R1, R3, R4 und R6 (jeweils 50 µg/ml). Der Kontrollansatz ohne Kompetitoren (Kontr.) wurde gleich 100 %, alle anderen Werte dazu in Relation gesetzt. \*\*,  $p < 0.01$  versus Kontrolle (Kontr.).

Aus diesen Studien folgt, dass alleine R4 die Erythrozytenbindung an hTNR2 und hTNR3 (und auf dem Gesamtmolekül) fast vollständig blockiert. Keiner der anderen Antikörper kompetiert die Bindung an die drei Fragmente. Die Bindung an hTNR1 wird durch R4 ebenfalls geringfügig, jedoch nicht reproduzierbar beeinflusst. Diese Ergebnisse wurden auch in direkten Bindungsstudien im Labor bestätigt.

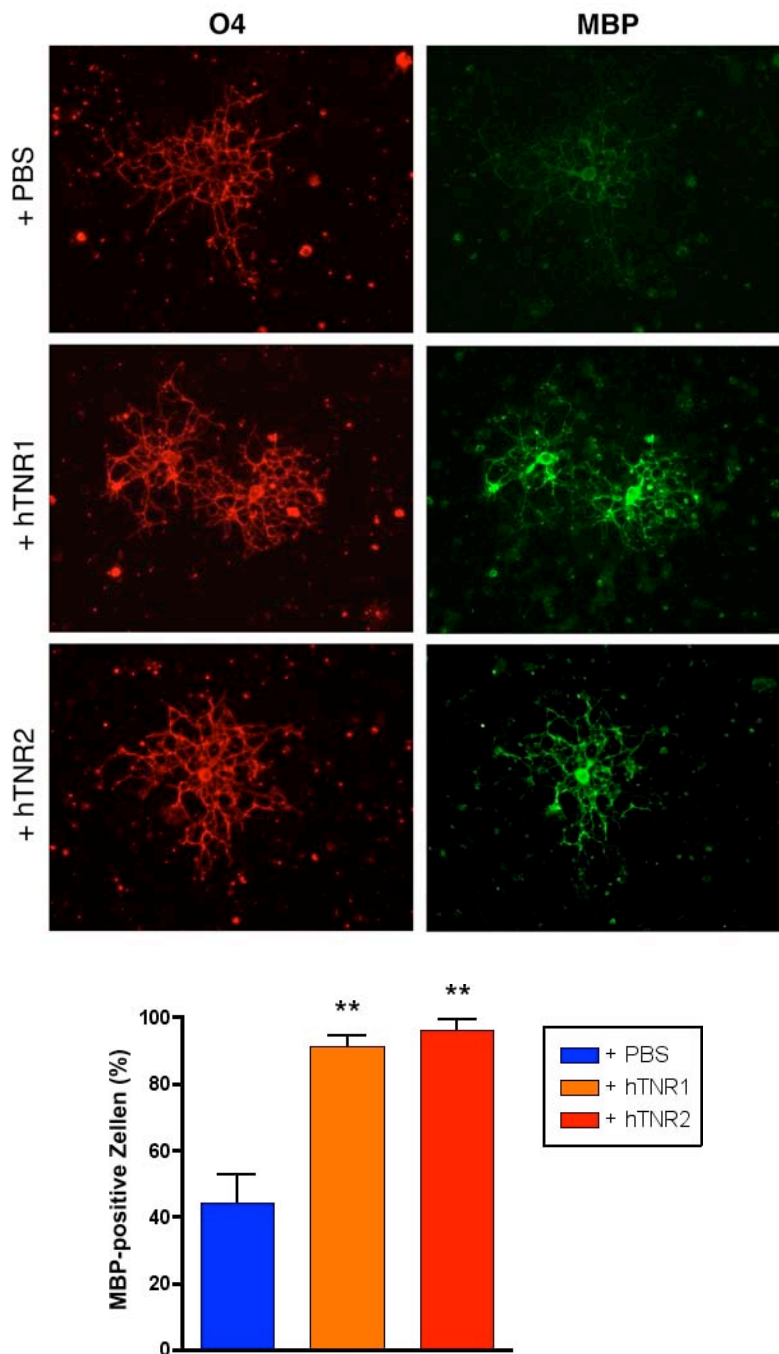
### 3.3.2.2 Einfluss humaner TNR-Fragmente auf die Differenzierung von Oligodendrozyten

Wie Pesheva und Mitarbeiter zeigen konnten, fördert TNR die Adhäsion und Fortsatzbildung von O4/Sulfatid<sup>+</sup> OL unabhängig von deren Alter und Abstammung (Pesheva et al., 1997). Dieser Prozess wird vermittelt durch membranassoziierte Sulfatide (s.o.). Eine weitere wichtige Folge der TNR-Interaktion mit Sulfatid exprimierenden OL ist die Stimulation ihrer Reifung, i.e. Hochregulation der Expression von TNR selbst, Glykolipiden und Myelinproteinen wie MBP, MAG und PLP, was einen autokrinen, TNR-induzierten und Sulfatid-vermittelten Mechanismus der OL-Differenzierung vermuten lässt (Pesheva et al., 1997). In diesem Teil der Arbeit sollte

diese differenzierungsfördernde Wirkung von TNR auf OL dahingehend untersucht werden, welcher Teil des TNR-Moleküls für diesen Effekt verantwortlich ist.

Da alle drei untersuchten TNR-Fragmente eine Sulfatid-Bindungsstelle enthalten und hTNR2 den Teil des hTNR3-Moleküls beinhaltet, in welchem die Sulfatid-Bindungsstelle liegt (s. Domänenstruktur S. 29), wurden für diese Studien die beiden Fragmente hTNR1 und hTNR2 verwendet. Kleinhirnzellen von 6 oder 7 Tage alten Mäusen wurden in Kultur genommen. Die beiden TNR-Fragmente und eine Mischung aus hTNR1 und hTNR2 (um zu sehen, ob sich eine mögliche Wirkung potenzieren lässt) wurden zum einen auf Plastikschaalen vorbeschichtet und zum anderen löslich zu den Kleinhirnzellkulturen hinzugegeben. Nach 2 und 4 Tagen wurden das Wachstum der OL, ihre Morphologie und die Expression von MBP als Marker für Myelinbildende OL und damit ihrer Differenzierung mittels Doppelfluoreszenzfärbung mit O4- und MBP-Antikörpern analysiert (der O4-Antikörper erkennt Sulfatide, und färbt somit alle OL an) (s. Abb. 23 S. 67).

Bei der Färbung mit dem O4-Antikörper zeigen sich auf allen Substraten OL mit ausgedehnten Fortsätzen. Die auf den beiden TNR-Fragmenten kultivierten OL haben jedoch eine reifere Morphologie, gekennzeichnet durch die Ausbildung eines dichten Netzwerks von Myelinmembranen, welches für reife, myelinbildende OL charakteristisch ist (s. Abb. 23 A S. 67). Entsprechend zeigt sich bei der Doppelfärbung mit MBP, dass die in Gegenwart der beiden TNR-Fragmente kultivierten OL - im Gegensatz zum Kontrollansatz (mit etwa 40% MBP-positiven Zellen) – eine deutlich erhöhte MBP-Expression aufweisen (s. Abb. 23 B) (nach 2 Tagen etwa 80% der OL; nicht gezeigt und nach 4 Tagen 90% auf hTNR1, annähernd 100% auf hTNR2). Die potenteste Wirkung auf die OL-Differenzierung hat demnach das hTNR2-Fragment mit fast 100% MBP-positiver OL nach 4 Tagen in Kultur. Daraus lässt sich schließen, dass dieses Sulfatid-bindende Fragment alleine ausreicht, um eine fast vollständige Differenzierung der OL hervorzurufen. Bei der Kombination der beiden TNR-Fragmente (hTNR1 + hTNR2) zeigte sich im Gegensatz zur alleinigen Kultur auf dem hTNR2-Fragment keine weitere Potenzierung der MBP-Expression (nicht gezeigt).



### Abb. 23 Einfluss von TNR-Fragmenten auf die Differenzierung von OL des Kleinhirns

Kleinhirnkulturen wurden für 4 Tage in Abwesenheit (+ PBS, Kontrollansatz) oder Anwesenheit von hTNR1 (+ hTNR1) und hTNR2 (+ hTNR2) kultiviert und die Expression des Myelinproteins MBP mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit O4 und MBP Antikörpern untersucht.

(A) O4- (rot, links) und MBP-Expression (grün, rechts) von OL in Ab- oder Anwesenheit von hTNR1 und hTNR2. Im Gegensatz zum Kontrollansatz, zeigen die in Gegenwart von hTNR-Fragmenten kultivierten OL eine deutlich erhöhte MBP-Expression und ausgeprägtes Membranennetzwerk.

(B) Quantifizierung der MBP-exprimierenden OL in Ab- oder Anwesenheit von hTNR1 und hTNR2. Die Anzahl MBP-positiver OL wurde in Relation zu O4-positiven Zellen (alle OL) gesetzt. Werte (in %) zeigen Mittelwerte von O4/MBP-positiven OL in mindestens 10 mikroskopischen Feldern. Hierbei war die MBP-Expression in doppelmarkierten Zellen im Kontrollansatz (+ PBS) deutlich schwächer als in Anwesenheit der Fragmente. \*\*,  $p < 0.01$  versus PBS.

Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Interaktion der beiden Fragmente hTNR1 und hTNR2 mit OL die Differenzierung und damit die funktionelle Reifung dieser Zellen induziert wird. Ob die beiden TNR-Fragmente auch für die in der Einleitung beschriebenen Fähigkeiten des TNR-Moleküls auf die OL-Selektion mitverantwortlich sind, wurde von Prof. Pesheva bereits weitgehend untersucht (Pesheva und Baeßler, in Vorbereitung).

## 4 Diskussion

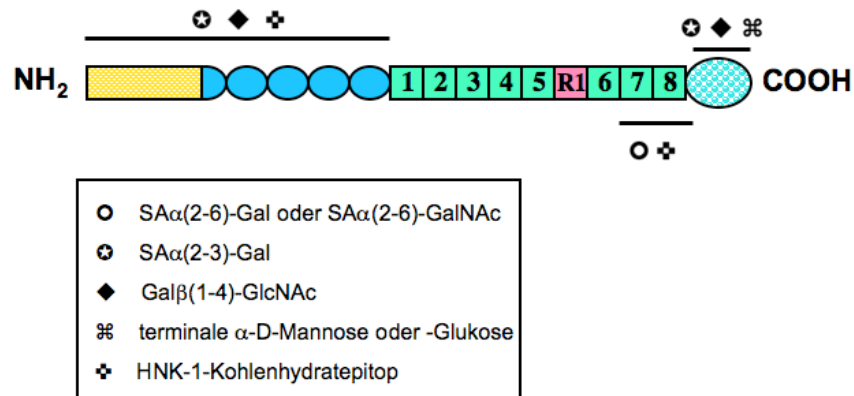
### 4.1 Strukturelle und biochemische Analyse humaner TNR-Fragmente

Mit der vorliegenden Arbeit ist es zum ersten Mal gelungen, Teile des humanen TNR-Proteins mittels TOPO/TA-Klonierung und des FlpIn-Expressionssystems als rekombinante Proteinfragmente herzustellen und funktionell zu charakterisieren. Die Vorteile des verwendeten Expressionssystems bestehen darin, dass durch die Expression von Tags (welche auf allen Fragmenten vorhanden sind) die einzelnen Fragmente eindeutig identifiziert (V5-, 6xHis-Tag) und für weitere strukturelle und funktionelle Charakterisierung aufgereinigt werden konnten (6xHis-Tag). Zudem konnte gezeigt werden, dass die auf diese Weise in reiner Form sekretierten löslichen Proteinfragmente adäquat glykosyliert und natürlich gefaltet sind, was sie von bisherigen Studien mit bakteriellen TNR-Fragmenten, etwa von Nörenberg und Kollegen (Nörenberg et al., 1995), unterscheidet. Nicht zuletzt ihre funktionelle Aktivität trägt dazu bei, dass die Bindungsstellen für monoklonale TNR-Antikörper und jene der für diese Arbeit relevanten Rezeptoren identifiziert werden konnten.

Die strukturelle Analyse der drei aufgereinigten Proteinfragmente hTNR1, hTNR2 und hTNR3 ergab, dass diese die Struktur des nativen Proteins (Nörenberg et al, 1993; Pesheva et al., 1989) widerspiegeln. Durch Analyse des Molekulargewichts der drei Proteinfragmente unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen konnte gezeigt werden, dass sich das Molekulargewicht des hTNR1-Fragments unter nicht reduzierenden Bedingungen nahezu verdreifacht, während die anderen beiden Fragmente ihr Molekulargewicht beibehalten. Daraus lässt sich schließen, dass das N-terminale Fragment hTNR1 wie das native TNR 180-Molekül Trimere bildet.

Die Analyse der Kohlenhydratstrukturen auf den Fragmenten zeigt, dass die Cys-EGF- (hTNR1) und FN7-8-FNG-Domänen (hTNR3) stark glykosyliert sind, während sich in der FNG-Domäne (hTNR2) weniger Kohlenhydratstrukturen befinden. Diese Ergebnisse werden durch die Analyse der Primärstruktur (Carnemolla et al., 1996) und der potentiellen N-Glykosylierungsstellen des TNR-Moleküls bestätigt; während sich in der Cys-EGF- und in der FN7-8-Domäne jeweils vier potentielle Glykosylierungsstellen befinden, trägt in der FNG-Domäne lediglich eine Glykosylierungsstelle Zuckerstrukturen. Welche und wie viele der übrigen Glykosylierungsstellen tatsächlich Kohlenhydratstrukturen tragen, ist derzeit noch unklar.

Es lässt sich jedoch sagen, dass sich bei allen drei Fragmenten komplexe Glykosylierungsmuster wiederfinden, welche jene des nativen TNR widerspiegeln. Sialinsäure  $\alpha(2-6)$ -gebunden an Galaktose oder GalNAc wird ausschließlich von den Domänen FN7-8 exprimiert (s. Abb. 24). Sialinsäure  $\alpha(2-3)$  gebunden an Galaktose und Gal $\beta(1-4)$ GlcNAc hingegen findet sich sowohl in der Cystein-EGF- als auch in der FNG-Domäne. Terminale Mannose (oder Glukose) wird in der FNG-Domäne exprimiert und HNK-1 in der Cystein-EGF-Domäne und in FN7-8.



**Abb. 24 Position der einzelnen TNR-Fragmente und der gebundenen Kohlenhydratstrukturen**

Zusammenfassung der Ergebnisse aus Western Blot-, ELISA- und Dot-Blot-Analysen. Für Erläuterungen zur Domänenstruktur von TNR s. Abb. 6 S. 29.

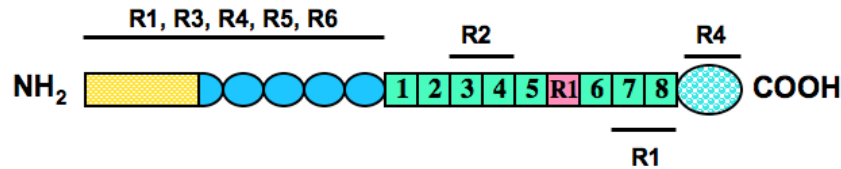
Die Ergebnisse bezüglich des Glykosylierungsmusters haben nicht nur strukturelle, sondern auch funktionelle Bedeutung, da die identifizierten Kohlenhydratstrukturen an den vielfältigen Funktionen des TNR-Moleküls beteiligt sein könnten. So ist etwa das phylogenetisch stark konservierte HNK-1-Kohlenhydratepitop (Pesheva et al., 2006), welches von verschiedenen Glykoproteinen des Nervensystems (Kruse et al., 1984) und besonders ausgeprägt von TNR (Woodworth et al., 2004) exprimiert wird, an axonalem Wachstum, Synaptogenese und Gedächtnisbildung beteiligt (Bukalo et al., 2007; Saghatelian et al., 2003; Yamamoto et al., 2002). Da TNR mit verschiedenen Komponenten der ECM interagiert und je nach Kontext das Neuritenwachstum entweder fördert oder inhibiert, könnte seine hochgradig regulierte Modifikation mit sulfatierten Strukturen wie dem HNK-1-Kohlenhydratepitop die beschriebenen adhäsiven und antiadhäsiven Eigenschaften von TNR modulieren und eine Rolle bei der Erkennung durch Kohlenhydrat-spezifische Zelloberflächenrezeptoren und/oder ECM-Moleküle während der normalen ZNS-Entwicklung und bei Verletzungen spielen (Woodworth et al., 2004). Doch nicht nur das HNK-1-Epitop ist für seine wichtige Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung neuronaler Strukturen bekannt, sondern auch andere von TNR exprimierte Kohlenhydratstrukturen. Negativ geladene Kohlenhydrate wie etwa Sialinsäure beeinflussen die axonale Zielfindung im ZNS durch antiadhäsive Effekte und sind somit an morpho-

regulatorischen und Reparaturprozessen beteiligt (Tai und Zipser, 1998). Neutrale, Galaktose enthaltende Glykane vermitteln nicht nur die axonale Zielfindung, sondern spielen auch eine Rolle bei späten Stadien der Synapsenbildung (Inoue und Sanes, 1997).

All diese Kohlenhydratmodifizierungen wurden in der vorliegenden Arbeit auf dem Molekül lokalisiert, um diese in Zukunft entsprechend den funktionellen Erkenntnissen über die einzelnen TNR-Fragmente weitergehend zu analysieren. Nicht zuletzt aus diesem Grund sind Studien, welche bakterielle TNR-Fragmente (wie z.B. von Nörenberg et al., 1995 und Xiao et al., 1996) verwenden, kritisch zu betrachten, da diese eine andere Faltung und vor allem keine Glykosylierung aufweisen, und sich deren Ergebnisse somit nicht direkt auf den Organismus Mensch übertragen lassen.

Des Weiteren ist es mit dieser Arbeit erstmalig gelungen, die Bindungsstellen der sechs monoklonalen TNR-Antikörper auf dem TNR-Molekül zu lokalisieren. Da die monoklonalen TNR-Antikörper genauso wie der V5-Antikörper auch nach N-Deglykosylierung (s. 2.2.3.11 S. 39) an die Fragmente binden, ist sichergestellt, dass die TNR-Antikörper Proteinepitope (und keine Zuckerstrukturen) erkennen. Es konnte gezeigt werden, dass die Mehrzahl der Antikörper im N-terminalen Bereich (Cys-EGF-Domäne) binden (R1, R3, R5, R6), wobei die Untersuchung zur topographischen Proximität der Bindungsstellen von R1/R3 und R5/R6 in der Cys-EGF-Domäne ergab, dass die Epitope von R1 und R3 dort eng benachbart liegen, aber nicht identisch sind. Die Epitope von R5 und R6 hingegen liegen sehr eng benachbart oder sind sogar identisch. Da der R3-Antikörper nur unter nicht reduzierenden Bedingungen mit der Cys-EGF-Domäne reagiert, kann man schließen, dass er seine Bindung konformationsabhängig entfaltet. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass sich die Bindungsstelle für R1 in der Cys-EGF-Domäne und in den Domänen FN7-8 befindet (s. Abb. 25 S. 72). Die R3-Bindungsstelle ist in der Cys-EGF-Domäne lokalisiert. Die R4-Bindungsstelle liegt zum einen in der Cys-EGF-Domäne und zum anderen in der FNG-Domäne, es existieren also zwei R4-Bindungsstellen auf dem TNR-Molekül. Das R4-Epitop in der Cys-EGF-Domäne ist allerdings, im Gegensatz zu dem in der FNG-Domäne, zum einen konformationsabhängig, da der Antikörper nur unter nicht reduzierenden Bedingungen und damit SS-Brücken-abhängig seine Bindung entfaltet und zum anderen offenbar schwer zugänglich, da die Bindung nicht immer reproduzierbar war. Die Bindungsstellen für R5 und R6 sind beide in der Cys-EGF-Domäne lokalisiert (Abb. 25). Das R2-Epitop muss sich aufgrund der negativen Reaktion mit den drei Fragmenten und weiteren Analysen unabhängig der vorliegenden Arbeit in den Domänen FN3-4 befinden. In welcher Region genau (Cys- oder EGF-Domäne) sich die Bindungsstellen für R1, R3, R5 und R6

befinden, muss weiter geklärt werden (über die Herstellung weiterer definierter Moleküldomänen oder Domänenteile, was derzeit Gegenstand der Forschung ist).



**Abb. 25 Position der einzelnen Fragmente und der Epitope von monoklonalen TNR-Antikörpern R1 – R6**

Zusammenfassung der Ergebnisse aus Western Blot-, ELISA- und Dot-Blot-Analysen. Für Erläuterungen zur Domänenstruktur von TNR s. Abb. 6 S. 29.

Kürzlich wurde beschrieben, dass die monoklonalen TNR-Antikörper R1, R5 und R6 mit allen getesteten Vertebraten-Spezies (darunter verschiedene Fische, Amphibien, Reptilien, Vögel und Säugetiere) kreuzreaktiv sind (Pesheva et al., 2006). R2-R4 hingegen reagierten vor allem mit TNR höherer Vertebraten. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Epitope für R1, R5 und R6 phylogenetisch stark konserviert sind. Diese Tatsache spricht dafür, dass die von diesen Antikörpern erkannten Epitope möglicherweise eine wichtige funktionelle Bedeutung haben; es wird vermutet, dass die Epitope an den inhibitorischen Effekten von TNR auf Zelladhäsion und axonales Wachstum beteiligt sind (Pesheva et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Antikörper keinen Einfluss auf die F3/Contactin-vermittelten inhibitorischen Effekte von TNR haben; ob sie mit anderen, noch zu untersuchenden inhibitorischen Prozessen interagieren, muss weitergehend untersucht werden.

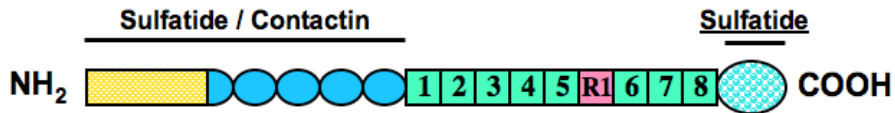
#### 4.2 F3/Contactin-Bindungsstelle(n) auf dem humanen TNR

Bei der Untersuchung der antiadhäsiven, F3/Contactin-vermittelten Eigenschaften von TNR ist es erstmals gelungen, die F3/Contactin-Bindungsstelle auf dem humanen Molekül zu lokalisieren und die Effekte ihrer Interaktion mit den entsprechenden Liganden zu analysieren.

Verschiedene Bindungsstellen für F3/Contactin wurden bereits beschrieben; so lokalisierten Xiao et al. (Xiao et al., 1996) eine solche innerhalb der Cys-EGF-Domänen bei Ratten-TNR, Nörenberg et al. (Nörenberg et al., 1995) in den Domänen FN 2-3 von Hühner-TNR. Mit Hilfe der durchgeführten Zelladhäsionsstudien mit F3/Contactin-Transfektanten und F3/Contactin-exprimierenden humanen Neuroblastomzellen konnte gezeigt werden, dass die Cys-EGF-Domäne ähnlich wie das Gesamtmolekül eine F3/Contactin-abhängige Inhibierung der Zelladhäsion nach längeren Kultivierungszeiten vermittelt. Ähnlich wie bei Ratten-TNR lässt sich die F3/Contactin-Bindungsstelle in der Cys-EGF-Domäne lokalisieren (s. Abb. 26 S. 73). Ob sich



die Bindungsstelle tatsächlich innerhalb der EGF-Domänen befindet, wird zur Zeit mit Hilfe der Herstellung weiterer definierter Domänenteile überprüft.



**Abb. 26 Domänenstruktur des humanen TNR mit Position der einzelnen Fragmente und der F3/Contactin- und Sulfatid-Bindungsstellen**

Unterstrichen ist die Hauptbindungsstelle für Sulfatide. Erläuterung der Domänenstruktur s. Abb. 6 S. 29.

Die Interaktion der Cys-EGF-Domäne mit F3/Contactin alleine reicht jedoch nicht aus, um die vollständige inhibitorische Wirkung des Gesamtmoleküls, insbesondere in Kombination mit adhäsiven Substraten, zu erreichen. Dies zeigt die Tatsache, dass die Cys-EGF-Domäne in Gegenwart von adhäsiven Substraten (PLL) keinerlei inhibitorische Wirkung besitzt (wie anhand des ausgeprägten Neuritenwachstums aus Kleinhirn-Mikroexplantaten nachzuweisen war). Die Bindung von F3/Contactin an die Cys-EGF-Domäne verursacht die beschriebene inhibitorische Wirkung des Gesamtmoleküls demnach mit, kann diese allerdings in Gegenwart von adhäsiven Substraten nicht alleine auslösen – hierfür sind weitere Interaktionen nötig.

Aus vorausgegangenen Studien ging hervor, dass es primäre, F3/Contactin-vermittelte Erkennungsmechanismen gibt, welche erst über Signaltransduktionswege zu den beobachteten antiadhäsiven Wirkungen führen (Pesheva et al., 1993). Mit Hilfe der in Kurzzeit-Zelladhäsionsstudien gezeigten Bindung der F3-Transfektanten an die Cys-EGF-Domäne, der Inhibition dieser Bindung durch den F3-Antikörper sowie der kinetischen Studien mit humanen Neuroblastomzellen konnte diese Interaktion bestätigt werden. Zwar bewirkt die Bindung der Cys-EGF-Domäne an F3/Contactin initiale Adhäsionsprozesse, jedoch ist an der für eine vollständige Inhibition notwendigen Signalkette zumindest noch ein weiterer Rezeptor oder eine zusätzliche F3/Contactin-Bindungsstelle auf TNR beteiligt. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass der monoklonale TNR-Antikörper R2 mit der F3/Contactin-vermittelten Zellerkennung durch Säuger-TNR interferiert (Pesheva et al., 2006). Da im ersten Teil dieser Arbeit die Bindungsstelle von R2 auf TNR auf die FN-Domänen 3-4 eingegrenzt werden konnte, könnte eine weitere für die untersuchten Prozesse relevante Bindungsstelle in diesem Molekülbereich liegen (wie von Nörenberg et al. 1995 für Hühner-TNR beschrieben). Diese Frage muss mit Hilfe FN3-4-spezifischer Fragmente geklärt werden.

Für den R6-Antikörper konnte bereits gezeigt werden, dass er die Inhibition des axonalen Wachstums bei humanem TNR aufhebt, allerdings keinen Einfluss auf die F3/Contactin-abhängige Zellerkennung hat (Pesheva et al., 2006). Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit auf Fragment-Niveau bestätigt werden. Demnach interagiert das R6-Epitop nicht mit den F3/Contactin-abhängigen Mechanismen, sondern mit anderen, noch zu untersuchenden inhibitorischen Prozessen. Diese Tatsache spricht ebenso für das Vorhandensein weiterer, an den inhibitorischen Wirkungen von TNR beteiligter Bindungsstellen und/oder eventuell bisher noch unbekannter Liganden.

Ein solcher Ligand könnte zum Beispiel Phosphacan sein, welches an die EGF-Domänen von TNR bindet (Milev et al., 1998). Phosphacan, das in zwei Isoformen vorkommt (Klausmeyer et al., 2007), ist ein von glialen und neuronalen Zellen produziertes CSPG und stellt eine extrazelluläre Spleißvariante der Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatase-beta/zeta (RPTPbeta/zeta) dar (Milev et al., 1994). Es ist an Zell-ECM-Interaktionen in Bezug auf Myelinisierung, axonales Wachstum und Zellmigration im sich entwickelnden ZNS beteiligt (Heck et al., 2005). Die kurze Isoform von Phosphacan (PSI) interagiert mit den neuronalen Rezeptoren L1 und F3/Contactin und spielt so eine Rolle beim axonalen Wachstum kortikaler Neurone. Welche Wirkung die Interaktion von Phosphacan mit den EGF-Domänen von TNR verursacht und ob eine solche Interaktion an den beobachteten inhibitorischen Eigenschaften von TNR beteiligt sein könnte, bleibt derzeit Gegenstand der Forschung.

#### **4.3 Sulfatid-Bindungsstelle(n) und TNR-vermittelte Differenzierung von Oligodendrozyten**

Im letzten Teil der Arbeit konnte mit der Untersuchung der Sulfatid-vermittelten Eigenschaften des TNR-Moleküls erstmalig die Sulfatid-Bindungsstelle, welche für die adhäsiven Effekte von TNR und dessen Wirkung auf OL mitverantwortlich ist, auf dem Molekül lokalisiert werden (s. Abb. 26 S. 73).

Aus den Bindungsstudien mit Erythrozyten als Modell für Sulfatid-vermittelte Prozesse geht hervor, dass zwei Sulfatid-Bindungsstellen auf dem humanen TNR-Molekül existieren. Die Hauptbindungsstelle befindet sich in der FNG-Domäne (s. Abb. 26 S. 73), da hier bereits bei geringen Konzentrationen von Sulfatiden bzw. O4-Antikörper als Kompetitoren keine Zellbindung mehr stattfindet. Die Tatsache, dass die Zellbindung auch in der Cys-EGF-Domäne durch Sulfatide und den O4-Antikörper kompetierbar ist, spricht dafür, dass dort eine zusätzliche Sulfatid-Bindungsstelle lokalisiert ist. Wo genau sich diese Bindungsstelle befindet, wird zur Zeit weitergehend mittels definierter Domänenteile untersucht. Die Konkurrenz der Erythrozyten-

bindung an die FNG-Domäne durch Sulfatide und den O4-Antikörper wird durch den R4-Antikörper fast vollständig aufgehoben, was darauf hindeutet, dass der R4-Antikörper mit der Sulfatid-Bindungsstelle interagieren bzw. mit den Sulfatid-abhängigen Mechanismen interferieren könnte. Da bei der Cys-EGF-Domäne der R4-Antikörper die Konkurrenz gelegentlich, jedoch nicht reproduzierbar aufhebt, muss davon ausgegangen werden, dass die Sulfatid-Bindungsstelle der Cys-EGF-Domäne abhängig von der Konformation des Moleküls und somit nicht immer zugänglich ist.

Die soweit durchgeführten funktionellen Studien zum Einfluss der TNR-Fragmente auf die Differenzierung von OL deuten darauf hin, dass sowohl die FNG- als auch die Cys-EGF-Domänen die Differenzierung von OL *in vitro* induzieren, was sich durch eine Potenzierung der MBP-Expression und ausgeprägte Fortsatzbildung manifestiert. Diese möglicherweise differenzierungsfördernde Wirkung, welche bereits 1997 von Pesheva und Mitarbeitern für das Gesamtmolekül beobachtet wurde (Pesheva et al., 1997), könnte auf die Interaktion der in dieser Arbeit beschriebenen Sulfatid-Bindungsstellen auf den untersuchten TNR-Fragmenten mit sulfatierten Glykolipiden an der Zelloberfläche unreifer OL zurückzuführen sein.

Aus Studien von Coetzee und Mitarbeitern geht hervor, dass Sulfatide und Galaktocerebroside (GalC) essentiell für die Myelindestabilität sind. Sie fanden heraus, dass UDP-Galaktose/Ceramid-Galaktosyltransferase-defiziente Mäuse (dieses Enzym ist für die GalC- und Sulfatid-Synthese notwendig) unter generalisiertem Tremor und Leistungsdefiziten sowie unter schweren Funktionseinbußen der Myelinscheiden leiden (Coetzee et al., 1996). Das Vorhandensein von Sulfatiden und GalC ist demnach ein kritischer Parameter für die Myelinisierung im ZNS. Neuere Studien mit Sulfatid- (jedoch nicht GalC-) defizienten Mäusen belegen hingegen, dass das Fehlen von Sulfatiden die terminale Differenzierung und morphologische Reifung von OL sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nicht etwa hemmt, sondern sogar um das zwei- bis dreifache beschleunigt (Hirahara et al., 2004). Daraus schlossen Hirahara und Kollegen, dass Sulfatide ein Schlüsselmolekül für die negative Regulation der terminalen OL-Differenzierung sind. Für unsere Arbeit bedeuten die Ergebnisse dieser Studien, dass OL in Abwesenheit von Sulfatidcn dennoch differenzieren können, was belegt, dass es noch andere, Sulfatid-unabhängige Mechanismen der OL-Differenzierung geben muss. Inwieweit GalC hierbei eine Rolle spielt und welche weiteren Moleküle auf OL oder Bindungsstellen innerhalb der FNG- oder Cys-EGF-Domänen daran beteiligt sind, muss noch geklärt werden.

Ein weiterer, potentieller Rezeptor des TNR-Moleküls auf OL ist MAG (Yang et al., 1999). MAG (ein Typl-Transmembranprotein) wird ausschließlich von OL und Schwann-Zellen exprimiert und

bindet in der FNG-Domäne von TNR, was die Vermutung nahe legt, dass auch dieses Molekül an der OL-Differenzierung beteiligt sein könnte. Es wird jedoch erst von reifenden OL exprimiert (Feldhaus, 2003). Da in unseren Untersuchungen OL-Vorläufer/unreife OL mit TNR-Fragmenten behandelt wurden, ist eine MAG-Beteiligung an der beobachteten Wirkung der FNG-Domäne eher unwahrscheinlich. Die Funktion von MAG wird eher mit der Erhaltung der Myelinstabilität und der Hemmung der axonalen Regeneration in Zusammenhang gebracht (Chen et al., 2006).

Da die Interaktion der Cys-EGF-Domäne von TNR mit OL eine mit der FNG-Domäne vergleichbare Wirkung zeigt, liegt die Vermutung nahe, dass die in dieser Domäne vorhandene zweite Sulfatid-Bindungsstelle am beobachteten Effekt beteiligt sein könnte. Ein weiterer, in diesem Kontext relevanter zellulärer Rezeptor könnte auch das bereits beschriebene Protein F3/Contactin sein. F3/Contactin, das mit dem Notch-Rezeptor interagiert, wird von OL exprimiert und ist an deren Genese und Reifung beteiligt (Hu et al., 2004, 2006). Der Notch-Signalweg ist eine Liganden-abhängige, multipotente Kaskade, die während der Entwicklung in vielen Organsystemen verbreitet ist (Lewis, 1996); insbesondere im ZNS spielt sie bei der Entscheidung über Zellschicksale je nach zeitlichem und räumlichen Kontext sowohl positiv wie auch negativ regulierende Rollen (Chambers et al., 2001). Verschiedene Studien haben in den letzten Jahren gezeigt, dass der Notch-Signalweg eine wichtige Rolle bei der OL-Entwicklung spielt (Hu et al., 2003; Popko et al., 2003). Dies gibt Anlass zu der Vermutung, dass F3/Contactin ein kritisches Molekül für die Entwicklung des Nervensystems und nicht zuletzt für die OL-Differenzierung ist. Die Interaktion der Cys-EGF-Domäne von TNR mit F3/Contactin-exprimierenden OL könnte somit ebenfalls zu der beobachteten differenzierungsfördernden Wirkung beitragen.

Weitere, direkte Bindungsstudien, die Suche nach neuen, unbekanntem Liganden des TNR-Moleküls und Untersuchungen der molekularen Interaktionen der zur OL-Differenzierung führenden Prozesse sind notwendig und derzeit weiter Gegenstand der Forschung.

#### **4.4 Ein Ausblick**

Aufgrund der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse lässt sich ein kleiner Ausblick in die Zukunft der TNR- und OL-Forschung wagen. Mit Hilfe noch kleinerer, definierter Domänenteile des TNR-Moleküls sollen - wie bereits oben diskutiert - weitere Bindungsstellen für bekannte Rezeptoren identifiziert werden. Mit den hier erzeugten Fragmenten wird jedoch auch die Suche nach weiteren, noch unbekanntem Liganden und die Erforschung ihrer Interaktionen mit TNR und die daraus entstehenden Wirkungen auf die axonale Regeneration und OL-Differenzierung

ermöglicht. Auch die Signalwege, über welche die oben diskutierten Effekte vermittelt werden, sind weiterhin Gegenstand der Forschung. Eine weitere Einengung und Charakterisierung des für die OL-Differenzierung verantwortlichen Epitops innerhalb der FNG-Domäne soll über die Herstellung von Domänenteilen erfolgen; dies ist mit Hilfe des FlpIn-Expressionssystems möglich und aktueller Gegenstand der Forschung. Zudem muss weiter untersucht werden, ob die differenzierungsfördernde Wirkung alleinig Sulfatid/Glykolipid-abhängig ist oder ob es weiterer Interaktionspartner bedarf. Wagt man den Ausblick noch ein wenig weiter, stehen auch eventuell in Zukunft klinisch anwendbare Optionen, die sich aus dieser Arbeit ergeben, zur Diskussion.

Die erfolgreiche ZNS-Regeneration nach einer Verletzung erfordert, zum einen, das Wiederauswachsen von Axonen zu ihrem ursprünglichen Zielort und dessen Reinnervation und, zum anderen, die Axon-Remyelinisierung durch myelinbildende Gliazellen. Im Gegensatz zum Säuger-ZNS sind fast alle Teile des Fisch-ZNS in der Lage, zu regenerieren (Matsukawa et al., 2004). Das geringe regenerative Potential des adulten Säuger-ZNS wird der Anwesenheit von ECM-Molekülen wie CSPG und TNR zugeschrieben. Diese wirken auf die axonale Regeneration (wie für TNR oben beschrieben) inhibitorisch und schaffen zusammen mit Myelin-Inhibitoren wie Nogo-A, CSPG, MAG und OMgp (OL Myelin Glykoprotein) eine für auswachsende Nervenfasern regenerationsfeindliche Umgebung (Sandvig et al., 2004; Schwab, 2004). Pesheva und Kollegen fanden heraus, dass im Gegensatz zu TNR höherer Vertebraten Fisch-TNR nicht inhibitorisch für Fisch-Neurone und schwächer inhibitorisch für Säuger-Neurone sind (Pesheva et al., 2006). Im Gegensatz dazu wird jedoch durch Säuger-TNR das axonale Wachstum von Fisch-Neuronen gehemmt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sich die für Axone inhibitorischen Funktionen des TNR-Moleküls erst während der Evolution entwickelt haben. Es bleibt zu erforschen, inwiefern das fehlende regenerative Potential bei höheren Vertebraten ein selektiver Vorteil war. Für die Ergebnisse dieser Arbeit lassen diese Erkenntnisse langfristig jedoch auf eine therapeutische Anwendbarkeit hoffen. Durch das bessere Verständnis von TNR und seinen inhibitorischen Eigenschaften auf der Fragment- und Domänen-Ebene könnten in Zukunft molekulare Tools im Sinne von Antikörpern oder definierten Molekülteilen entwickelt werden, welche diese Wirkung verhindern oder so manipulieren könnten, dass eine axonale Regeneration wie bei niederen Vertebraten wieder möglich würde.

Doch nicht nur für die axonale Regeneration könnten die Ergebnisse dieser Arbeit von therapeutischem Interesse sein, sondern in ganz besonderem Maße im Hinblick auf die Wirkungen der TNR-Fragmente auf OL und damit auf eine mögliche klinische Anwendbarkeit bei

neurodegenerativen bzw. entzündlich-demyelinisierenden Erkrankungen wie etwa der Multiplen Sklerose (MS). Der Verlust von OL und Myelin bei MS bringt etliche funktionelle Beeinträchtigungen mit sich. Eine spontane Remyelinisierung kommt bei der MS zwar vor, ist jedoch meist nicht vollständig und führt somit langfristig zu einer inadäquaten Erholung der neurologischen Funktionen nach Episoden aktiver Entzündung und Demyelinisierung (Camara et al., 2007; Miller und Bai, 2007). Aktuelle Therapien, welche auf die Supprimierung der Autoimmunantwort abzielen, können zwar das Fortschreiten der Erkrankung aufhalten, jedoch nicht das verlorene Myelin wiederherstellen (Milner, 1997). Zwei generelle neue therapeutische Ansätze kommen deshalb in Frage, um die Myelin-Regeneration zu fördern (Miller und Bai, 2007). Zum einen ist es das Ziel, die endogene Myelin-Erneuerung durch das therapeutische Zuführen etwa von Wachstumsfaktoren zu stimulieren. Zum anderen soll der Reparaturprozess durch die Zufuhr von exogenen Zellen mit Myelinisierungspotential angestoßen werden. Um diesen und möglicherweise anderen (etwa neuen medikamentösen) Therapieformen bei MS zu dienen, können nun durch ein von Heraclitus Biosciences entwickeltes und patentiertes Verfahren zur OL-Selektion in einem Ein-Schritt-Verfahren mittels der in dieser Arbeit beforschten definierten TNR-Fragmente OL selektiv gewonnen werden. Diese könnten für das Screening neuer Medikamente, die Entwicklung neuer, schnellerer diagnostischer Verfahren und nicht zuletzt die Zellersatztherapie verwendet werden. Bei potentiellen Ansätzen zur Zellersatztherapie könnte beiden oben vorgestellten Therapieansätzen gedient werden. Zum einen könnten die Fragmente selbst oder molekulare Tools, welche ihre Wirkung mimikrieren, direkt als Therapeutikum in vivo appliziert werden. Zum anderen spielt insbesondere die Möglichkeit der Differenzierung von Stammzellen als Therapieansatz eine Rolle, um die verloren gegangenen OL zu ersetzen. Dies ist mit Hilfe der TNR-Fragmente und deren potentieller differenzierungsfördernder Wirkung auf OL ein wenig näher gerückt. Die Fragen, ob die TNR-Fragmente ihre differenzierungsfördernde Wirkung auch auf multipotente Stammzellen ausüben sowie ein klares Verständnis der Anwendbarkeit, der Grenzen und der zugrunde liegenden Mechanismen, welche die Stammzellreparatur mit sich bringt, sind wichtige Gegenstände der aktuellen Forschung. Es muss aber trotzdem gesagt werden, dass obwohl die Remyelinisierung eine Voraussetzung für eine lang anhaltende funktionelle Wiederherstellung ist, andere Faktoren wie etwa der Status der Entzündungsantwort und der Grad des axonalen Schadens in der demyelinisierten Region zum Ausmaß der funktionellen Genesung beitragen. Beim Prozess der (Re-)Myelinisierung handelt es sich um ein komplexes Zusammenspiel verschiedenster Faktoren (Melli und Höke, 2007). Es liegt daher nahe, dass die Identifizierung neuer Strategien abhängig ist vom besseren Verständnis der OL-Biologie und damit der

Myelinisierung, sowie von der weiteren Erforschung der Zusammenhänge in der ECM des ZNS. Einen kleinen Teil hat auch die vorliegende Arbeit dazu beigetragen.

## 5 Zusammenfassung

Die axonale Regeneration und Remyelinisierung im zentralen Nervensystem (ZNS) sind als zentrale Reparaturprozesse wichtige Gegenstände der Forschung. Da kausale Therapieformen bei der Behandlung vieler ZNS-Erkrankungen bisher noch nicht möglich sind, ist die Erforschung der molekularen Grundlagen von Reparaturprozessen im ZNS von großer Bedeutung. Während der ZNS-Entwicklung und -Pathologie spielt die regulierte Expression von ZNS-Matrixmolekülen wie den multimeren Extrazellulärmatrix (ECM)-Glykoproteinen der Tenascin-Familie eine große Rolle. In diesem Zusammenhang steht die funktionelle Bedeutung von Tenascin-R (TNR) im Forschungsmittelpunkt dieser Arbeit. TNR kommt ausschließlich in der ECM des ZNS vor und ist aus strukturell und funktionell unterscheidbaren Domänen aufgebaut. In funktionellen Studien konnte gezeigt werden, dass TNR (i) das Wiederauswachsen von Axonen verhindern (über die Bindung an das axonale Protein Contactin) und (ii) die Differenzierung bzw. das Remyelinisierungspotential von Oligodendrozyten (OL) fördern kann (über die Interaktion mit Sulfatiden und/oder mit Contactin). Die Bindungsstellen für die genannten zellulären Rezeptoren auf dem humanen Protein sowie von funktionell relevanten monoklonalen TNR-Antikörpern waren bisher jedoch unbekannt.

Hinsichtlich der möglichen Anbindung an biomedizinische Anwendungen im Rahmen von Reparaturprozessen im humanen ZNS wurde in dieser Arbeit eine funktionelle Kartierung des humanen TNR vorgenommen. Hierfür wurden rekombinante Proteinanteile/TNR-Domänen über TOPO-TA-Klonierung in einem humanen (FlpIn<sup>TM</sup>) Expressionssystem hergestellt. Im Rahmen dieser Arbeit ist es zum ersten Mal gelungen, humane TNR-Fragmente, welche die Gesamtsequenz des Proteins abdecken, als natürlich gefaltete, glykosylierte Proteinfragmente herzustellen und funktionell zu charakterisieren. Kohlenhydratanalysen mittels pflanzlicher Lektine und kohlenhydratspezifischer monoklonaler Antikörper zeigten, dass das Glykosylierungsmuster der Fragmente jenes des nativen humanen Proteins widerspiegelt. Insbesondere das phylogenetisch stark konservierte, an axonalem Wachstum und Synaptogenese beteiligte HNK-1-Kohlenhydrat konnte bestimmten TNR-Domänen zugeordnet werden. Mit Hilfe der Fragmente konnten auch die Bindungsstellen von fünf monoklonalen TNR-Antikörpern identifiziert werden.

Durch funktionelle In vitro-Studien mit adäquaten Zelllinien, primären neuronalen Zellen und Mikroexplantaten aus frühpostnatalem Mausgehirn zur Contactin-vermittelten inhibitorischen



Wirkung des Moleküls ist es gelungen, die F3/Contactin-Bindungsstelle auf dem humanen TNR-Molekül innerhalb der Cys-EGF-Domäne zu lokalisieren. Ebenso konnten zwei Sulfatid-Bindungsstellen identifiziert werden (je eine in der Cys-EGF- und der FNG-Domäne), wobei die die Sulfatid-Hauptbindungsstelle enthaltende FNG-Domäne alleine für die Adhäsion bzw. Selektion von OL und deren potentielle Differenzierung (gekennzeichnet durch die Expression myelinspezifischer Proteine und Glykolipide) ausreicht.

Die bisher nur vom Gesamtmolekül bekannten Erkennungsprozesse machte sich schon ein durch Heraclitus Biosciences patentiertes Verfahren zu nutze, mit dem aus einem Gesamtgemisch von Gehirnzellen OL durch selektive Zelladhäsion in einem Einstufenverfahren isoliert werden können. Mit Hilfe der rekombinant exprimierten Molekülteile konnte dieses Verfahren weiter entwickelt werden, was jetzt die selektive Isolierung von OL aus verschiedenen Gehirnbereichen und Altersstufen ermöglicht und als kommerzieller Zellisolierungskit in absehbarer Zeit angeboten werden wird.

Aus der vorliegenden Arbeit ergeben sich interessante Ausblicke in die Zukunft der TNR- und Myelinforschung. Durch das bessere Verständnis von TNR und seinen für Neurone inhibitorischen Eigenschaften auf der Fragment- und Domänen-Ebene könnten in Zukunft molekulare Tools im Sinne von Antikörpern oder definierten Molekülteilen entwickelt werden, welche diese Wirkung verhindern oder so manipulieren, dass eine axonale Regeneration – wie bei niederen Vertebraten, bei denen TNR so gut wie keine inhibitorische Funktion inne hat – wieder möglich würde. In besonderem Maße sind die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch interessant für die Zukunft der Multiple Sklerose-Forschung. Durch die Möglichkeit der einfachen OL-Gewinnung mit OL-Isolierungskit könnten diese für das zellbasierte, vorklinische Screening neuer Medikamente, die Entwicklung schnellerer diagnostischer Verfahren und nicht zuletzt die Zellersatztherapie verwendet werden. Auch die Stammzelltherapie rückt durch die potentiell differenzierungsfördernden Eigenschaften der TNR-Fragmente auf OL ein wenig näher. Es liegt nahe, dass die Entwicklung neuer Strategien abhängig ist vom besseren Verständnis der OL-Biologie und damit der Myelinisierung, sowie von der weiteren Erforschung der ECM-Wechselwirkungen im Gehirn. Einen kleinen Teil hat die vorliegende Arbeit dazu beigetragen.

## **6 Anhang**

### **6.1 Aus der Arbeit entstandene Publikationen:**

Baeßler B, Kuklinkski S, Gennarini G, Baenziger JU, Pesheva P. The contactin/tenascin-R connection – revisited (in Vorbereitung).

Pesheva P, Baeßler B. Tenascin-R-based isolation and differentiation of oligodendrocytes from brain tissue and adult human stem cells – new chances and challenges (in Vorbereitung).

## 6.2 BONFOR-Forschungspreis

# Urkunde

*Frau cand. med. Bettina Weiher,*

*Klinik für Nuklearmedizin / AG Neuro- und Tumorzellbiologie,*

*wurde im Rahmen des 10. BONFOR-Symposiums am 27. Oktober 2006 der*

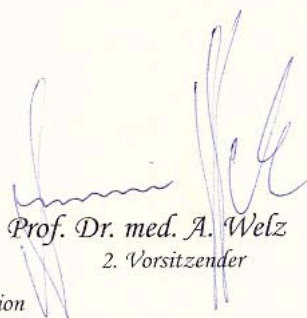
***BONFOR-Forschungspreis 2006***

*in Höhe von 2.500.-- €*

*für die beste Nachwuchs-Präsentation  
im Promotionsstipendien-Programm verliehen.*



*Prof. Dr. med. P. Knolle*  
1. Vorsitzender



*Prof. Dr. med. A. Welz*  
2. Vorsitzender

*BONFOR-Forschungskommission  
Medizinische Fakultät der Universität Bonn*

## 7 Literaturverzeichnis

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. In: *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science Publishing, 2002, 4. Aufl.

Angelov DN, Walther M, Streppel M, Guntinas-Lichius O, Neiss WF, Probstmeier R, Pesheva P. Tenascin-R is antiadhesive for activated microglia that induce downregulation of the protein after peripheral nerve injury: a new role in neuronal protection. *J Neurosci*. 1998;18:6218-6229.

Bansal R, Warrington AE, Gard AL, Ranscht B, Pfeiffer SE. Multiple and novel specificities of monoclonal antibodies O1, O4, and R-mAb used in the analysis of oligodendrocyte development. *J Neurosci Res*. 1989;24:548-557.

Bartsch U, Pesheva P, Raff M, Schachner M. Expression of janusin (J1-160/180) in the retina and optic nerve of the developing and adult mouse. *Glia*. 1993;9:57-69.

Becker T, Anliker B, Becker CG, Taylor J, Schachner M, Meyer RL, Bartsch U. Tenascin-R inhibits regrowth of optic fibers in vitro and persists in the optic nerve of mice after injury. *Glia*. 2000;29:330-346.

Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol*. 2003;200:423-428.

Bourdon MA, Wikstrand CJ, Furthmayr H, Matthews TJ, Bigner DD. Human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen defined by monoclonal antibody. *Cancer Res*. 1983;43:2796-2805.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-254.

Bristow J, Tee MK, Gitelman SE, Mellon SH, Miller WL. Tenascin-X: a novel extracellular matrix protein encoded by the human XB gene overlapping P450c21B. *J Cell Biol*. 1993;122:265-278.

Brümmendorf T, Wolff JM, Frank R, Rathjen FG. Neural cell recognition molecule F11: homology with fibronectin type III and immunoglobulin type C domains. *Neuron*. 1989;2:1351-1361.

Brümmendorf T, Hubert M, Treubert U, Leuschner R, Tárnok A, Rathjen FG. The axonal recognition molecule F11 is a multifunctional protein: specific domains mediate interactions with Ng-CAM and restrictin. *Neuron*. 1993;10:711-727.

Brümmendorf T, Rathjen FG. Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily. *Protein Profile*. 1995;2:963-1108.

Bukalo O, Schachner M, Dityatev A. Hippocampal metaplasticity induced by deficiency in the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R. *J Neurosci*. 2007;27:6019-6028.

Burch GH, Bedolli MA, McDonough S, Rosenthal SM, Bristow J. Embryonic expression of tenascin-X suggests a role in limb, muscle, and heart development. *Dev Dyn*. 1995;203:491-504.

Camara J, French-Constant C. Lessons from oligodendrocyte biology on promoting repair in multiple sclerosis. *J. Neurol*. 2007; 254:115–122.

Carnemolla B, Leprini A, Borsi L, Querzé G, Urbini S, Zardi L. Human tenascin-R. Complete primary structure, pre-mRNA alternative splicing and gene localization on chromosome 1q23-q24. *J Biol Chem*. 1996 ;271:8157-8160.

Celio MR, Spreafico R, De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L. Perineuronal nets: past and present. *Trends Neurosci*. 1998;21:510-515.

Chambers CB, Peng Y, Nguyen H, Gaiano N, Fishell G, Nye JS. Spatiotemporal selectivity of response to Notch1 signals in mammalian forebrain precursors. *Development*. 2001;128:689-702

Chen Y, Aulia S, Tang BL. Myelin-associated glycoprotein-mediated signaling in central nervous system pathophysiology. *Mol Neurobiol*. 2006;34:81-91.

Chiquet M, Fambrough DM. Chick myotendinous antigen. I. A monoclonal antibody as a marker for tendon and muscle morphogenesis. *J Cell Biol*. 1984;98:1926-1936.

Chiquet-Ehrismann R, Mackie EJ, Pearson CA, Sakakura T. Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell*. 1986;47:131-139.

Chiquet-Ehrismann R. Tenascins. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36:986-990.

Clegg DO, Wingerd KL, Hikita ST, Tolhurst EC. Integrins in the development, function and dysfunction of the nervous system. *Front Biosci*. 2003;8:723-750.

Coetzee T, Fujita N, Dupree J, Shi R, Blight A, Suzuki K, Suzuki K, Popko B. Myelination in the absence of galactocerebroside and sulfatide: normal structure with abnormal function and regional instability. *Cell*. 1996;86:209-219.

Conway JF, Parry DA. Three-stranded alpha-fibrous proteins: the heptad repeat and its implications for structure. *Int J Biol Macromol*. 1991;13:14-16.

Crespo-Santiago D. The extracellular matrix of the central nervous system: chondroitin sulphate type proteoglycans and neural repair. *Rev Neurol*. 2004;38:843-851.

Day JM, Olin AI, Murdoch AD, Canfield A, Sasaki T, Timpl R, Hardingham TE, Aspberg A. Alternative splicing in the aggrecan G3 domain influences binding interactions with tenascin-C and other extracellular matrix proteins. *J Biol Chem*. 2004;279:12511-12518.

Dityatev A, Schachner M. The extracellular matrix and synapses. *Cell Tissue Res*. 2006;326:647-654.

Dityatev A, Brückner G, Dityateva G, Grosche J, Kleene R, Schachner M. Activity-dependent formation and functions of chondroitin sulfate-rich extracellular matrix of perineuronal nets. *Dev Neurobiol*. 2007;67:570-588.

Eleftheriou F, Exposito JY, Garrone R, Lethias C. Characterization of the bovine tenascin-X. *J Biol Chem*. 1997;272:22866-22874.

Erickson HP, Inglesias JL. A six-armed oligomer isolated from cell surface fibronectin preparations. *Nature*. 1984;311:267-269.

Erickson HP. Tenascin-C, tenascin-R and tenascin-X: a family of talented proteins in search of functions. *Curr Opin Cell Biol*. 1993;5:869-876.

Faissner A, Kruse J, Chiquet-Ehrismann R, Mackie E. The high-molecular-weight J1 glycoproteins are immunochemically related to tenascin. *Differentiation*. 1988;37:104-114.

Faissner A. The tenascin gene family in axon growth and guidance. *Cell Tissue Res*. 1997;290:331-341.

Feldhaus B. Periventriculäre Leukomalazie - Untersuchung Cytokin-induzierter Schädigungen von Oligodendrocyten-Vorläuferzellen und Protektion durch Corticoide Naturwissenschaftliche Dissertation 2003, Ruhr-Universität Bochum

Fuss B, Wintergerst ES, Bartsch U, Schachner M. Molecular characterization and in situ mRNA localization of the neural recognition molecule J1-160/180: a modular structure similar to tenascin. *J Cell Biol.* 1993;120:1237-1249.

Gard AL, Pfeiffer SE. Oligodendrocyte progenitors isolated directly from developing telencephalon at a specific phenotypic stage: myelinogenic potential in a defined environment. *Development.* 1989;106:119-132.

Gennarini G, Durbec P, Boned A, Rougon G, Goridis C. Transfected F3/F11 neuronal cell surface protein mediates intercellular adhesion and promotes neurite outgrowth. *Neuron.* 1991;6:595-606.

Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science.* 1999;285:1028-1032.

Goodman CS Mechanisms and molecules that control growth cone guidance. *Annu Rev Neurosci.* 1996;19:341-377.

Grumet M, Hoffman S, Crossin KL, Edelman GM. Cytotactin, an extracellular matrix protein of neural and non-neural tissues that mediates glia-neuron interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82:8075-8079.

Gurevicius K, Gureviciene I, Valjakka A, Schachner M, Tanila H. Enhanced cortical and hippocampal neuronal excitability in mice deficient in the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R. *Mol Cell Neurosci.* 2004;25:515-523.

Hagios C, Brown-Luedi M, Chiquet-Ehrismann R. Tenascin-Y, a component of distinctive connective tissues, supports muscle cell growth. *Exp Cell Res.* 1999;253:607-617.

Hansson CG, Karlsson KA, Samuelsson BE. The identification of sulphatides in human erythrocyte membrane and their relation to sodium-potassium dependent adenosine triphosphatase. *J Biochem.* 1978;83:813-819.

Heck N, Klausmeyer A, Faissner A, Garwood J. Cortical neurons express PSI, a novel isoform of phosphacan/RPTPbeta. *Cell Tissue Res.* 2005;321:323-333.

Hirahara Y, Bansal R, Honke K, Ikenaka K, Wada Y. Sulfatide is a negative regulator of oligodendrocyte differentiation: development in sulfatide-null mice. *Glia.* 2004;45:269-277.

Hoffman S, Crossin KL, Edelman GM. Molecular forms, binding functions, and developmental expression patterns of cytotactin and cytotactin-binding proteoglycan, an interactive pair of extracellular matrix molecules. *J Cell Biol.* 1988;106:519-532.

Hsia HC, Schwarzbauer JE. Meet the tenascins: multifunctional and mysterious. *J Biol Chem.* 2005;280:26641-26644.

Hu QD, Ang BT, Karsak M, Hu WP, Cui XY, Duka T, Takeda Y, Chia W, Sankar N, Ng YK, Ling EA, Maciag T, Small D, Trifonova R, Kopan R, Okano H, Nakafuku M, Chiba S, Hirai H, Aster JC, Schachner M, Pallen CJ, Watanabe K, Xiao ZC. F3/contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation. *Cell.* 2003;115:163-175.

Hu QD, Cui XY, Ng YK, Xiao ZC. Axoglial interaction via the notch receptor in oligodendrocyte differentiation. *Ann Acad Med Singapore.* 2004;33:581-588.

Hu QD, Ma QH, Gennarini G, Xiao ZC. Cross-talk between F3/contactin and Notch at axoglial interface: a role in oligodendrocyte development. *Dev Neurosci.* 2006;28:25-33.

Ikuta T, Sogawa N, Ariga H, Ikemura T, Matsumoto K. Structural analysis of mouse tenascin-X: evolutionary aspects of reduplication of FNIII repeats in the tenascin gene family. *Gene.* 1998 14;217:1-13.

Inoue A, Sanes JR. Lamina-specific connectivity in the brain: regulation by N-cadherin, neurotrophins, and glycoconjugates. *Science.* 1997;276:1428-1431.

Iozzo RV, Murdoch AD. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J.* 1996;10:598-614.

Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:609-652.

Joester A, Faissner A. Evidence for combinatorial variability of tenascin-C isoforms and developmental regulation in the mouse central nervous system. *J Biol Chem.* 1999;274:17144-17151.

Jones FS, Jones PL. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn.* 2000;218:235-259.



Jung M, Pesheva P, Schachner M, Trotter J. Astrocytes and neurons regulate the expression of the neural recognition molecule janusin by cultured oligodendrocytes. *Glia*. 1993;9:163-175.

Kang JS, Oohashi T, Kawakami Y, Bekku Y, Izpisua Belmonte JC, Ninomiya Y. Characterization of dermacan, a novel zebrafish lectican gene, expressed in dermal bones. *Mech Dev*. 2004;121:301-312.

Kishimoto Y. Phylogenetic development of myelin glycosphingolipids. *Chem Phys Lipids*. 1986;42:117-128.

Klausmeyer A, Garwood J, Faissner A. Differential expression of phosphacan/RPTPbeta isoforms in the developing mouse visual system. *J Comp Neurol*. 2007;504:659-679.

Kruse J, Mailhammer R, Wernecke H, Faissner A, Sommer I, Goridis C, Schachner M. Neural cell adhesion molecules and myelin-associated glycoprotein share a common carbohydrate moiety recognized by monoclonal antibodies L2 and HNK-1. *Nature*. 1984;311:153-155.

Kruse J, Keilhauer G, Faissner A, Timpl R, Schachner M. The J1 glycoprotein--a novel nervous system cell adhesion molecule of the L2/HNK-1 family. *Nature*. 1985;316:146-148.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-685.

Lewis J. Neurogenic genes and vertebrate neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol*. 1996;6:3-10.

Li S, Liquari P, McKee KK, Harrison D, Patel R, Lee S, Yurchenco PD. Laminin-sulfatide binding initiates basement membrane assembly and enables receptor signaling in Schwann cells and fibroblasts. *J Cell Biol*. 2005;169:179-189.

Liao H, Bu WY, Wang TH, Ahmed S, Xiao ZC. Tenascin-R plays a role in neuroprotection via its distinct domains that coordinate to modulate the microglia function. *J Biol Chem*. 2005;280:8316-8323.

Lochter A, Schachner M. Tenascin and extracellular matrix glycoproteins: from promotion to polarization of neurite growth in vitro. *J Neurosci*. 1993;13:3986-4000.

Mao JR, Bristow J. The Ehlers-Danlos syndrome: on beyond collagens. *J Clin Invest*. 2001;107:1063-1069.

Matsukawa T, Arai K, Koriyama Y, Liu Z, Kato S. Axonal regeneration of fish optic nerve after injury. *Biol Pharm Bull*. 2004;27:445-451.

Matsumoto K, Sato T, Oka S, Orba Y, Sawa H, Kabayama K, Inokuchi J, Ariga H. Triglyceride accumulation and altered composition of triglyceride-associated fatty acids in the skin of tenascin-X-deficient mice. *Genes Cells*. 2004;9:737-748.

Melli G, Höke A. Canadian Association of Neurosciences review: regulation of myelination by trophic factors and neuron-glia signaling. *Can J Neurol Sci*. 2007;34:288-295.

Midwood KS, Valenick LV, Hsia HC, Schwarzbauer JE. Coregulation of fibronectin signaling and matrix contraction by tenascin-C and syndecan-4. *Mol Biol Cell*. 2004;15:5670-5677.

Milev P, Friedlander DR, Sakurai T, Karthikeyan L, Flad M, Margolis RK, Grumet M, Margolis RU. Interactions of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol*. 1994;127:1703-1715.

Milev P, Chiba A, Häring M, Rauvala H, Schachner M, Ranscht B, Margolis RK, Margolis RU. High affinity binding and overlapping localization of neurocan and phosphacan/protein-tyrosine phosphatase-zeta/beta with tenascin-R, amphoterin, and the heparin-binding growth-associated molecule. *J Biol Chem*. 1998;273:6998-7005.

Miller RH, Bai L. Cellular approaches for stimulating CNS remyelination. *Regen Med*. 2007;2:817-829.

Milner R. Understanding the molecular basis of cell migration; implications for clinical therapy in multiple sclerosis. *Clin Sci (Lond)*. 1997;92:113-122.

Montag-Sallaz M, Montag D. Severe cognitive and motor coordination deficits in tenascin-R-deficient mice. *Genes Brain Behav*. 2003;2:20-31.

Morganti MC, Taylor J, Pesheva P, Schachner M. Oligodendrocyte-derived J1-160/180 extracellular matrix glycoproteins are adhesive or repulsive depending on the partner cell type and time of interaction. *Exp Neurol*. 1990;109:98-110.

Neidhardt J, Fehr S, Kutsche M, Löhler J, Schachner M. Tenascin-N: characterization of a novel member of the tenascin family that mediates neurite repulsion from hippocampal explants. *Mol Cell Neurosci*. 2003;23:193-209.

Nörenberg U, Wille H, Wolff JM, Frank R, Rathjen FG. The chicken neural extracellular matrix molecule restrictin: similarity with EGF-, fibronectin type III-, and fibrinogen-like motifs. *Neuron*. 1992;8:849-863.

Nörenberg U, Hubert M, Brümmendorf T, Tárnok A, Rathjen FG. Characterization of functional domains of the tenascin-R (restrictin) polypeptide: cell attachment site, binding with F11, and enhancement of F11-mediated neurite outgrowth by tenascin-R. *J Cell Biol.* 1995;130:473-484.

Nörenberg U, Hubert M, Rathjen FG. Structural and functional characterization of tenascin-R (restrictin), an extracellular matrix glycoprotein of glial cells and neurons. *Int J Dev Neurosci.* 1996;14:217-231.

Orend G, Chiquet-Ehrismann R. Adhesion modulation by antiadhesive molecules of the extracellular matrix. *Exp Cell Res.* 2000;261:104-110.

Orend G. Potential oncogenic action of tenascin-C in tumorigenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37:1066-1083.

Pan B, Fromholt SE, Hess EJ, Crawford TO, Griffin JW, Sheikh KA, Schnaar RL. Myelin-associated glycoprotein and complementary axonal ligands, gangliosides, mediate axon stability in the CNS and PNS: neuropathology and behavioral deficits in single- and double-null mice. *Exp Neurol.* 2005;195:208-217.

Pesheva P, Spiess E, Schachner M. J1-160 and J1-180 are oligodendrocyte-secreted nonpermissive substrates for cell adhesion. *J Cell Biol.* 1989;109:1765-1778.

Pesheva P, Probstmeier R, Spiess E, Schachner M. Divalent Cations Modulate the Inhibitory Substrate Properties of Murine Glia-derived J1-160 and J1-180 Extracellular Matrix Glycoproteins for Neuronal Adhesion. *Eur J Neurosci.* 1991;3:356-365.

Pesheva P, Gennarini G, Goridis C, Schachner M. The F3/11 cell adhesion molecule mediates the repulsion of neurons by the extracellular matrix glycoprotein J1-160/180. *Neuron.* 1993;10:69-82.

Pesheva P, Probstmeier R, Skubitz AP, McCarthy JB, Furcht LT, Schachner M. Tenascin-R (J1 160/180) inhibits fibronectin-mediated cell adhesion--functional relatedness to tenascin-C. *J Cell Sci.* 1994;107:2323-2333.

Pesheva P, Gloor S, Schachner M, Probstmeier R. Tenascin-R is an intrinsic autocrine factor for oligodendrocyte differentiation and promotes cell adhesion by a sulfatide-mediated mechanism. *J Neurosci.* 1997;17:4642-4651.

Pesheva P, Probstmeier R. The yin and yang of tenascin-R in CNS development and pathology. *Prog Neurobiol.* 2000;61:465-493.

- Pesheva P, Probstmeier R, Lang DM, McBride R, Hsu NJ, Gennarini G, Spiess E, Peshev Z. Early coevolution of adhesive but not antiadhesive tenascin-R ligand-receptor pairs in vertebrates: a phylogenetic study. *Mol Cell Neurosci*. 2006;32:366-386.
- Pontén J, Macintyre EH. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1968;74:465-486.
- Popko B. Notch signaling: a rheostat regulating oligodendrocyte differentiation? *Dev Cell*. 2003;5:668-669.
- Prieto AL, Andersson-Fisone C, Crossin KL. Characterization of multiple adhesive and counteradhesive domains in the extracellular matrix protein cytotactin. *J Cell Biol*. 1992;119:663-678.
- Probstmeier R, Michels M, Franz T, Chan BM, Pesheva P. Tenascin-R interferes with integrin-dependent oligodendrocyte precursor cell adhesion by a ganglioside-mediated signalling mechanism. *Eur J Neurosci*. 1999;11:2474-2488.
- Probstmeier R, Stichel CC, Müller HW, Asou H, Pesheva P. Chondroitin sulfates expressed on oligodendrocyte-derived tenascin-R are involved in neural cell recognition. Functional implications during CNS development and regeneration. *J Neurosci Res*. 2000a;60:21-36.
- Probstmeier R, Braunewell K, Pesheva P. Involvement of chondroitin sulfates on brain-derived tenascin-R in carbohydrate-dependent interactions with fibronectin and tenascin-C. *Brain Res*. 2000b;863:42-51.
- Probstmeier R, Nellen J, Gloor S, Wernig A, Pesheva P. Tenascin-R is expressed by Schwann cells in the peripheral nervous system. *J Neurosci Res*. 2001;64:70-78.
- Rathjen FG, Wolff JM, Chiquet-Ehrismann R. Restrictin: a chick neural extracellular matrix protein involved in cell attachment co-purifies with the cell recognition molecule F11. *Development*. 1991;113:151-164.
- Rauch U. Modeling an extracellular environment for axonal pathfinding and fasciculation in the central nervous system. *Cell Tissue Res*. 1997;290:349-356.
- Rauch U, Zhou XH, Roos G. Extracellular matrix alterations in brains lacking four of its components. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;328:608-617.
- Rhodes KE, Fawcett JW. Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS? *J Anat*. 2004;204:33-48.

Ruiz C, Huang W, Hegi ME, Lange K, Hamou MF, Fluri E, Oakeley EJ, Chiquet-Ehrismann R, Orend G. Growth promoting signaling by tenascin-C. *Cancer Res.* 2004;64:7377-7385.

Ruoslahti E. Brain extracellular matrix. *Glycobiology.* 1996;6:489-492.

Saghatelian AK, Snopyan M, Gorissen S, Meigel I, Mosbacher J, Kaupmann K, Bettler B, Kornilov AV, Nifantiev NE, Sakanyan V, Schachner M, Dityatev A. Recognition molecule associated carbohydrate inhibits postsynaptic GABA(B) receptors: a mechanism for homeostatic regulation of GABA release in perisomatic synapses. *Mol Cell Neurosci.* 2003;24:271-282.

Sandvig A, Berry M, Barrett LB, Butt A, Logan A. Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. *Glia.* 2004;46:225-251.

Schalkwijk J, Zweers MC, Steijlen PM, Dean WB, Taylor G, van Vlijmen IM, van Haren B, Miller WL, Bristow J. A recessive form of the Ehlers-Danlos syndrome caused by tenascin-X deficiency. *N Engl J Med.* 2001 18;345:1167-1175.

Scherberich A, Tucker RP, Samandari E, Brown-Luedi M, Martin D, Chiquet-Ehrismann R. Murine tenascin-W: a novel mammalian tenascin expressed in kidney and at sites of bone and smooth muscle development. *J Cell Sci.* 2004;117:571-581.

Schwab ME. Nogo and axon regeneration. *Curr Opin Neurobiol.* 2004;14:118-124.

Seppänen A, Autio-Harmainen H, Alafuzoff I, Särkioja T, Veijola J, Hurskainen T, Bruckner-Tuderman L, Tasanen K, Majamaa K. Collagen XVII is expressed in human CNS neurons. *Matrix Biol.* 2006;25:185-188.

Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1:31-39.

Sobel RA. The extracellular matrix in multiple sclerosis: an update. *Braz J Med Biol Res.* 2001;34:603-609.

Song HJ, Poo MM. Signal transduction underlying growth cone guidance by diffusible factors. *Curr Opin Neurobiol.* 1999;9:355-363.

- Tai MH, Zipser B. Mannose-specific recognition mediates two aspects of synaptic growth of leech sensory afferents: collateral branching and proliferation of synaptic vesicle clusters. *Dev Biol.* 1998 15;201:154-166.
- Taylor J, Pesheva P, Schachner M. Influence of janusin and tenascin on growth cone behavior in vitro. *J Neurosci Res.* 1993;35:347-362.
- Timpl R, Tisi D, Talts JF, Andac Z, Sasaki T, Hohenester E. Structure and function of laminin LG modules. *Matrix Biol.* 2000;19:309-317.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology.* 1992;24:145-149.
- Tucker RP, Hagios C, Chiquet-Ehrismann R. Tenascin-Y in the developing and adult avian nervous system. *Dev Neurosci.* 1999;21:126-133.
- Volkmer H, Zacharias U, Nörenberg U, Rathjen FG. Dissection of complex molecular interactions of neurofascin with axonin-1, F11, and tenascin-R, which promote attachment and neurite formation of tectal cells. *J Cell Biol.* 1998;142:1083-1093.
- Weber P, Montag D, Schachner M, Bernhardt RR. Zebrafish tenascin-W, a new member of the tenascin family. *J Neurobiol.* 1998;35:1-16.
- Wenk MB, Midwood KS, Schwarzbauer JE. Tenascin-C suppresses Rho activation. *J Cell Biol.* 2000;150:913-20.
- Woodworth A, Pesheva P, Fiete D, Baenziger JU. Neuronal-specific synthesis and glycosylation of tenascin-R. *J Biol Chem.* 2004;279:10413-10421.
- Yamaguchi Y. Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57:276-289.
- Yamamoto S, Oka S, Inoue M, Shimuta M, Manabe T, Takahashi H, Miyamoto M, Asano M, Sakagami J, Sudo K, Iwakura Y, Ono K, Kawasaki T. Mice deficient in nervous system-specific carbohydrate epitope HNK-1 exhibit impaired synaptic plasticity and spatial learning. *J Biol Chem.* 2002;277:27227-27231.
- Yang H, Xiao ZC, Becker B, Hillenbrand R, Rougon G, Schachner M. Role for myelin-associated glycoprotein as a functional tenascin-R receptor. *J Neurosci Res.* 1999;55:687-701.

Xiao ZC, Taylor J, Montag D, Rougon G, Schachner M. Distinct effects of recombinant tenascin-R domains in neuronal cell functions and identification of the domain interacting with the neuronal recognition molecule F3/11. *Eur J Neurosci.* 1996;8:766-782.

Xiao ZC, Hillenbrand R, Schachner M, Thernes S, Rougon G, Gomez S. Signaling events following the interaction of the neuronal adhesion molecule F3 with the N-terminal domain of tenascin-R. *J Neurosci Res.* 1997;49:698-709.

Zamze S, Harvey DJ, Pesheva P, Mattu TS, Schachner M, Dwek RA, Wing DR. Glycosylation of a CNS-specific extracellular matrix glycoprotein, tenascin-R, is dominated by O-linked sialylated glycans and "brain-type" neutral N-glycans. *Glycobiology.* 1999;9:823-831.

## 8 Danksagung

Frau Prof. Dr. P. Pesheva gilt mein ganz besonderer Dank für die Ermöglichung und außerordentlich engagierte (nicht nur) wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit. Sie war immer ansprechbar, ständig diskussionsbereit und hatte auch in schwierigen Lagen noch rettende Ideen. Sie hat mich in meiner Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten nur bestätigt und mir sehr viel mit auf den Weg gegeben.

Herrn Priv.-Doz. Dr. R. Probstmeier danke ich sehr für die nette und kooperative Zusammenarbeit, die Einführung ins Klonieren und seine guten Ideen, mit denen er das Projekt immer wieder weiterbrachte.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. H.-J. Biersack für die Bereitstellung des Laborplatzes in seiner Klinik.

Der BONFOR-Stiftung danke ich herzlich für die Gewährung des Promotionsstipendiums und die zur Verfügung gestellten Sachmittel. Nicht zuletzt danke ich auch für die „Vorab-Prämierung“ der Ergebnisse dieser Arbeit in Form des BONFOR-Forschungspreises 2006. Frau I. Treschwig gilt besonderer Dank für ihre außerordentlich engagierte und freundliche Unterstützung im Rahmen des BONFOR-Programms.

Für die Bereitstellung der Ultrazentrifuge und die nette Zusammenarbeit danke ich Herrn Dr. K. Scholz und Herrn Prof. Dr. P. Knolle.

Ganz besonderer Dank geht auch an meine Laborkolleginnen Frau G. Beine für langwieriges Silikonisieren und an Frau N. Veit, die einige PCRs und Western Blots doch noch zum Erfolg führte.

Meinem Mann Felix danke ich für seine große Unterstützung und viele durchwachte Nächte im Labor, um mir bei der Nachtarbeit mentalen Beistand zu leisten.

Ganz besonders möchte ich an dieser Stelle meinen Eltern danken, die mir das Studium ermöglicht und mich die ganze Zeit nicht nur mental unterstützt haben.