

EXPRESSION UND LOKALISATION VON GALECTIN-1 UND GALECTIN-3 SOWIE DER HISTOCHEMISCHE NACHWEIS IHRER MÖGLICHEN GLYKOSYLIERTEN BINDUNGSSTELLEN IN FETALEN UND ADULTEN ORGANEN DES RINDES'

Kamil SEYREK²

Galectin-1 ve galectin-3'ün inek fetal organlarındaki varlık ve lokalizasyonlarının immunhistokimyasal ve immunblot teknikleri ile tesbiti

Özet: Lektinler enzim ve immunglobulin özelliğinde olmayan, oligosakkaritleri spesifik olarak tanıyıp bağlayabilen, metastaz, hücrelerarası haberleşme, glikoproteinlerin yön tayini ve hücre içi sinyal oluşumu gibi önemli birçok biyolojik olayın şekillenmesinde rol oynayan proteinlerdir(7). Galectinler de bu grup moleküllerden olup özellikle N-asetillaktozamine (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc) spesifiktirler. Embriyonal ve fetal gelişimin değişik evrelerinde gösterdikleri lokalizasyon ve yoğunluk farklılıklarından dolayı galectinlerin bu dönemlerdeki araştırılması büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada 40 ve 150'nci günler arasındaki inek fetüslerinin çeşitli organlarındaki galectin-1 ve galectin-3'ün ekspresyonları immunblot ve immunhistokimyasal metotlarla araştırıldı. Ayrıca bunların parafin kesitlerindeki olası ligandlarının tesbiti için biotin ile işaretlenmiş galectinler kullanıldı. Fetal gelişimin değişik evrelerindeki sonuçlar kendi içerisindeki ve yetişkin ineklerden elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldı. Biotin ile işaretlenmiş galectinlerle yapılan immunhistokimyasal çalışmalarda seyrek olarak spesifik reaksiyonlara rastlandı. Bu reaksiyonların β -galaktoza özgü bitkisel bir lectin olan mistellectin'inkilerinden farklı oldukları tesbit edildi. Ligandlarının aynı olmasına rağmen galectin-1'in daha çok düz kas hücrelerine ve galectin-3'ün ise epitel dokuya ve makrofajlara lokalize olmaları, bunların embriyonal ve fetal evrelerde farklı roller üstlendikleri kanısını vermektedir.

Anahtar kelimeler: Galectin, ekspresyon, lokalizasyon, embriyonal gelişme, inek.

Zusammenfassung: Lectine sind zuckerbindende Proteine nicht immunogenen Ursprungs, die keine enzymatische Aktivität aufweisen und von Enzymen und Antikörpern abgegrenzt sind (7). Sie können Oligosaccharidmotive als Liganden erkennen und biologische Effekte auslösen. Auch Galectine, die β -Galaktoside, wie z.B. N-Acetyllaktosamin binden können, gehören zu dieser Molekülklasse. Im Verlauf der Embryonal- bzw. Fötalentwicklung sind die Expressionsmuster von Kohlenhydrat-bindenden Proteinen von besonderem Interesse.

1. Doç. Dr. Herbert Kaltner (Ludwing-Maximilian Üniversitesi, Münih)'in yönetiminde hazırlanan aynı isimli doktora tezinden özetlenmiştir.

2. Dr., ADÜ Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Aydın.

weil sie zeitlich und räumlich unterschiedlich reguliert werden können. Glykosylierungsprozesse unterliegen gewebe- und entwicklungsspezifischen Veränderungen, die auf mögliche funktionelle Rollen schließen lassen.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Expression von Galectin-1 und Galectin-3 in verschiedenen fetalen Organen des Rindes zwischen dem 40. und 150. Tag p.c. untersucht. Dazu wurden die Techniken der Immunhistochemie und des Immunblots eingesetzt. Die Befunde der fetalen Entwicklungsstadien wurden mit Resultaten verglichen, die an Organen des adulten Rindes gewonnen wurden. Die histochemische Untersuchung mit biotinylierten Galectinen erbrachte nur sporadisch spezifische Anfärbungen zellulärer Strukturen, die jedoch völlig verschieden zur Spezifität von VAA, eines pflanzlichen Lectins mit nominell gleicher Zuckerspezifität, waren. Insgesamt lassen die Befunde dieser Arbeit vermuten, daß den untersuchten Galectinen aufgrund ihrer unterschiedlichen zellulären Lokalisation verschiedene Rollen in der Fetalentwicklung zukommen.

Schlüsselwörter: Galectin, Expression, Lokalisation, Embryonalentwicklung, Rind

Einleitung

Ausgehend von der Vorstellung, daß Glykosylierung keine bedeutungslose Modifikation von Proteinen oder Lipiden ist, mehren sich in den letzten Jahren die Befunde, daß Zuckerketten von Glykokonjugaten (Glykoproteine, Glykolipide, Proteoglykane sowie Heparin) auch als Liganden wirken können. Sie stellen also keineswegs inerte Strukturbestandteile dar, sondern sind biologische Informationsträger (7). Lectine bilden eine Teilgruppe der zuckerbindenden Proteine, die von Enzymen und Antikörpern abgegrenzt werden (7). Sie sind sowohl im Extrazellulärbereich und auf der Zellmembranen als auch intrazellulär in verschiedenen Kompartimenten lokalisiert. Ihre Funktionen umfassen zuckervermittelte Endozytose, die Zielsteuerung von Glykoproteinen in verschiedenen Zelltypen wie z.B. Hepatozyten, Makrophagen oder Tumorzellen, Vermittlung interzellulärer Wechselwirkungen mit Pathogenen oder Wirtszellen bzw. Zellen der Immunabwehr und Auslösung von Biosignaltransduktion (4,8,9,12). Eine dieser Proteinfamilien umfaßt endogene β -Galaktosid-spezifische Lectine, die Galectine. Diese sind im Tierreich weitverbreitet und in der Evolution bezüglich ihrer Sequenz relativ stark konservierte Proteine (11). Um ihre Funktion zu klären ist es notwendig, aus Geweben und Zellen Glykokonjugate zu isolieren, die physiologisch relevante Liganden dar-

stellen. Somit sollte in dieser Arbeit das Vorkommen und die zelluläre Lokalisation dieses Galectins in verschiedenen fetalen und adulten Organen des Rindes aufgezeigt werden. Neben Galectin-1 ist Galectin-3 eines der am häufigsten beschriebenen Mitglieder der Proteinfamilie der Galectine. Bovines Galectin-3 konnte bisher nicht nachgewiesen werden und folglich sind auch keinerlei Sequenz- und Strukturdaten verfügbar. So war im Rahmen dieser Untersuchung zu klären, ob Galectin-3 beim Rind vorkommt und in welchen Gewebetypen es auftritt. Zudem war es die Frage, inwieweit Galectin-1 und Galectin-3, die in etwa die gleiche Affinität für Poly-N-Acetyllaktosamine besitzen, in gleichen oder ähnlichen Zelltypen vorhanden ist. Eine weitere Aufgabenstellung dieser Arbeit war es, zu überprüfen, ob beide Galectine zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten auftreten und inwieweit morphologische Veränderungen in diesen Entwicklungsabschnitten sich mit der Expression in Bezug setzen lassen.

Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden an 20 Feten mit einer Scheitel-Steiß-Länge (SSL) von 3,0-30,5 cm von Schlachtkühen der Rasse Deutsches Höhen-Fleckvieh durchgeführt. Zur Isolierung von Galectin-1 aus einem Extrakt vom Rinderherz wurde eine Laktose-Affinitätsmatrix nach der Methode von Fronstedt und

Porath (1975) hergestellt. Dabei wurde Sepharose 4B mit Divinylsulfon aktiviert und anschließend nach einem Standardprotokoll mit Laktose gekoppelt. Das Gewebe wurde im Extraktionspuffer homogenisiert, über die in eine Säule gepackte Affinitätsmatrix gegeben und anschließend solange mit Waschpuffer gewaschen, bis kein nachweisbares Protein mehr von der Säule kam. Mit dem Elutionspuffer (0,3 M Laktose in PBS, pH 7,2) wurden die an die Matrix gebundenen Lectine abgelöst. Um die Kohlenhydrat-bindende Aktivität zu erhalten und die Ausbildung von Disulfidbrücken zu verhindern wurden die Sulfhydrylgruppen der im Protein enthaltenen Cysteine während der Elution durch Jodacetamid modifiziert. Auf ähnliche Weise wurde das Galaktose-bindende Lectin der Mistel (*Viscum album Agglutinin*, VAA) aus Mistellblättern gereinigt.

Zur Gewinnung polyklonaler Antiseren gegen bovines Galectin-1 und murines rekombinantes Galectin-3 wurden Kaninchen mit jeweils 150-200 µg Protein zusammen mit komplettem Freund's Adjuvans immunisiert (500 µl Proteinlösung und 500 µl Adjuvans). Die erste Boostering wurde im Abstand von 4 Wochen, die zweite im Abstand von sieben Wochen nach der Erst-Immunisierung mit jeweils 100 µg Protein in nichtkomplettem Freund's Adjuvans (500µl Proteinlösung und 500µl Adjuvans) durchgeführt. Zwei Wochen nach der zweiten Boostering wurden 20-30 ml Blut entnommen, das Serum gewonnen und die Immunglobulin G Fraktion mit Protein A-Sepharose Affinitätschromatographie gereinigt (Fa. Pharmacia, Freiburg). Die Biotinylierung der Lectine (bovines Galectin-1, murines Galectin-3 und VAA) wurde unter Aktivitätserhaltenden Bedingungen mit Biotinyl-N-hydroxysuccinimid durchgeführt. Das Protein wurde dazu auf 1 mg/ml Carbonatpuffer pH 8,0 eingestellt und 0,5 µg/mg Protein in Dimethylformamid gelöstes Biotin zugegeben. Zur Einhaltung der Lectin Aktivität wurden 20 mM Laktose zugesetzt. Zum Auftrennen von Proteinen anhand ihres Molekulargewichtes wurde die von LAEMMLI (1970) beschriebene Methode der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt.

Zum Immunhistochemische Verfahren wurden zunächst die Schnitte (5 µm) entparaffiniert, in absteigenden Alkoholreihe rehydriert, 30 Minute mit methanolischer H₂O₂ - Lösung behandelt, in PBS gewaschen, 30 Minute mit Ziegen Serum beladen, jeweils 15 Minute mit Avidin und Biotin blockiert und erster Antikörper (Anti-Galectin-1 IgG oder Anti-Galectin-3 IgG) aufgetragen. Der erste Antikörper wurde stets über Nacht bei 5 °C auf den Objektträgern belassen. Am nächsten Tag wurden die Objektträger mit PBS gewaschen, 1 Stunde mit dem Sekundäntikörper behandelt, mit PBS gewaschen, 1 Stunde mit Streptavidin-Biotin Horseradish Peroxidase Komplex (ABC-Komplex) belassen, anschließend mit Chromogenlösung beschichtet und in aufsteigende Alkoholreihe dehydriert.

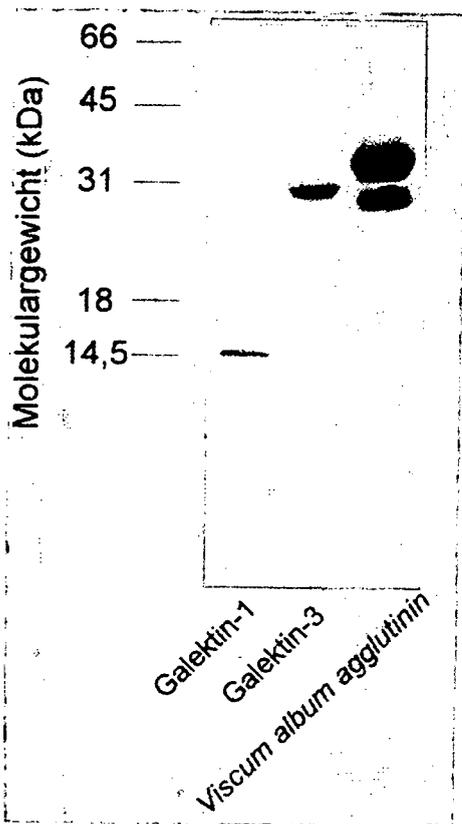


Abb. 1: Elektrophoretische Analyse der gereinigten Lectine in einem 15% SDS-Polyacrylamid-Gel unter reduzierenden Bedingungen. Galectin-1, 200 ng, ≈ 14,5 kDa, Galectin-3, 200 ng, ≈ 31 kDa, *Viscum album agglutinin*, 200 ng, B-Kette ≈ 36 kDa, A₁-Kette ≈ 29 kDa, A₂-Kette ≈ 27 kDa. Silberfärbung nach Blum et al. (1987).

Ergebnisse

Um sicherzugehen, daß es sich bei den isolierten Proteinen tatsächlich um Galectin-1 und Galectin-3 handelt, wurde ein Immunblot durchgeführt (Abb. 2 A und B). In allen untersuchten Eluaten sind die isolierten Proteine mit einem Molekulargewicht ~ 14 kDa immunreaktiv für den Anti-Galectin-1 Antikörper, hingegen die Proteinbanden mit einem Molekulargewicht ~ 31 kDa reaktiv mit dem Anti-Galectin-3 Antikörper. Der Vergleich der Expression von Galectin-1 und Galectin-3 in den verschiedenen Gewebearten deutet bereits an, daß Galectin-1 in nahezu allen Geweben relativ gleichförmig und hoch exprimiert vorhanden ist (Abb. 3 A und B). Galectin-3 liegt offenbar in geringeren Mengen vor und ist vermutlich auf spezielle, nicht in allen Gewebetypen auftretende Zellarten beschränkt. So konnte beispielsweise in Extrakten von Lungengewebebohren Galectin-3 im Westernblot erst dann nachgewiesen werden, wenn die Präparation überwiegend aus Bronchialepithelzellen bestand (Abb. 3 C und D). Beide Galectine konnten in Proteinextrakten des fetalen und adulten Thymus nachgewiesen werden (Abb. 3 B und C), Galectin-3 jedoch nur als relativ schwache Banden. In der fetalen und adulten Niere konnte in elektrophoretisch aufgetrennten Proteinextrakten Galectin-1 in allen untersuchten Stadien nachgewiesen werden (Abb. 3 A). Bovines Galectin-3 ergab allerdings erst dann sichtbare Banden im Immunblot, wenn es in einem Reinigungsschritt, der die Affinitätschromatographie mit Laktose-Sepharose CL4B umfaßte, aus mehreren Gramm Nierengewebe angereichert wurde. Im konzentrierten und lyophilisierten Eluat war es schließlich möglich, das Vorkommen von Galectin-3 im fetalen und adulten Nierengewebe zu dokumentieren. Offensichtlich liegt bovines Galectin-3 in sehr geringen Konzentrationen in der fetalen und adulten Niere vor. Proteinextrakte von fetalem und adultem Ho-

dengewebe wiesen im Immunblot in der Laufhöhe von bovinem Galectin-1 erkennbare Banden auf. Dagegen konnte Galectin-3 im Hodengewebe nicht nachgewiesen werden.

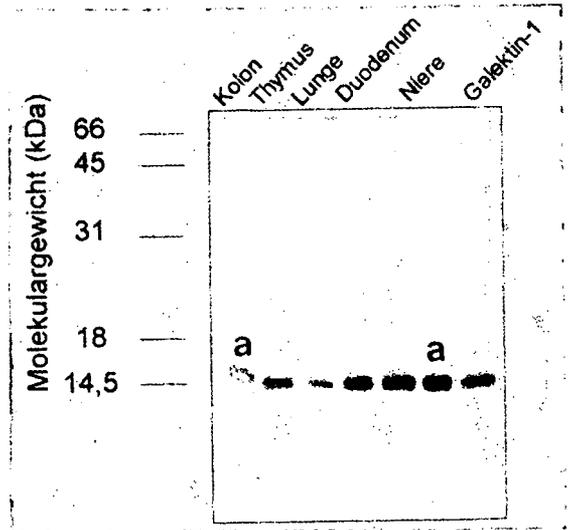


Abb. 2 A: Immunblot Analyse von gereinigtem bovinem Galectin-1 mit Anti-Galectin-1 IgG. Bovines Galectin-1 wurde aus Extrakten verschiedener Gewebeproben mittels Laktose-Sepharose 4B gereinigt. 5 μ g Probe aus den Eluaten wurde jeweils aufgetragen. Die fetalen Gewebeproben stammten von einem Rinderfetus mit SSL von 16,0 cm (ca. 90 Tage p.e.). Die mit (a) gekennzeichneten Baender stammen von adulten Tieren. Die Durchführung des Immunblots erfolgte wie im Methodenteil beschrieben

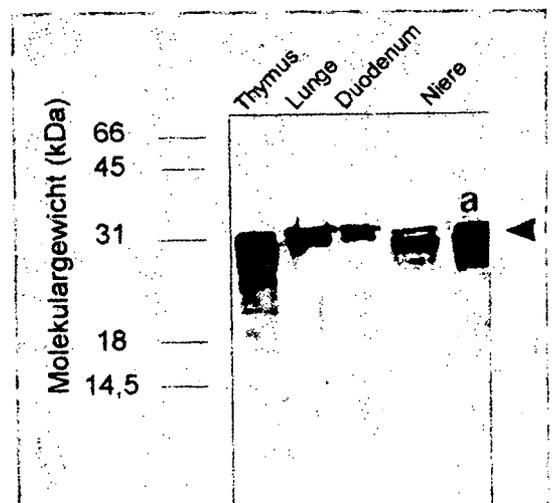


Abb. 2 B: Immunblot Analyse von gereinigtem bovinem Galectin-3 mit Anti-Galectin-3 IgG. Im Unterschied zur Abb. 2 A wurden hier jedoch 25 μ g Probe jeweils aufgetragen

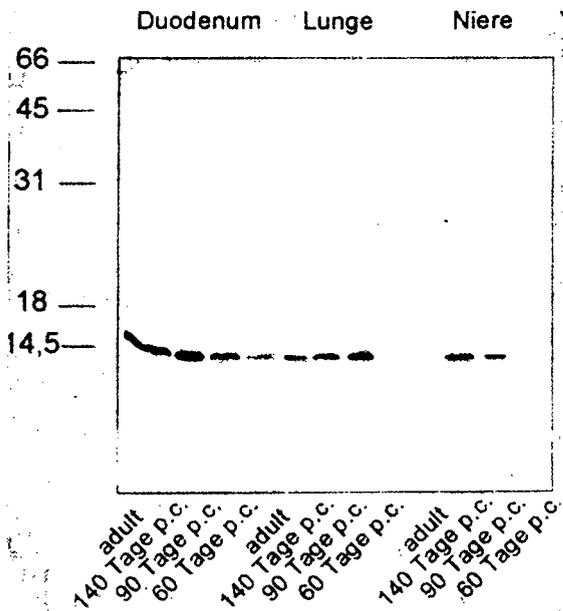


Abb. 3 A: Immunoblot Analyse der Expression von Galectin-1 in Duodenum, Lunge und Niere zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten. Die aufgetragene Proteinmenge prolaufbahn war 20µg Protein

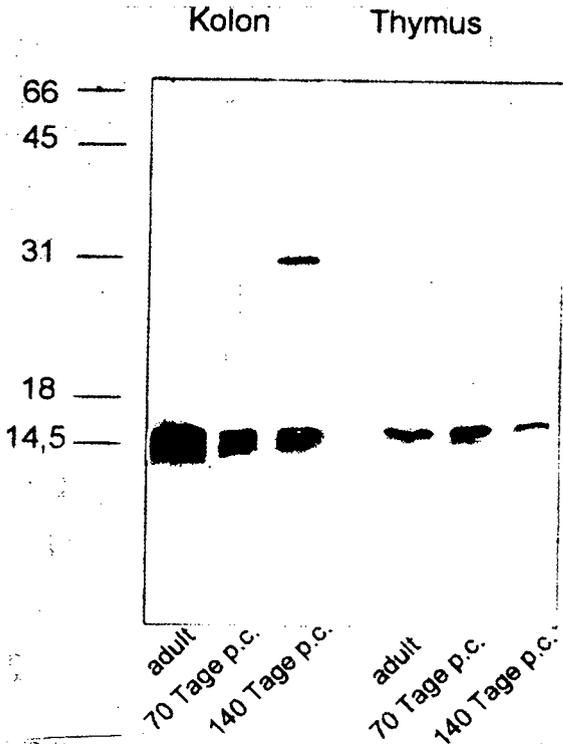


Abb. 3 B: Immunoblot Analyse der Expression von Galectin-1 in Kolon und Thymus zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten. Die aufgetragene Proteinmenge prolaufbahn war 20µg Protein

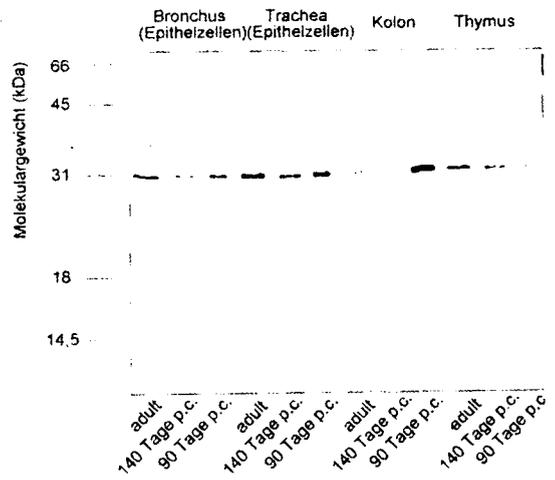


Abb. 3 C: Immunoblot Analyse der Expression von Galectin-3 in verschiedenen Gewebetypen. Die aufgetragene Proteinmenge prolaufbahn war 20µg Protein.

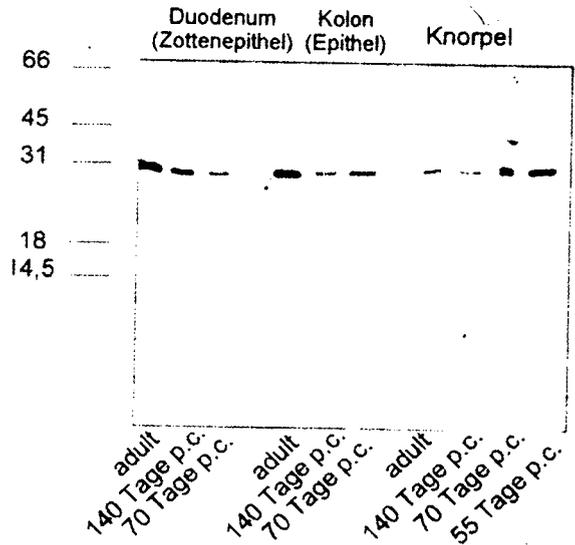


Abb. 3 D: Immunoblot Analyse der Expression von Galectin-3 in Duodenum/Kolon-Epithel und in Knorpel. Die aufgetragene Proteinmenge prolaufbahn war 20µg Protein.

Immunhistochemisch konnten Galectin-1 und Galectin-3 in fetalen und adulten Thymus nachgewiesen werden (Abb. 4 A-C). Thymozyten reagieren offensichtlich nicht mit beiden Antikörpern, während nicht-lymphatische Zellen deutlich markiert werden. Im Fall von Galectin-3 sind verstreut über *Cortex* und *Medulla* reaktive Makrophagen und in-terdigitäre Zellen zu beobachten (Abb. 4 B). Antikörper, die gegen Galectin-1 gerichtet sind, führen zu einem anderen Färbemuster. Wie aus Abbildung 4 A ersichtlich ist, reagieren die po-

lyklonalen Anti-Galectin-1 Anti-körper mit Zellen in den Bindegewebe-septen, mit glatten Muskelzellen von Arteriolen, Bindegewebezellen und Epithelzellen des Thymus-zytoretikulums, die die Bindegewebe-septen umhüllen. Von den biotinylierten Lectinen, die eingesetzt wurden, um Oligosaccharidepitope zu de-tek-tieren, die mögliche Bindungsstellen darstellen, konnte nur Galectin-1-Biotin spezifische Zuckerepitope bei Makrophagen nachweisen (Abb. 4 C). Die Hassal'schen Körperchen, die degenerierte Epithelzellen im Zentrum des Marks darstellen, zeigen keine Immunreaktion. Das Färbemuster beider Antikörper bleibt über den untersuchten Entwicklungszeitraum hinweg konstant.

In der weiblichen Keimdrüse, deren Entwicklung in der vorliegenden Studie sich von einfachen Keimballen mit Primordialkeimzellen (SSL 35 mm, ca. 45 Tage p.c.) bis zu den sich differenzierenden Keimsträngen mit Ovogonien und primären Oozyten erstreckt, wird Galectin-1 und Galectin-3 lediglich in den aus anderen Gewebetypen schon bekannten Strukturen gefunden. Antikörper gegen Galectin-1 reagieren wie bereits in anderen Organen beobachtet mit glatten Muskelzellen, besonders der *Tunica media* der Gefäße, während Anti-Galectin-3 IgG als Gewebemakrophagenmarker in der *Theca* in Erscheinung treten. Am Ovar des adulten Tieres ist nach Inkubation mit Anti-Galectin-1 IgG eine leichte diffuse Färbung in der *Corona radiata* zu sehen, während Körnerschicht, *Theca interna* und die Oozyte selbst frei von Färbung sind. Die verwendeten biotinylierten Lectine erkennen Oligosaccharidepitope, die die Glykoproteine der *Zona pellucida* (ZP1 - ZP3) der Oozyte präsentieren. Galectin-1-Biotin und Galectin-3-Biotin bewirken eine durchgehende Färbung der *Zona pellucida*, während biotinyliertes Lectin der Mistel (VAA) nur den äußeren Rand zeichnet (Abb. 4 D).

Während die Expression von Galectin-3 in keiner zellulären Struktur des Hodens, auch nicht mit verschiedenen Techniken der Gewebefixierung, dargestellt werden konnte, traten nach Inkubation der Gewebeschnitte mit Anti-Galectin-1 Antikörpern typische Färbemuster auf. Insbesondere die peritubulären kontraktilen Zellen, die die *Tubuli seminiferi* umgeben, werden in Gewebeschnitten des adulten Hodens

gefärbt. In den Fetalstadien sind dagegen die typischen auch schon aus anderen Organen bekannten Färbungen der glatten Muskelzellen der *T. media* von Arteriolen und kleinen Arteriolen zu sehen. In allen Entwicklungsstadien des Hodens färbt VAA Endothelzellen einschließlich der *Elastica interna*. Im Hodengewebe, das Feten mit einer Scheitel-Steißlänge von 8 cm (ca. 60 Tage p.c.) entnommen wurde, färbt sich das Zytoplasma von Gonozyten stark positiv an (Abb. 4 E). Im weiteren Verlauf der Entwicklung verliert sich die Intensität immer mehr bis sie schließlich ganz verschwindet. Im adulten Hodengewebe besitzen Spermatiden, die sich in der Golgi- und/oder Akrosomphase der Spermatogenese befinden, spezifische Zuckerepitope, die von VAA erkannt werden. Die angefärbten Areale besitzt die Form eines Halbmondes (Abb. 4 F).

Im Kolon und Duodenum ist Galectin-1 während der gesamten untersuchten Entwicklungsphase in glatten Muskelzellen der *Lamina propria mucosae*, der sich ausbildenden *Lamina muscularis mucosa*, der *Tunica externa* und *interna* vorhanden. Wie auch in anderen Organen ist Galectin-1 zudem in den glatten Muskelzellen der *Tunica media* der arteriellen Blutgefäße zu finden. Galectin-3 hingegen tritt in den Epithelzellen der Darmzotten (*Lamina epithelialis der Tunica mucosa*), der Darmkrypten (Lieberkühn'sche Krypten) bzw. den Epithelzellen der *Glandulae intestinales* des Kolons auf. Bis zu ca. 40 Entwicklungstagen lassen sich mit den Antikörpern gegen beide Galectine keine Immunfärbungen erzielen. Im Entwicklungsstatus des 60. Tages p.c. (SSL 7,0 cm) bzw. 90. Tages p.c. (SSL 16,0 cm) tritt Immunreaktivität für Galectin-1 in den glatten Muskelzellen von *Tunica externa* und *interna* bzw. in mesenchymalen Zellen der Submukosa und *Lamina propria* auf, während Galectin-3 zu diesem Entwicklungszeitpunkt nur in den Epithelzellen der Zottenspitzen vorhanden ist (Abb. 5 A und B). Im adulten Stadium beschränkt sich das Vorkommen von bovinem Galectin-3 auf das lumenseitige Zottenepithel und zytoplasmatische Anfärbung (Abb. 5 D). Die Verwendung biotinylierter Lectine ergibt z.T. typische Färbemuster. Galectin-1-Biotin bindet nur sehr schwach an die Epithelzellen der Zotten des Duodenums und der Epithelzellen der *Glandulae intestinales*.

Im ca. 40 Tage alten Rinderembryo (SSL 3,0 cm), der dem embryonalen Abschnitt der Lungenentwicklung zuzuordnen ist, reagierte weder mesenchymales Gewebe noch das mehrschichtige Epithel der Lappenbronchi mit polyklonalen Antikörpern gegen Galectin-1 und -3. Am Beginn der anschließenden pseudoglandulären Periode (50. Entwicklungstag), in der die Lunge einer tubulo-azinären Drüse gleicht, findet sich Galectin-1 vor allem in Mesenchymzellen zwischen den Bronchialsprossen. Wie aus Abbildung 6F hervorgeht sind reaktive Mesenchymzellen in Kondensationszonen um sich entwickelnde Bronchiolen zu sehen. Vermutlich differenzieren diese zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt zu Chondroblasten und Myoblasten. Eine schwache Anfärbung ist auch in den glatten Muskelzellen der *T. media* sich entwickelnder arterieller Blutgefäße zu beobachten. Während Galectin-3 vor allem in den Epithelzellen des respiratorischen Epithels der Bronchen, Bronchiolen und der Trachea sowie im bronchialen und trachealem Stützknorpel zu finden war, bleibt das sich differenzierende respiratorische Epithel des Bronchialbaums und der Trachea frei von Galectin-1 (Abb. 6 A und B). Das Vorkommen von Galectin-3 wird deutlich entwicklungsabhängig reguliert. In den embryonalen Gewebeschnitten, die dem Beginn der pseudoglandulären Periode zuzuordnen sind, war zunächst keine Färbung zu sehen. Erst in Gewebeschnitten der adulten Lunge wurde maximale Färbintensität im Epithel von Bronchiolen und Bronchien erreicht. Überraschenderweise ist fetal Galectin-3 nicht in Epithelzellen der kleinen und der respira-

torischen Bronchiolen anzutreffen, und auch im ausdifferenzierten, adulten Gewebe weist das einfache kubische Epithel der kleinsten Bronchiolen nur eine schwache zytoplasmatische Färbung auf. Im Lungenparenchym, d.h. im Bereich der respiratorischen Bronchiolen und der Alveolen, konnten insbesondere in der adulten Lunge Gewebemakrophagen durch Galectin-3 markiert werden (Abb. 6 D).

Offensichtlich liegt bovines Galectin-3 in sehr geringen Konzentrationen in der fetalen und adulten Niere vor. Betrachtet man die histochemische Lokalisation, beispielhaft an einem Gewebeschnitt eines Fetus im Alter von 130 Tagen p.c. gezeigt, so fällt auf, daß Galectin-3 nur in bestimmten Nephronsegmenten auftritt. Glomeruli und die Strukturen des proximalen Tubulus (*Pars convoluta*, *Pars recta*) sind offensichtlich frei von Galectin-3. Ebenso der dicke absteigende Schenkel des proximalen Tubulus, die Abschnitte des intermediären Tubulus, das Verbindungstück (*Pars conjungens*) und die Sammelrohre. Eine deutliche Immunreaktion findet sich hingegen im dicken aufsteigenden Schenkel und im Tubuluskonvolut des distalen Segments (Abb. 6 G). Ein völlig anderes Verteilungsmuster lag vor, wenn die Lokalisation von Galectin-1 mit entsprechenden Antikörpern aufgezeigt wurde. Von den Abschnitten des Nephrons waren Glomeruli reaktiv, während in den tubulären Abschnitten einschließlich des Verbindungstückes und der Sammelröhren Galectin-1 nicht exprimiert wird. Zwischen den tubulären Nephronsegmenten ist eine schwache Färbung des Interstitiums zu erkennen.



Abb. 4 A: Lokalisation von Galectin-1 im Thymus eines Rinderfetuses mit einer SSL von 30,5 cm (ca. 140 Tage p.c.). Der Ausschnitt zeigt Bindegewebescheiden zwischen Thymusläppchen. Galectin-1 ist vor allem in Bindegewebezellen, in der *T. media* von Blutgefäßen (▶) und epithelialen Retikulumzellen vorhanden (E) Balken 50 µm. - 120x.

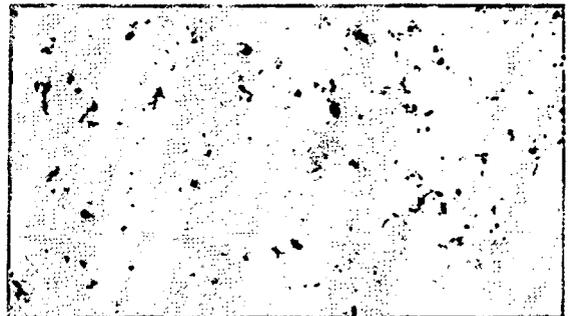


Abb. 4 B: Lokalisation von Galectin-3 im Thymus eines Rinderfetuses mit einer SSL von 16,0 cm (ca. 90 Tage p.c.). Der Ausschnitt zeigt die Verteilung von Reaktiven Makrophagen in *Cortex* und *Medulla*. Balken 50 µm. - 120x.

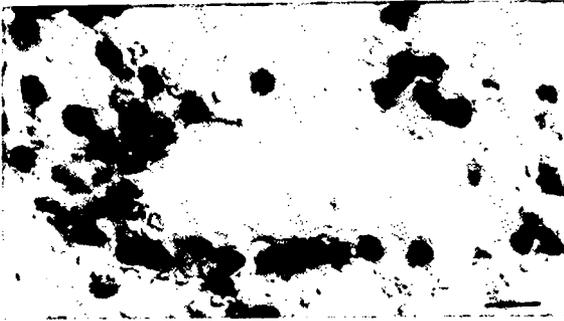


Abb. 4 C: Bindung von biotinyliertem Galectin-1 an Makrophagen eines Kalberthymus, die aus einem Blutgefäß in das Thymusgewebe einwandern. *Balken* 20 μm . - 545x.

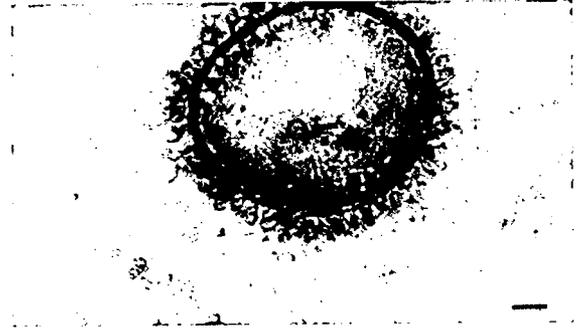


Abb. 4 D: Bindung von Biotin-markiertem Galectin-3 an die *Zona pellucida* (\blacktriangleright), das Ooplasm (O) *Balken* 20 μm . - 340x.

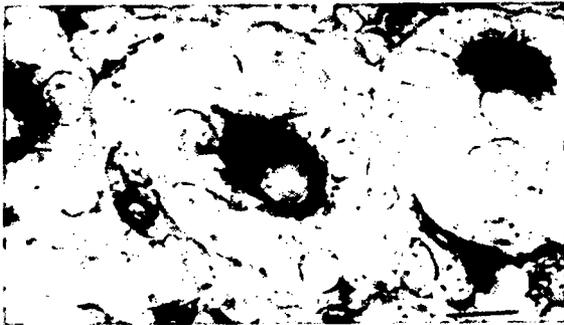


Abb. 4 E: Bindung von biotinyliertem Biotin-markiertem Galectin-3 an die *Zona pellucida* (\blacktriangleright), das Ooplasm (O) *Balken* 20 μm . - 340x.



Abb. 4 F: Bindung von biotinyliertem *Viscum album* agglutinin in der Spermigenese eines adulten Rindes Akrosomphase. *Balken* 20 μm . - 260x.



Abb. 5 A: Lokalisation von Galectin-3 im Kolonepithel eines Rinderfetus mit einer SSL von 7.0 cm. *Balken* 20 μm . -340x.



Abb. 5 B: Ausschnitt aus der Dickdarmschleimhaut eines Rinderfetus mit einer SSL von 16 cm mit Antikörpern gegen Galectin-1. *Balken* 50 μm . -135x



Abb. 5 C: Ausschnitt aus der Dickdarmschleimhaut eines Rinderfetus mit einer SSL von 30.5 cm mit Antikörpern gegen Galectin-1. *Balken* 20 μm . -270x



Abb. 5 D: Bovines Galectin-3 im Zottenepithel des adulten Duodenums. Die Kerne sind frei von Antigen. Balken 20µm.-340x



Abb. 5 E: Lokalisation von Galectin-3 in den Glandulea intestinales des Kolons des adulten Rindes. Bovines Galectin-3 im Zottenepithel des adulten Duodenums. Balken 50µm.-135x



Abb. 5 F: Immunhistochemische Lokalisation von Galectin-1 im Epithel des Duodenums eines adulten Tieres. Balken 20µm.-340x

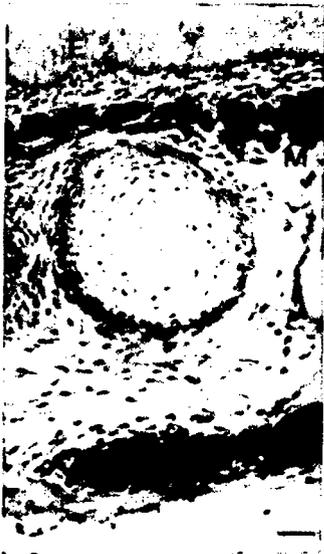


Abb. 6 A: Lokalisation von Galectin-1 in der Trachea eines Fetus mit einer SSL von 16 cm. Muskulatur(M▶), Epithelzellen (E) Balken 20µm. -340x



Abb. 6 B: Lokalisation von Galectin-3 im Epithel der Trachea (▶) und im Stützknorpel eines Fetus mit einer SSL von 16 cm. Balken 20µm. -220x



Abb. 6 C: Lokalisation von Galectin-3 im Epithel der Trachea (▶) und eines adulten Tieres Balken 20µm. -340x



Abb. 6 D: Lungenbläschen einer adulten Lunge. Alveolarwand sitzenden Makrophagen (▶) werden deutlich von Anti-Galectin-3 Antikörpern markiert. Balken 20µm. -340 x



Abb. 6 E: Zytoplasmatische Lokalisation von Galectin-3 in Epithelzellen einer Bronchiole der adulten Lunge. Balken 10µm. -340x

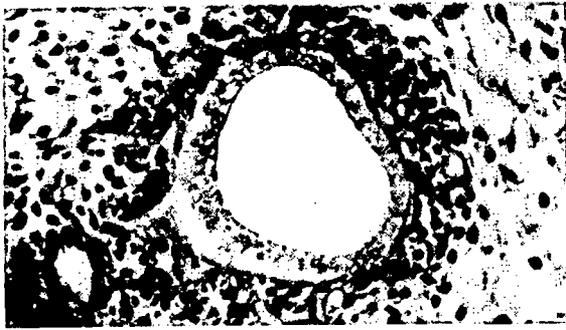


Abb. 6 F: Querschnitt einer Bronchialsprosse umgeben von einer Ansammlung von Mesenchymzellen, die mit Anti-Galectin-1 Antikörpern reagieren. SSL 7,0 cm. Balken 20µm. -340 x.



Abb. 6 G: Lokalisation von Galectin-3 in der Niere eines Rinderfetuses mit einer SSL von 30,5 cm (G) Glomerulus. Balken 20µm. -340 x.

Diskussion

In der vorliegenden Untersuchung wurde zum ersten Mal der Nachweis erbracht, daß auch in der Fetalentwicklung des Rindes eine bovine Form des Galectin-3 auftritt und hauptsächlich in Epithelzellen vorhanden ist. Das zweite in diese Arbeit einbezogene Galectin, nämlich Galectin-1, wurde ursprünglich aus Rinderherz isoliert, bevor es auch in anderen Spezies nachgewiesen werden konnte. Trotz weitgehend erfolgter Strukturbeschreibung waren bisher keine Informationen vorhanden, in welchen Geweben und Zelltypen Galectin-1 in der bovinen Fetalentwicklung enthalten ist. Die Ergebnisse zeigen, daß Galectin-1 relativ ubiquitär in mesenchymalen Zellen, im Bindegewebe und in der extrazellulären Matrix auftritt. Vorzugsweise findet sich Galectin-1 jedoch in den Muskelzellen der glatten Muskulatur, wo es intra- und extrazellulär vertreten ist. So wird beispielsweise die *T. media* von

Blutgefäßen des arteriellen Typs durch Anti-Galectin-1 Antikörper markiert. Besonders auffällig wird dies in der vorliegenden Untersuchung, wenn man die Expression von Galectin-1 im epithelialen Retikulum des Thymus betrachtet. Wechselwirkungen zwischen retikulären Epithelzellen des Thymus und sich entwickelnden Thymozyten stellen wichtige Selektionsschritte in der Reifung immunkompetenter T-Lymphozyten dar.

Im Vergleich mit Galectin-1 zeigte Galectin-3 ein besonders spezifisches Expressionsmuster im sich differenzierenden Gewebe des Rinderfetuses. So markieren Anti-Galectin-3 Antikörper in allen Geweben Makrophagen, exemplarisch dargestellt bei der Beschreibung der histochemischen Befunde am Thymusgewebe. Die Expression des bovinen Galectin-3 wird in den untersuchten Organen Lunge, Duodenum und Kolon entwicklungsabhängig reguliert. Dabei deutete sich bereits

nach ca. 60 Entwick-lungstagen eine starke Ex-pression in der Mukosa des Duodenum und Kolons an. Ein derartiger Befund konnte bei der Untersuchung des Mäuseembryos nicht be-stätigt wer-den (5). Diese Diskrepanz ist ver-mutlich auf Speziesunterschiede oder unter-schiedliche zeitliche Modulierung der Expres-sion zurückzuführen.

Im Gegensatz zu biochemischen Experi-menten, in denen durch die Gewebezzerstörung (homogenisieren) eine Trennung endogener Lectine von ihren Glykoliganden erfolgt, liegen *in situ*, durch den Fixie-rungsprozeß bedingt, mögliche glykosylierte Liganden durch ihre endogenen Lectine "maskiert" vor. Frei vor-liegende Glykostrukturen, die an das pflanz-liche Lectin (VAA) mit no-minell gleicher Spe-zifität als die Galektine binden, werden den-och nicht selbstverständlich durch bio-tinylierte Galektine erkannt. Dies konnte in der vorliegenden Untersuchung besonders an Sper-mien und Spermatiden im Hoden gezeigt werden. Aus derartigen Ergebnissen läßt sich schlußfolgern, daß biochemische *in vitro* er-mittelte Spezifitätsunterschiede auch *in situ* am Ge-webeschnitt zum Ausdruck kommen.

Litaraturverzeichnis

1. Barondes, S.H., Cooper, D.N., Gitt, M.A., Leffler, H. (1994) *Galectins: Structure and function of a large family of animal lectins*. J Bio Chem 19: 20807-2810.
2. Bresalier, R.S., Mazurek, N., Sternberk, L.R., Byrd, J.C., Yumlar, L.K., Nangia-Mak-ker, P., and Raz, A. (1998) *Metastasis of human colon cancer is*

altered by modifying expression of the b-galactoside-binding protein galectin-3. Gastroenterology 115: 287-296.

3. Cooper, D.N.W., Massa, S.M. and Barondes, S.H. (1991) *Endogenous muscle lectin inhibits myoblast adhesion to laminin*. J Cell Biol 115: 1437-1448.
4. Drickamer, K. and Taylor, M.E. (1993) *Biology of animal lectins*. Annu Rev Cell Biol 9: 237-264.
5. Fowles, D., Colnot, C., Ripoche, M.A. and Poirier, F. (1995) *Galectin-3 is expressed in the notochord, developing bones, and skin of the postimplantation mouse embryo*. Dev Dyn 203: 241-251.
6. Gabius, H.-J. and Bardosi, A. (1991) *Neoglycoproteins as tools in glycohistochemistry*. Progr Histochem Cytochem 22: 1-66.
7. Gabius, S. und Gabius, H.-J. (1992) *Angewandte Lectinforschung*. Biologie in unserer Zeit 22: 330-335.
8. Gabius, H.-J. (1997a) *Animal lectins*. Eur J Biochem 243: 543-576.
9. Hughes, R.C. (1992) *Lectins as cell adhesion molecules*. Curr Opin Struct Biol 2: 687-692.
10. Kaltner, H. and B. Stierstorfer (1998) *Animal lectins as cell adhesion molecules*. Acta Anat 161: 162-179.
11. Kasai, K. and Hirabayashi, J. (1996) *Galectins: a family of animal lectins that decipher glycocodes*. J Biochem 119: 1-8.
12. Sharon, N. and Lis, H. (1989) *Lectins as recognition molecules*. Science 246: 227-234.
13. Wang, S.-Y., Voss, P.G., Patterson, R.J. and Wang, J.L. (1995) *Studies on the cell surface ver-sus nuclear localization of galectin-3, Antibody. Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals* 8: 311-324.

Yazışma Adresi

Doç. Dr. Kamil Seyrek
 Adnan Menderes Üniversitesi
 Veteriner Fakültesi
 Biyokimya Anabilim Dalı. AYDIN