

Diss. ETH Nr.: 9408

**Klonierung der Oligodendrozyten-assoziierten  
Erkennungsmoleküle J1-160/180**

ABHANDLUNG

Zur Erlangung des Titels

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

Babette Fuss

Dipl. Biologin, Ruhr-Universität Bochum (FRG)

geboren am 10.12.1961

von Essen, FRG

Angenommen auf Antrag von  
Prof. Dr. M. Schachner, Referent  
Prof. Dr. M. E. Schwab, Korreferent  
1991

*Schachner*  
28.1.92

## 1. Kurzfassung

Die J1-Glykoproteine stellen Komponenten der Extrazellulärmatrix dar, denen eine entscheidende Bedeutung bei Interaktionsvorgängen, wie der Erkennung zwischen Extrazellulärmatrix und Zelloberflächen, zukommt. Die J1-Glykoproteine mit den höheren apparenten Molekulargewichten (200-240 kDa) werden aufgrund ihrer immunologischen Verwandtschaft zu den im Huhn beschriebenen Proteinen Tenascin und Cytotactin, sowie dem humanen Hexabrachion, als J1/Tenascin bezeichnet. Sie werden schon früh in der Entwicklung exprimiert, kommen relativ weit verbreitet im sich entwickelnden Organismus vor und können in verschiedenen adulten Geweben, wie z.B. Muskel, Knorpel, Kapillaren und Gehirn nachgewiesen werden. Mit Hilfe von cDNA Sequenzdaten und bereits beschriebenen funktionellen Eigenschaften (z.B. adhäsive und inhibitorische Zell-Substrat Eigenschaften) konnte für die J1/Tenascin Moleküle ein multifunktionelles Strukturmodell entwickelt werden.

Die J1-Glykoproteine mit den niedrigeren Molekulargewichten (160 kDa, 180 kDa) werden - im Vergleich zu den J1/Tenascin Proteinen - nur im zentralen Nervensystem und später in der Entwicklung exprimiert. Sie können in Zellkulturen auf Oligodendrozyten, sowie im Myelin des zentralen Nervensystems nachgewiesen werden. Funktionelle Studien ergaben das Bild eines inhibitorischen Substrates für Neurone.

Zur näheren Charakterisierung von Struktur-Funktionsbeziehungen, sowie zur Beantwortung der Frage nach dem Verwandtschaftsgrad der J1-Glykoproteine zueinander sind cDNA-Sequenzdaten von entscheidender Bedeutung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Strategien zur Isolierung eines J1-160/180-spezifischen cDNA Klons angewandt. Erst das "Screenen" einer cDNA-Bibliothek, deren RNA aus Ratten-Oligodendrozyten isoliert worden war, mit polyklonalen Antikörpern führte zum Erfolg. Der so isolierte cDNA Klon kann aufgrund von drei unabhängigen Kriterien als J1-160/180-spezifisch angesehen werden. Erstens wird das Fusionsprotein dieses Klons von den J1-160/180 spezifischen monoklonalen Antikörpern 596, 619, 620 und schwach von dem monoklonalen Antikörper 597, der in Westernblot Analysen nur mit J1-180 reagiert, erkannt. Das Fusionsprotein zeigt keine Reaktivität mit polyklonalen J1/Tenascin Antikörpern. Zweitens enthält der cDNA Klon, dessen Insert eine Länge von ungefähr 5,6 kb hat, die Nukleinsäuresequenz, die für die N-terminale Aminosäuresequenz eines tryptischen Peptids des J1-160 Proteins codiert.

Drittens stimmt die untersuchte entwicklungsabhängige und gewebespezifische Verteilung der von diesem cDNA Klon erkannten mRNA mit den Daten überein, die für die Expression der Proteine beschrieben sind. Die mRNA hat eine ungefähre Größe von 12 kb.

Erste Analysen der cDNA Sequenzdaten ergeben eine dem Tenascin/Cytotactin sehr ähnliche Struktur. Das Protein, das von dem isolierten cDNA Klon codiert wird, setzt sich aus folgenden Strukturmerkmalen zusammen: eine Cysteinreiche, zum Tenascin/Cytotactin homologe N-terminale Region gefolgt von 4,5 "epidermal growth factor" (EGF)-ähnlichen Domänen, 9 Fibronectin Typ III Domänen und einer zum Fibrinogen homologen Domäne. Eine Signalsequenz - wie beim J1/Tenascin - ist in diesem cDNA Klon nicht vorhanden, was darauf zurückzuführen ist, daß der äußerste N-terminale Teil der Sequenz von diesem Klon nicht codiert wird. Erste Versuche zur Klonierung des 5'-Endes waren leider nicht erfolgreich.

## 2. Summary

The J1 glycoproteins are components of the extracellular matrix which are involved in interactions such as the recognition between extracellular matrix and cell surfaces. The higher molecular weight J1 components (200-240 kDa) are designated J1/tenascin because they are immunologically similar if not identical to chicken tenascin and cytotactin, as well as to human hexabrachion. They are expressed early in development where they show a widespread distribution and can also be found in different adult tissues such as muscle, cartilage, capillaries and brain. By a combination of cDNA sequence data with previously described functional properties (i.e. cell-substrate adhesion and repulsion), a multifunctional structural model for J1/tenascin molecules is proposed.

When the expression of the lower molecular weight J1 glycoproteins (160 and 180 kDa) is compared with that of the J1/tenascin proteins, the former are expressed only in the central nervous system and later in development. They are detectable in the myelin of the central nervous system and on oligodendrocytes in culture. Functional studies demonstrate their cell-repulsive substrate properties for neurons.

To further characterize structure-function relationships and to elucidate the structural relationship between the two lower molecular weight J1 components as well as between these two components and J1/tenascin, the isolation of cDNA clones coding for at least one of the two lower molecular weight components is of crucial significance. In the context of the present study different screening strategies were performed to obtain a J1-160/180-specific cDNA clone. The screening of a rat oligodendrocyte-derived cDNA library with polyclonal antibodies yielded one positive cDNA clone.. Three lines of evidence confirm the specificity of the isolated cDNA clone. First, the fusion protein of this clone is recognized by the J1-160/180-specific monoclonal antibodies 596, 619 and 620. It is weakly recognized by the monoclonal antibody 597 which in Western blots was shown to react only with J1-180. The fusion protein is not recognized by polyclonal antibodies to J1/tenascin. Second, the cDNA clone which has an insert of approximately 5.6 kb in size, contains the nucleotide sequence coding for the amino acid sequence of the N-terminus of a tryptic peptide derived from J1-160. Third, the developmental and tissue distribution of the mRNA recognized

by the cDNA clone, which has a length of approximately 12 kb, is in agreement with the described expression of the J1-160/180 proteins.

Initial analyses of the cDNA sequence data reveal a structure very similar to the one described for the J1/tenascin proteins. The protein encoded by the isolated cDNA clone is composed of a short cysteine-rich N-terminal region, homologous to the one described for tenascin/cytotactin, followed by 4.5 epidermal growth factor (EGF)-like domains, 9 fibronectin type III repeats and a domain homologous to fibrinogen. In contrast to tenascin/cytotactin, there is no signal sequence found within the available sequence. This is most likely due to the fact that the extreme N-terminal region of the protein is missing from the isolated cDNA clone. Unfortunately, first attempts to clone the 5'-end were unsuccessful.