

Analyse der LIMP-2
(Lysosomales Integrales Membranprotein-2)
defizienten Maus

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
an der Fakultät für Biochemie
der Christian-Albrecht-Universität Kiel

vorgelegt von
Cathrin Claussen

2005

1. Einleitung	1
1.1 Der intrazelluläre Transport.....	1
1.2 Lysosomen.....	2
1.3 Endosomen und <i>Multivesicular Bodies</i> (MVB).....	4
1.4 Hybridorganell (Hybrid zwischen späten Endosomen und Lysosomen)..	6
1.5 Bedeutung des AP-1, AP-2, AP-3, AP-4 Komplexes und GGAs für den intrazellulären Transport.....	7
1.6 Die lysosomale Membran und ihre Proteine.....	9
1.7 Das Limp-2 Gen.....	14
1.8 Die Limp-2 Knock-out Maus.....	15
1.8.1 Entwicklung von Hydronephrosen in Limp-2 defizienten Mäusen.....	16
1.8.2 Taubheit der Limp-2 Knock-out Mäuse.....	18
1.8.3 Periphere Neuropathie in Limp-2 defizienten Mäusen	20
2. Problemstellung	23
3. Material und Methoden	24
3.1 Material.....	24
3.1.1 Geräte.....	24
3.1.2 Verbrauchsmaterial.....	25
3.1.3 Chemikalien.....	26
3.1.4 Verwendete <i>Kits</i>	28
3.1.5 Vektoren.....	28
3.1.6 Oligonukleotide.....	28
3.1.7 Zelllinien und Kulturmedien.....	29
3.1.8 Mausstämme.....	30
3.1.9 Zellkulturmedien und Lösungen zur Arbeit mit Zellen.....	30
3.1.10 Eingesetzte Primärantikörper.....	31
3.1.11 Eingesetzte Sekundärantikörper.....	32

3.2	Methoden.....	33
3.2.1	Zellbiologische Methoden.....	33
3.2.1.1	Präparation primärer Fibroblasten aus Limp-2 defizienten Embryonen und Kontroll-Embryonen aus der Maus.....	33
3.2.1.2	Präparation adulter Fibroblasten aus Limp-2 defizienten Mäusen und Kontroll-Mäusen.....	34
3.2.1.3	Kokultivierung von dorsalen Wurzelganglien und Schwann-Zellen aus dem Nervus ischiadicus.....	34
3.2.1.4	Passagieren von adhärenenten Zellen.....	35
3.2.1.5	Cryokonservierung von Zellen.....	36
3.2.1.6	Revitalisierung von Zellen.....	36
3.2.1.7	Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen.....	37
3.2.1.8	Indirekte Immunfluoreszenz an Zellkulturzellen.....	37
3.2.1.9	Mycoplasmandetektion und –behandlung.....	38
3.2.1.10	Fluoreszenzmarkierung von Cholesterol in embryonalen und adulten Zellen.....	40
3.2.1.11	Internalisierungs-Experimente von Dextran, Transferrin und Lysotrackern in embryonale Fibroblasten.....	41
3.2.1.12	Quervernetzung (<i>Crosslink</i>) von Proteinen an lebenden Zellen.....	43
3.2.2	Biochemische Methoden.....	45
3.2.2.1	Herstellung von Homogenaten aus Mausgeweben und -organen für die SDS-PAGE.....	45
3.2.2.2	Isolierung von Blasenurothel für die SDS-PAGE.....	45
3.2.2.3	Herstellung von Homogenaten aus Zellkulturzellen für die SDS-PAGE.....	46
3.2.2.4	Immunpräzipitation (IP) von Proteinen aus Zell-Lysaten.....	47
3.2.2.5	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	47
3.2.2.6	Aktivitätsbestimmungen der lysosomalen Hydrolase β -Hexosaminidase in Homogenaten aus dem Nervus ischiadicus.....	48
3.2.2.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	48
3.2.2.8	Coomassie-Färbung.....	49

3.2.2.9	Silberfärbung nach Blum (Blum <i>et al.</i> , 1987).....	50
3.2.2.10	Trocknen von gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen.....	51
3.2.2.11	Westernblot (Transfer von Proteinen auf Membranen).....	51
3.2.2.12	Immunodetektion von Proteinen auf Membranen.....	51
3.2.2.13	Ponceau S-Färbung der Westernblot Membran.....	52
3.2.2.14	Freiwaschen der PVDF-Membranen von Antikörpern.....	52
3.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	53
3.2.3.1	Isolierung genomischer DNA aus Mausgewebe (Schwanzbiopsien).....	53
3.2.3.2	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	53
3.2.3.3	DNA-Amplifikation über die Polymerase-Ketten-Reaktion.....	54
3.2.3.4	Genotypisierung der Mäuse durch den Nachweis von Lmp-2 DNA per PCR.....	54
3.2.3.5	Auftrennung von DNA in Agarosegelen.....	55
3.2.4	Histologische Methoden.....	56
3.2.4.1	Perfusion von Mäusen.....	56
3.2.4.2	Einbettung der Gewebe in Paraffin.....	57
3.2.4.3	Erzeugung der Paraffinschnitte.....	58
3.2.4.4	Deparaffinierung der Gewebe.....	58
3.2.4.5	Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung).....	59
3.2.4.6	Indirekte Immunfluoreszenz an Paraffinschnitten.....	59
3.2.5	Mikroskopie.....	60
3.2.6	Maushaltung.....	61
3.2.7	Hörmessungen.....	61

4. Ergebnisse	62
4.1 Nachweis der Limp-2 Defizienz.....	62
4.2 Expressionen lysosomaler Proteine in Limp-2 defizienten Tieren.....	66
4.3 MPR46-Expression.....	68
4.4 Zusammenfassung der bisherigen Immunoblot-Analyse	70
4.5 Limp-2 Defizienz führt zu einer erhöhten Mortalität.....	71
4.6 Limp-2 Defizienz führt zur Schädigung des Urogenitalsystems.....	73
4.6.1 Limp-2 Lokalisierung im Ureter.....	74
4.6.2 Ureterveränderungen.....	75
4.6.2.1 Verteilung der verschiedenen Uroplakine im Ureter von Wildtyp-Mäusen und Limp-2 Knock-out-Mäusen.....	77
4.6.3 Veränderungen im Blasenurothel der Limp-2 defizienten Maus.....	81
4.6.3.1 Limp-2 Lokalisierung in der Blase.....	84
4.6.3.2 Verteilung der verschiedenen Uroplakine im Blasenurothel.....	84
4.7 Limp-2 Defizienz führt zu Schwerhörigkeit mit folgender Taubheit.....	89
4.7.1 Hörmessungen.....	90
4.7.2 Mikroskopische Untersuchungen der Cochlea.....	91
4.7.2.1 Veränderungen im Corti-Organ Limp-2 defizienter Mäuse.....	92
4.7.2.2 Veränderungen der Stria vascularis Limp-2 defizienter Mäuse...	94
4.7.2.3 Limp-2 Lokalisierung in der Stria vascularis.....	96
4.7.2.4 Nachweis verschiedener Proteine in der Stria vascularis.....	97
4.8 Limp-2 Defizienz führt zur Entwicklung einer peripheren Neuropathie..	103
4.8.1 Mikroskopische Untersuchungen.....	103
4.8.1.2 Limp-2 Lokalisierung im Nervus ischiadicus.....	105
4.8.1.3 Lokalisierung der Myelinproteine im Nervus ischiadicus.....	106
4.8.2 Expression peripherer Myelinproteine.....	107
4.8.3 Expression lysosomaler Proteine in peripheren Nerven.....	109
4.8.4 Enzymaktivität in peripheren Nerven.....	111
4.8.5 Versuch der Kultivierung reiner Schwanzzellkulturen aus dem Nervus ischiadicus der Maus.....	112

4.8.6 Analyse der Kokultur aus dorsalen Wurzelganglien (DRGs) und Schwannzellen.....	112
4.9 Untersuchungen an embryonalen und adulten Fibroblasten.....	116
4.9.1 Westernblot-Analysen an embryonalen Fibroblasten.....	117
4.9.2 Immunfluoreszenz an embryonalen Fibroblasten.....	118
4.9.3 Immunfluoreszenz an adulten Fibroblasten.....	120
4.9.4 Internalisierungs-Experimente an embryonalen Fibroblasten.....	123
4.9.5 Versuch zur Ermittlung von Interaktionspartnern mittels Quervernetzung	126
5. Diskussion	131
5.1 Allgemeines über die Limp-2 Knock-out-Maus.....	133
5.2 Schädigungen des Urogenitalsystems der Limp-2 Knock-out-Maus.....	134
5.2.1 Hydronephrosen.....	134
5.2.2 Mögliche Zusammenhänge zwischen einer gestörten Uroplakin- Expression und der Limp-2 Defizienz im Urogenitaltrakt.....	135
5.3 Taubheit der Limp-2 Knock-out-Maus.....	138
5.3.1 Veränderungen in der Stria vascularis der Limp-2 Knock-out-Maus.....	138
5.4 Periphere Neuropathie der Limp-2 Knock-out-Maus.....	141
5.5 Gemeinsamkeiten in den drei betroffenen Zelltypen der Limp-2 Knock-out-Maus.....	143
5.6 Vermutete Funktion von Limp-2.....	144
6. Zusammenfassung	149
7. Literaturverzeichnis	151
8. Abkürzungen	177

1. Einleitung

Die eukaryotische Zelle

Die eukaryotische Zelle untergliedert sich in isolierte Kompartimente, die durch Lipidmembranen voneinander getrennt sind. Diese werden allgemein als Organellen oder Vesikel bezeichnet und setzen sich aus spezifischen Proteinen und Lipiden zusammen, wodurch sie spezielle Funktionen erfüllen können.

1.1 Der intrazelluläre Transport

Um die Charakteristika der Vesikel zu erzeugen und aufrecht zu erhalten, müssen ihre Bestandteile selektiv in diese transportiert werden.

Endozytose ist die aktive Aufnahme großer Makromoleküle oder Partikel in die eukaryotische Zelle. Die meisten dieser Stoffe sind polar und können die Membran nicht durch passive Diffusion oder mittels Transporter-Molekülen passieren. In der Zelle können die endozytierten Vesikel mit anderen membranumschlossenen Organellen der Zelle interagieren (Kessels und Qualmann, 2004). Es gibt verschiedene Formen der Endozytose:

Pinozytose kann als Prozess des zellulären ‚Trinkens‘ bezeichnet werden, bei der Makromoleküle und Flüssigkeiten in kleine Einstülpungen der Zellmembran aufgenommen werden (Le Roy und Wrana, 2005). Diese Einstülpungen haben einen kleineren Durchmesser als 150 nm und können abhängig von Ubiquitin in Clathrin-bedeckte Endosomen abgeschnürt werden (Polo *et al.*, 2002; Umebayashi, 2003). Der Prozess der Pinozytose wird von allen Zellen durchgeführt (Murphy, 2000).

Rezeptor-gekoppelte Endozytose ist die effiziente Internalisierung über einen Rezeptor auf der Zellmembran (Christensen *et al.*, 1998). Ein gut untersuchtes Beispiel für die Rezeptor-gekoppelte Endozytose ist die Aufnahme von Transferrin über den Transferrin-Rezeptor und anschließende Internalisierung

in Clathrin-umgebene Vesikel. Nach der Dissoziation des Rezeptors vom Liganden im frühen Endosom rezykliert der Rezeptor zurück zur Plasmamembran.

Phagozytose kann als Prozess des zellularen ‚Essens‘ bezeichnet werden. Bei diesem Prozess dehnt sich die Plasmamembran aktiv aus und umrundet den Partikel, um ein so genanntes Phagosom zu formen (Gagnon *et al.*, 2002). Die Größe der Phagosomen variiert in Abhängigkeit von der Partikelgröße in ihrem Durchmesser, der mindestens 250 nm groß ist. Phagozytose ist ein spezielles Charakteristikum einer Gruppe von Zellen, die auch als Phagozyten bezeichnet werden, wie zum Beispiel Makrophagen, die eingedrungene Erreger phagozytieren. Phagosomen fusionieren erst mit Endosomen, bevor sie mit Lysosomen fusionieren (Jahraus *et al.*, 1998, 2001; Peyron *et al.*, 2001).

Autophagozytose ist ein dynamischer Prozess, der bei Mangel von Nährstoffen, also dem Prozess des Hungerns, stimuliert wird. Dabei wird ein Teil des Zytoplasmas von Doppelmembranen umschlossen und ein Autophagosom gebildet. Autophagozytose wird in vier Schritte unterteilt: die Induktion, die Formierung, die Fusion mit dem Endosom/Lysosom und anschließend die Auflösung des Autophagosoms (Lawrence and Brown, 1992; Yamamoto *et al.*, 1998; Klionsky und Emr, 2000). Es wurden mehrere Proteine entdeckt, die essentiell für die Formierung der Autophagosomen sind (Seamon and Luzio, 2001; Noda *et al.*, 2002). Die genaue Herkunft der autophagosomalen Membranen ist jedoch noch umstritten.

1.2 Lysosomen

Lysosomen sind dynamische Organellen eukaryotischer Zellen, die von einfachen Membranen umgeben sind. Sie weisen in ihrem Lumen einen niedrigen pH-Wert von 5 auf und haben einen Durchmesser von etwa 0.5 μm (Luzio *et al.*, 2003). Sie werden von Endosomen dadurch unterschieden, dass sie keine Mannose-6-Phosphat Rezeptoren und rezyklisierende Plasmamembran-Rezeptoren enthalten

(Kornfeld und Mellmann, 1989; Luzio *et al.*, 2000; Mullins und Bonifacino, 2001). Lysosomen wirken im Elektronenmikroskop elektronendicht, enthalten interne Vesikel und manchmal Membranwirbel (Holtzmann, 1989). Sie nehmen 0.5-5 % des Zellvolumens ein und ordnen sich nah der Mikrotubuli-Zentren an (Metteoni und Kreis, 1987). Lysosomen fusionieren stetig mit anderen Lysosomen (Ward *et al.*, 1997). Bei diesem Prozess sind wahrscheinlich lysosomale Membranproteine beteiligt (Fukuda, 1991).

Lysosomen sind für die kontrollierte terminale Degradierung von endogenen und exogenen Makromolekülen zuständig (de Duve, 1983; Hunziker und Geuze, 1996). Verschiedene Wege des intrazellulären Transports führen zu dieser terminalen Degradierung. Extrazelluläre Makromoleküle gelangen durch Pinozytose, Phagozytose oder Rezeptor-vermittelte Endozytose in Clathrin-umgebene Vesikel und über frühe und späte Endosomen in die Lysosomen (Mellmann, 1996; Mukherjee *et al.*, 1997; Luzio *et al.*, 2003). Intrazelluläres Material dagegen wird über den Biosyntheseweg von Proteinen und durch Autophagozytose in die Lysosomen transportiert (Hunziker und Geuze, 1996). Die monomeren Abbauprodukte, wie z.B. Aminosäuren und Kohlenhydrate, verlassen die Lysosomen durch spezifische Transportkanäle.

Lysosomen sind mit einer Reihe von sauren Hydrolasen ausgestattet, die den Abbau der Makromoleküle katalysieren. Die Azidifizierung der Lysosomen auf einen pH-Wert von 5 wird durch membranständige (H^+)-ATPasen vom V-Typ bewerkstelligt. Bei diesem pH-Wert erreichen die lysosomalen Hydrolasen ihr Aktivitätsoptimum. Diese hydrolytischen Enzyme sind Proteasen, Lipasen, Glykosidasen, Phosphatasen und Sulfatasen (Kornfeld und Mellmann, 1989), die für den Abbau von intra- und extrazellulären Molekülen, wie Polysacchariden, Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden, verantwortlich sind.

Der Transport von löslichen lysosomalen Enzymen wie den Hydrolasen ist abhängig von der spezifischen Erkennung durch Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (M6PR) (von Figura und Hasilik, 1986). Die lysosomalen Enzyme werden mittels einer Signalsequenz, welche vom restlichen Peptid gespalten wird, in das Lumen des rauen endoplasmatischen Retikulums (rER) synthetisiert. Dort erfolgt die Glykosylierung von bestimmten Asparaginresten mit Oligosacchariden. Die Anheftung eines M6P-Restes oder mehrerer M6P-Reste an das Oligosaccharid erfolgt im *cis*-Golgi-Netzwerk, beziehungsweise kurz nach dem Export des

lysosomalen Vorläuferproteins aus dem rER (Kornfeld und Mellmann, 1989). Im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) erfolgt die Bindung des Mannose-6-phosphorylierten Vorläuferproteins an die M6P-Rezeptoren MPR46 (46 kD), der Kationen-abhängig ist und MPR300 (300 kD), der Kationen-unabhängig ist (Hoflack und Kornfeld, 1985; Luzio *et al.*, 2003). Diese Bindung induziert die Abschnürung von Clathrin-bedeckten Vesikeln vom TGN mit den MPR-Protein-Komplexen, die mit den Endosomen verschmelzen (Lemansky *et al.*, 1987). Dort erfolgt aufgrund des niedrigen pH-Wertes die Dissoziierung der Enzyme von den MPRs mit anschließender Rezyklisierung der MPRs zum TGN oder zur Plasmamembran (Brown *et al.*, 1986, von Figura *et al.*, 1987). Die lysosomalen Vorläuferproteine werden zu den Lysosomen weitertransportiert, wo sie durch partielle Proteolyse zu reifen Proteinen prozessiert werden.

Die Bedeutung der lysosomalen Hydrolasen für die Zelle und den Organismus wird durch den Ausfall oder eine Fehlfunktion eines oder mehrerer lysosomaler Enzyme verdeutlicht. Dies kann zu einer Akkumulation nicht mehr abbaubaren Materials führen, weshalb in diesem Zusammenhang von lysosomalen Speicherkrankheiten gesprochen wird (Meikle *et al.*, 2004).

Lysosomale Membranproteine können auf direktem und indirektem Weg zu den Lysosomen transportiert werden. Der direkte Weg führt vom *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) über die Endosomen zu den Lysosomen. Beim indirekten, sekretorischen Transport gelangen die Proteine auf einem Umweg über die Plasmamembran zu den Lysosomen. Vom TGN werden die Proteine zunächst zur Plasmamembran transportiert und gelangen erst nach ihrer Endozytose in die Endosomen und schließlich zu den Lysosomen. Die Präsenz lysosomaler Proteine an der Plasmamembran wurde in mehreren Organismen dokumentiert (Lippincott-Schwartz und Fambrough, 1987; Furuno *et al.*, 1989a und b; Mane *et al.*, 1989; Mathews *et al.*, 1992; Tanaka *et al.*, 1990).

1.3 Endosomen und Multivesicular Bodies (MVB)

Bei den Endosomen unterscheidet man frühe und späte Endosomen, wobei darüber diskutiert wird, ob frühe und späte Endosomen verschiedene Stadien derselben Struktur darstellen oder aus unterschiedlichen Strukturen bestehen. In neuesten

Forschungsarbeiten häufen sich Beweise, dass sich verschiedene Endosomen grundlegend in ihrer Protein- und Lipidzusammensetzung unterscheiden und an unterschiedlichen Stadien des Degradierungswegs beteiligt sein können. Frühe und späte Endosomen fusionieren ständig mit der gleichen Art von Endosomen (Antonin *et al.*, 2000).

Endozytierte Rezyklisierungs-Rezeptoren und Rezeptoren, deren Oberflächen-Expression herunterreguliert werden soll, werden gemeinsam von der Plasmamembran zu frühen Endosomen geliefert, in denen sie schnell voneinander getrennt werden (Dunn *et al.*, 1989). Die Rezyklisierungs-Rezeptoren werden in *Recycling Endosomen* zurück zur Zellmembran gebracht (Yamashiro *et al.*, 1984). Die zelluläre Verteilung dieser Endosomen wird über einen heterotetrameren Komplex aus Annexin-2, einem Calcium- und Lipid-bindenden Protein, und dem S100 Protein S100A10 kontrolliert (Zobiack *et al.*, 2003). Die Rezeptoren, deren Expression herunterreguliert werden soll, werden - mitunter durch eine Modifikation mittels Ubiquitinierung - in multivesikuläre Endosomen oder Körper (MVBs) sortiert (Felder *et al.*, 1990; Katzmann *et al.*, 2002).

MVBs sind multivesikuläre Körper, die ein Transport-Intermediat zwischen frühen und späten Endosomen darstellen (Gruenberg und Stenmark, 2004). Dieses Intermediat wird auch als endosomaler Transporter Vesikel (ECV – *endosomal carrier vesicle*) bezeichnet. MVBs werden direkt aus frühen Endosomen-Membranen geformt und stülpen selektiv Membranen ein, die Rezeptoren enthalten, die für späte Endosomen und Lysosomen bestimmt sind (Gruenberg und Maxfield, 1995; Mukherjee und Maxfield, 2000). Zusätzlich enthalten die MVBs Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PtdIns3P), welches die Rezeptor-gekoppelte Sortierung in MVBs reguliert (Gaulhier *et al.*, 1998; Petiot *et al.*, 2003). Nach Ablösung von frühen Endosomen wandern die MVBs, die einen Durchmesser von etwa 400-500 nm haben und kugelförmig sind, entlang der Mikrotubuli zu den späten Endosomen, mit denen sie fusionieren (Parton *et al.*, 1992; Aniento *et al.*, 1993; Bomsel *et al.*, 1990). Späte Endosomen sind im Gegensatz zu MVBs hoch pleiomorph. Sie sind mit Zisternen-, Tubuli- und multivesikulären Regionen ausgestattet und weisen eine andere Protein- und Lipidzusammensetzung auf (Bright *et al.*, 1997).

Späte Endosomen enthalten im „*steady-state*“-Zustand große Mengen an lysosomalen Glykoproteinen, wie z.B. Lamp-1 und Lamp-2, die ebenfalls in Lysosomen vorkommen (Griffiths *et al.*, 1988). Des Weiteren enthalten späte

Endosomen hohe Mengen an *bis-(monoacylglycero)-phosphat* (BMP, früher auch lbpa genannt) in ihren internen Membranen, das in anderen Organellen nicht vorkommt (Kobayashi *et al.*, 1998; Matsuo *et al.*, 2004).

Späte Endosomen fungieren als eine wichtige Sortierungsstation im Endozytose-Weg. Der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (M6PR) z. B. rezykliert zwischen den späten Endosomen und dem TGN (Goda *et al.*, 1988; Kobayashi *et al.*, 1998). Andere Proteine, die nicht für die Degradierung in den Lysosomen bestimmt sind, akkumulieren in den internen Membranen der Endosomen, wie z.B. die mit vier Transmembrandomänen ausgestatteten Tetraspanine, zu denen auch Limp-1 gehört (Escola *et al.*, 1998). Für den Sortierungsvorgang benötigen die späten Endosomen ihr komplexes System aus internen Membranen. Ein wichtiger Beweis für die Notwendigkeit der internen Membranen bei dieser Sortierung wurde durch die Blockierung des spezifischen BMP mittels Antikörpern gezeigt. Durch Blockierung des Lipids ist der Proteintransport aus den späten Endosomen betroffen. MPR akkumuliert z.B. in den späten Endosomen, ebenso wie unverestertes Cholesterol, was der Fall bei vielen Niemann-Pick Typ C Patienten ist (Kobayashi *et al.*, 1998; Gruenberg, 2001).

1.4 Hybridorganell (Hybrid zwischen späten Endosomen und Lysosomen)

Die in den internen endosomalen Membranen verankerten Proteine scheinen für die Degradierung in Lysosomen bestimmt zu sein (Gruenberg und Stenmark, 2004). Späte Endosomen können mit Lysosomen fusionieren, wobei sie ein Hybridorganell bilden, welches Charakteristika von beiden Organellen enthält (Gruenberg und Stenmark, 2004). In diesem Hybridorganell findet ein Austausch der endozytierten Makromoleküle von späten Endosomen zu Lysosomen statt. Das Lysosom stellt dabei das eigentliche Organell mit sauren Hydrolasen dar, das mit späten Endosomen fusioniert, um eine Art Verdauungsorganell oder ‚Zellmagen‘ zu erzeugen (Griffiths, 1996). Das Hybridorganell wird als Hauptort der Hydrolyse von endozytierten Makromolekülen beschrieben. Für die erneute Entstehung der Lysosomen aus dem Hybridorganell wird Calcium, das sich in dem Organell befindet, und ein niedriger pH-Wert benötigt (Luzio *et al.*, 2003).

Laut Definition sind Hybridorganellen während des Abbaus von Makromolekülen Endosomen, da sie MPRs enthalten. Bei dem Reifungsprozess des Lysosoms verliert das Hybridorganell ab einem bestimmten Punkt die MPRs und wird dann als Lysosom bezeichnet (Luzio *et al.*, 2003).

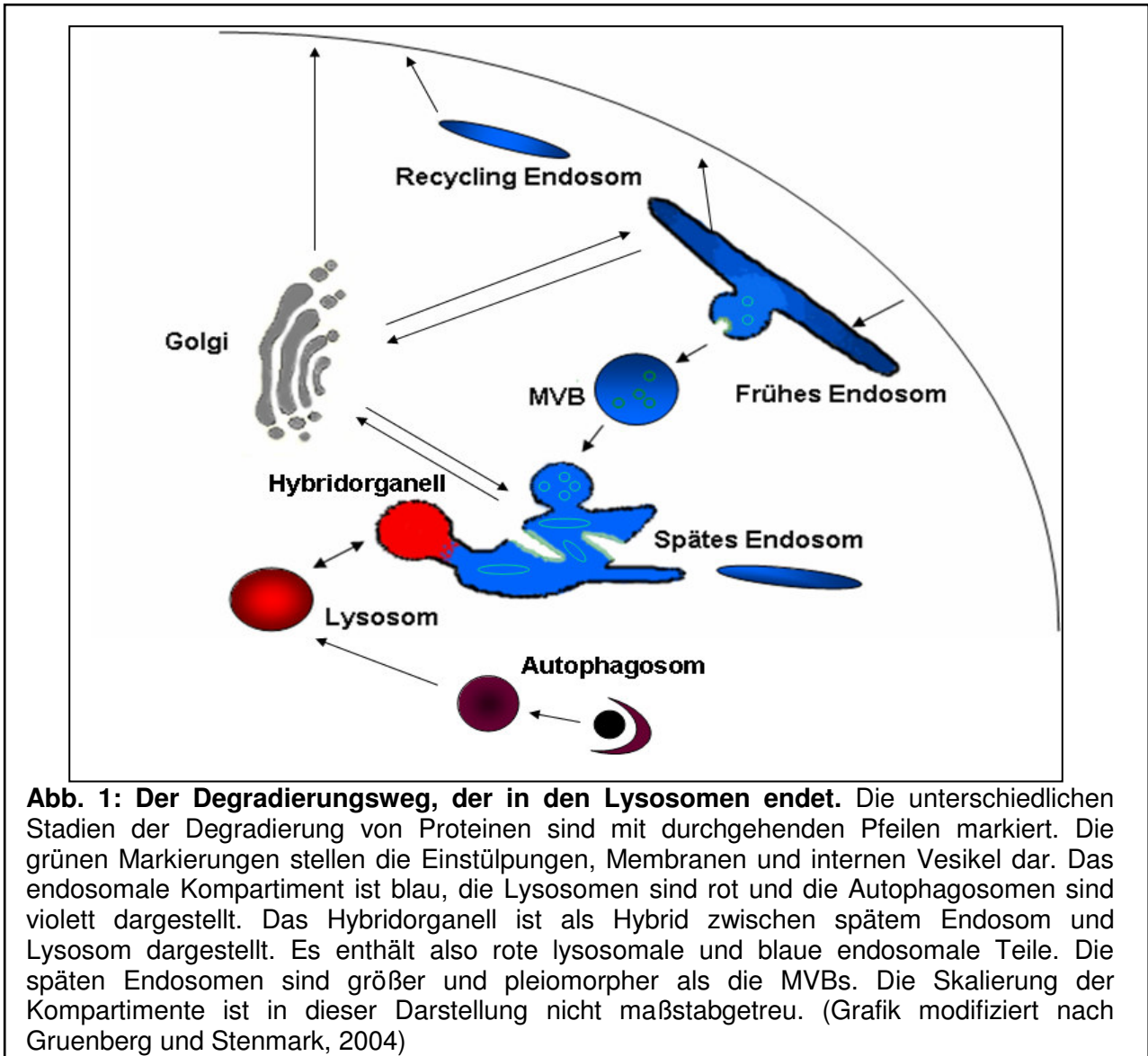


Abb. 1: Der Degradierungsweg, der in den Lysosomen endet. Die unterschiedlichen Stadien der Degradierung von Proteinen sind mit durchgehenden Pfeilen markiert. Die grünen Markierungen stellen die Einstülpungen, Membranen und internen Vesikel dar. Das endosomale Kompartiment ist blau, die Lysosomen sind rot und die Autophagosomen sind violett dargestellt. Das Hybridorganell ist als Hybrid zwischen spätem Endosom und Lysosom dargestellt. Es enthält also rote lysosomale und blaue endosomale Teile. Die späten Endosomen sind größer und pleiomorpher als die MVBs. Die Skalierung der Kompartimente ist in dieser Darstellung nicht maßstabgetreu. (Grafik modifiziert nach Gruenberg und Stenmark, 2004)

1.5 Bedeutung des AP-1, AP-2, AP-3, AP-4 Komplexes und GGAs für den intrazellulären Transport

Der AP-1, AP-3 und AP-4 Komplex sind wie der AP-2 Komplex cytosolische Sortierungsfaktoren, die mit spezifischen Sortierungssignalen in den cytosolischen Domänen von Membranproteinen interagieren und für die Umsetzung der Sortierungsinformation dieser Motive notwendig sind. Es sind heterotetramere

Proteine, die im sekretorischen und Endozytose-Weg benötigt werden (Robinson und Bonifacino, 2001).

Der AP-1 Komplex spielt eine wichtige Rolle für die Sortierung der Mannose 6-phosphat Rezeptoren (MPR) am TGN. Nach der Dissoziation des Liganden vom MPR im Endosom wird AP-1 benötigt, um die unbeladenen MPRs vom Endosom zurück zum TGN transportieren zu können (Meyer *et al.*, 2001). Am TGN erfolgt die Sortierung in Clathrin-bedeckte Vesikel über eine Interaktion des MPR-Schwanzes mit dem AP-1 Komplex.

Der AP-2 Komplex ist für die Sortierung in Clathrin-umgebene Vesikel an der Plasmamembran während der Endozytose zuständig. Dabei interagiert der Komplex mit den Tyrosin-Sortierungssignalen im zytoplasmatischen Teil der Proteine, die über Clathrin-Vesikel geliefert werden (Kirchhausen *et al.*, 1997; Höning *et al.*, 1998). Das Tyrosin-Motiv der Lamps z.B. interagiert mit dem AP-2 Komplex, der in Clathrin-bedeckten Vesikeln an der Plasmamembran lokalisiert ist (Bonifacino und Dell'Angelica, 1999).

Der AP-3 Komplex kolokalisiert nur mit Clathrin-bedeckten Vesikeln, die von Endosomen abstammen (Peden *et al.*, 2004). Seine Funktion ist *in vivo* nicht abhängig von Clathrin (Wetley *et al.*, 2002). Er hat einen wesentlichen Einfluss auf den Protein-Transport in Lysosomen. Eine direkte Interaktion von AP-3 mit dem Dileucin-Sortierungs-Motiv am TGN, wie das der Fall bei Limp-2 ist (Höning *et al.*, 1998), ist für den Transport in Lysosomen verantwortlich.

Der AP-4 Komplex kolokalisiert nicht mit Clathrin-bedeckten Vesikeln (Hirst *et al.*, 1999). AP-4 ist am TGN, den späten Endosomen und den Lysosomen lokalisiert und interagiert unter anderem mit dem Tyrosin-Signal des humanen Lamp-2 im *Yeast two-hybrid* System (Aguilar *et al.*, 2001) und MPR46 in MDCK-Zellen (Simmen *et al.*, 2002).

GGAs (*Golgi-localized, γ -ear-containing, ADP ribosylation factor-binding Proteins*) sind monomere Proteine, die nur entfernt mit den APs verwandt sind (Dell'Angelica und Payne, 2001; Puertollano *et al.*, 2001). Nach neuesten Ergebnissen sind die GGAs die wichtigsten Clathrin-Adaptoren, die für den Transport von MPRs (Storch *et al.*, 2004) und Hydrolasen vom TGN zu den Endosomen verantwortlich sind. Weiterhin interagieren die GGAs aber auch mit dem AP-1 Komplex, was durch eine Kolokalisation dieser beiden Proteine in Clathrin-umgebenen Vesikeln am TGN nachgewiesen wurde (Dell'Angelica und Payne, 2001). Als Funktion der GGAs wird

diskutiert, ob die Sortierung der MPRs in AP-1 positive Clathrin-bedeckte Vesikel den Transport vom TGN zu den Endosomen vermittelt (Doray *et al.*, 2002).

1.6 Die lysosomale Membran und ihre Proteine

Eines der wichtigsten Aufgaben der lysosomalen Membran ist die Trennung der luminalen sauren Hydrolasen von anderen Zellbestandteilen, um eine ungewünschte Degradierung von Proteinen zu verhindern (Eskelinen *et al.*, 2003). Die Membran der Lysosomen besteht aus Membranproteinen, Cholesterol und einer charakteristischen Zusammensetzung von Phospholipiden (Bleistein *et al.*, 1980). Sie ist sehr reich an Kohlenhydraten (Lloyd and Forster, 1986), die eine kontinuierliche Glykokalyx an der Innenseite der Membran ausbilden (Neiss, 1984). Über die Membran findet das Ausschleusen der Abbauprodukte in das Zytoplasma statt. So wurden Transporter für Aminosäuren (Schneider *et al.*, 1984), Fettsäuren (Rome *et al.*, 1983), Kohlenhydrate (Renlund *et al.*, 1986), Cholesterin (Mc Gookey *et al.*, 1983) und Nucleoside (Adra *et al.*, 1996) beschrieben.

Die integralen Membranproteine der Lysosomen sind Limps und Lamps, die im luminalen Bereich hochglykosyliert und resistent gegenüber Hydrolasen sind. Diese Membranproteine stellen mehr als 50% der lysosomalen Membran dar (Marsh *et al.*, 1987; Andrejewski *et al.*, 1999).

Lamp-1 (*lysosomal associated membrane protein 1*), auch LGP107 und LGP120 (*lysosomal Glycoprotein 107 und 120 kD* in Ratte) ist ein Typ I-Transmembranprotein, dessen luminaler Abschnitt 6 O-Glykane und 17-20 potentielle N-Glykosylierungsstellen birgt (Abb. 2), die zum großen Teil Zucker des komplexen poly-N-acetyllactosamin-Typs tragen. Die N-Glykane nehmen etwa 55% der Proteinmasse ein. Lamp-1 hat eine molekulare Masse von 90-120 kD.

Die normalen Funktionen von Lamp-1 können durch das in seiner Struktur ähnliche Lamp-2 ersetzt werden (Eskelinen *et al.*, 2003). Dadurch sind Lamp-1 defiziente Mäuse unauffällig, bis auf die Entwicklung einer leichten Astroglie und geringe Unterschiede der Cathepsin D-Immunoreaktivität im Gehirn (Andrejewski, *et al.*, 1999). Auch bei Experimenten bezüglich lysosomaler Stabilität, pH-Wert und Aktivität

von Hydrolasen mit Lamp-1-defizienten Fibroblasten wurden keinerlei Unterschiede zu den Kontrollen festgestellt.

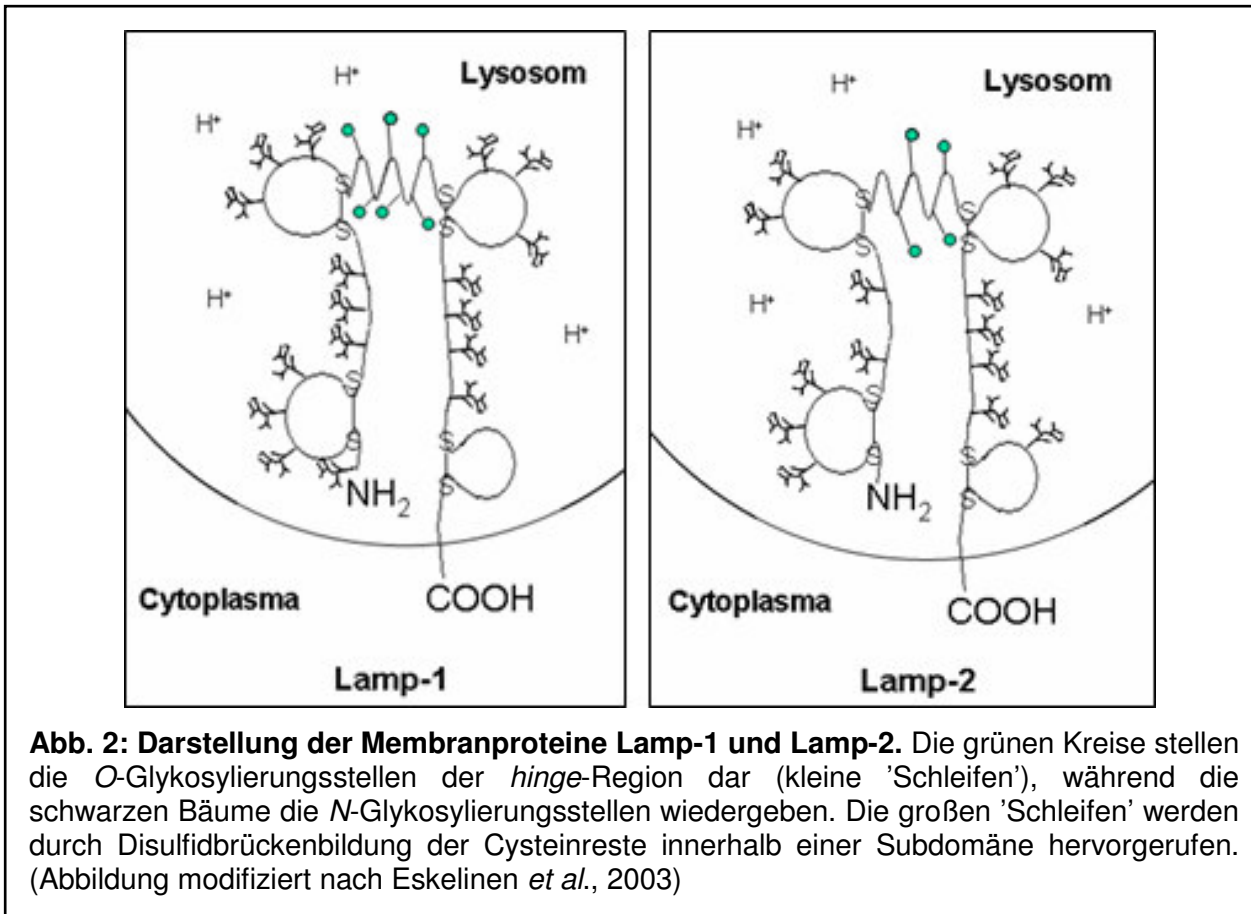
Lamp-2 (*lysosomal associated membrane protein 2*), auch LGP96 und LGP110 (*lysosomal Glycoprotein 96 und 110 kD* in Ratte) ist ebenfalls ein Typ I-Transmembranprotein mit einer molekularen Masse von 95-120 kD und mehreren potentiellen Glykosylierungsstellen (Abb. 2). Lamp-1 und Lamp-2 sind zu 37% in ihrer Aminosäuresequenz homolog (Fukuda, 1991).

Das Lamp-2-Protein existiert in drei Isoformen, die durch unterschiedliches Spleißen der Boten-RNA zustande kommen (Cuervo und Dice, 2000). Lamp-2a, -2b und -2c unterscheiden sich in ihren Transmembrandomänen und cytosolischen Domänen und der subzellularen Lokalisation (Gough und Fambrough, 1997).

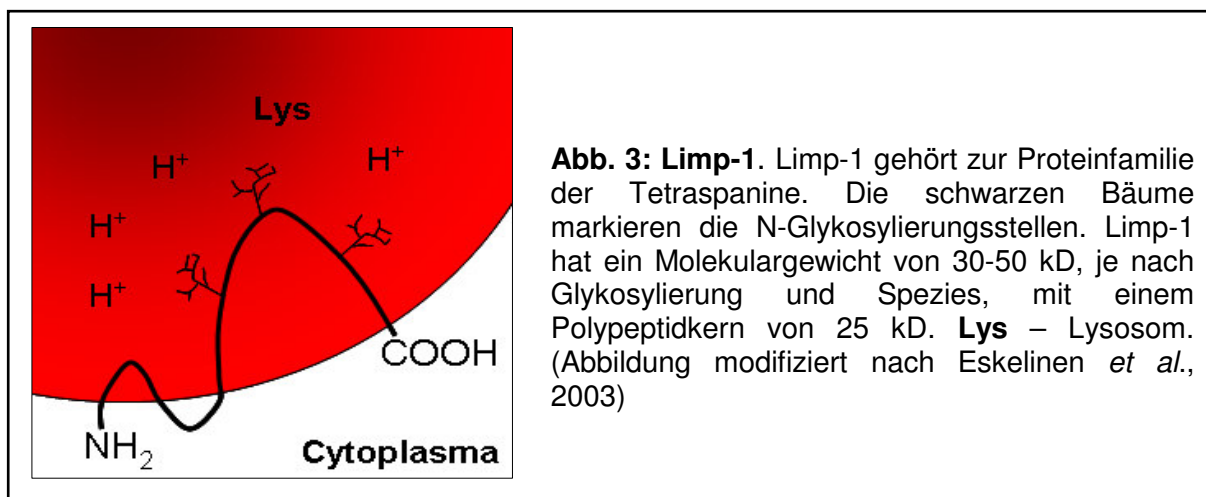
Der Phänotyp der Lamp-2-defizienten Maus geht einher mit hoher Mortalität und massiver Akkumulation von Autophagosomen in verschiedenen Geweben, wie Leber, Muskeln und Herz, was zu einer Reduzierung der Kontraktion des Herzmuskels führt (Tanaka *et al.*, 2000). Da es nicht in allen Geweben zu dieser Akkumulation kommt, wird angenommen, dass Lamp-1 die Defizienz von Lamp-2 dort ausgleichen kann (Eskelinen *et al.*, 2003). Lamp-2 Mutationen, die zu einer Lamp-2 Defizienz führen, sind die primäre Ursache für die Danon Krankheit, einer lysosomalen Speicherkrankheit mit Herzmuskelschwäche, Muskelschwäche und geistiger Verzögerung (Nishino *et al.*, 2000; Danon *et al.*, 1981; Saftig *et al.*, 2001; Eskelinen *et al.*, 2002).

Lamps sind außer in der lysosomalen Membran und der späten endosomalen Membran auch im Lumen dieser Vesikel und in kleinen Mengen in frühen Endosomen, der Plasmamembran und in den äußeren Membranen der späten Autophagosomen zu finden. Die Sortierung der Lamps in Lysosomen erfolgt auf dem direkten Weg über ein Tyrosin-Motiv mit dem AP-3 Komplex (Carlsson und Fukuda, 1992; Akasaki *et al.*, 1995; Rous *et al.*, 2002; Le Borgne *et al.*, 1998; Obermüller *et al.*, 2002).

Die Doppeldefizienz von Lamp-1 und Lamp-2 in Mäusen führt zu embryonaler Letalität und der Akkumulation von Autophagosomen und Cholesterol in allen embryonalen Geweben (Eskelinen *et al.*, 2004).

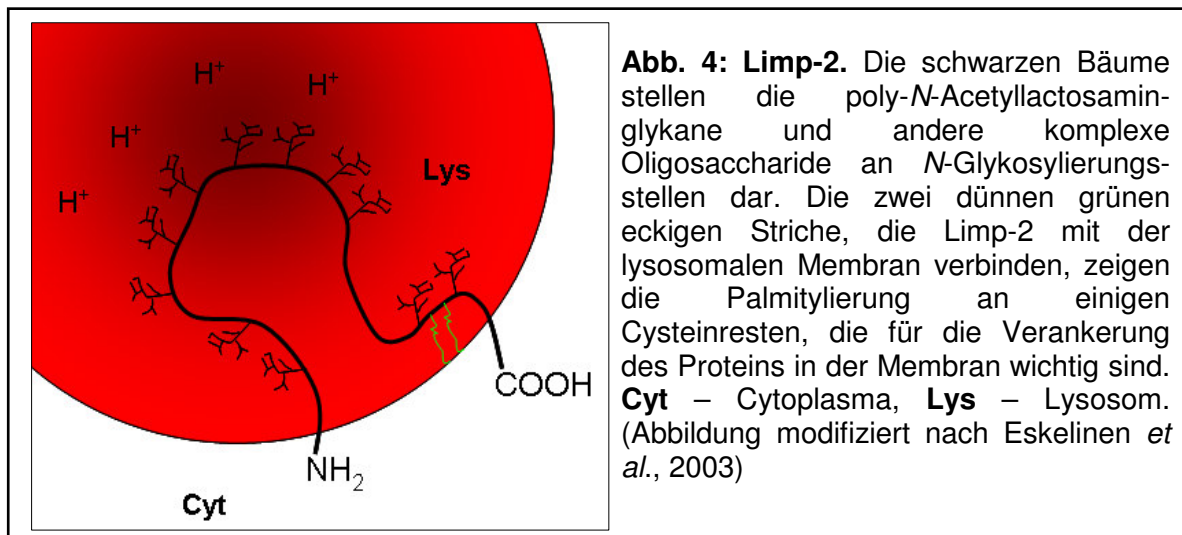


Limp-1 (*lysosomal integrated membrane protein 1*), auch CD63 und Lamp-3 genannt, gehört zur Familie der Tetraspanine. Es durchspannt die äußere lysosomale Membran viermal (Abb. 3; Metzelaar *et al.*, 1991). Limp1 hat ein Molekulargewicht von 30-50 kD mit einem 25 kD schweren Polypeptidkern. Es besteht aus 238 Aminosäuren und hat drei N-Glykosylierungsstellen, die hauptsächlich Zucker des poly-N-acetyl-lactosamin-Typs tragen. Die Glykosylierung nimmt etwa 35% der molekularen Masse des Proteins ein.



Limp1 ist im Gegensatz zu den anderen lysosomalen Membranproteinen größtenteils in den internen Membranen von Lysosomen und Endosomen lokalisiert (Escola *et al.*, 1998). Die Sortierung von Limp1 in Lysosomen erfolgt über ein Tyrosin-Motiv im 11 Aminosäuren langen zytoplasmatischen Teil (Peters und von Figura, 1994; Hunziker *et al.*, 1996; Le Borgne *et al.*, 1998) und ist abhängig vom AP-3 Adaptor Komplex (Rous *et al.*, 2002).

Limp-2 (*lysosomal integrated membrane protein*), auch LGP85 (*lysosomal Glycoprotein 85 kD*) genannt, besitzt einen 54 kD schweren Polypeptidkern, der aus 478 Aminosäuren besteht. Je nach *N*-Glykosylierung und Spezies ist das Protein 74-85 kD schwer. Limp-2 ist ein Typ III- Transmembranprotein, das die lysosomale Membran zweimal durchspannt (Abb. 4).



Die N-terminale Transmembrandomäne stellt das ungeschnittene Signalpeptid dar. Der große luminalen Bereich von LIMP-2 hat elf Glykosylierungsstellen, die zumeist sialysierte Zuckerketten des komplexen Typs tragen. Der kurze zytoplasmatische C-Terminus erstreckt sich über 20 bis 21 Aminosäuren (Ogata und Fukuda, 1994, Sandoval *et al.*, 1994), während der zytoplasmatische N-Terminus nur aus zwei bis vier Aminosäuren besteht. *In vivo* ist LIMP-2 palmitoyliert. Die Palmitoylierung erfolgt posttranslational an Cysteinresten, im humanen Homolog CD36 an vier Cysteinen, und spielt eine wichtige Rolle bei der Verankerung des Proteins in der Membran (Vega *et al.*, 1991; Tao *et al.*, 1996). LIMP-2 besitzt einen geschätzten Anteil von etwa 4% am Gesamtproteingehalt der lysosomalen Membran (Akasaki *et al.*, 1992)

und ist außer in der lysosomalen Membran auch in späten Endosomen und in kleinen Mengen auch in frühen Endosomen und in der Plasmamembran lokalisiert. Der zytoplasmatische Carboxy-Terminus enthält ein Leucin-Isoleucin (Dileucin-) Motiv (Ogata und Fukuda, 1994), das für den lysosomalen Transport essentiell ist. Die Sortierung von Limp-2 erfolgt durch den zytoplasmatischen Adaptorkomplex AP-3, der an die Sequenz DEXXXLI (Dileucin) in der zytoplasmatischen Domäne bindet (Vega *et al.*, 1991 b; Höning *et al.*, 1998). Limp-2 gehört zur CD36 Super-Familie (Vega *et al.*, 1991 a; Crombie und Silverstein, 1998), zu der auch die *class B scavenger receptor family* gehört (Febbraio *et al.*, 2001). Andere Mitglieder dieser Familien sind unter anderem Zell-Adhäsions-Rezeptoren, wie CD36 und CD8 (Vega *et al.*, 1991) und Lipid-Rezeptoren, wie der Scavenger Rezeptor B1 (Acton *et al.*, 1994; Rigotti *et al.*, 2003) und CLA-1 (Calvo und Vega, 1993; Pussinen *et al.*, 2000) an der Zelloberfläche. Alle Mitglieder dieser Familie durchspannen die Membran am N- und am C-Terminus (Karakesisoglou *et al.*, 1999). Die Oberflächenrezeptoren der CD36-Familie binden sehr unterschiedliche Liganden, z.B. extrazelluläre Matrixproteine (Asch *et al.*, 1993), Lipoproteine (Endemann *et al.*, 1993), langkettige Fettsäuren (Baillie *et al.*, 1996), anionische Phospholipide (Ryeom *et al.*, 1996), außerdem apoptotische Zellen (Ren *et al.*, 1995) und Collagen Typ 1 und 4 (Febbraio *et al.*, 2001). Ein gemeinsamer Ligand von CD36 und eventuell auch Limp-2 ist Thrombospondin-1 (Crombie und Silverstein, 1998). Limp-2 spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei der Erhaltung des Gleichgewichts zwischen der Vesikelaufnahme und der –abschnürung von endosomalen Membranen und somit auch bei der Biogenese und Erhaltung von Endosomen und Lysosomen (Kuronita *et al.*, 2002). Die Überexpression von Limp-2 in COS7, HeLa oder MDCK-Zellen führt zu einer Akkumulation von großen geschwollenen Vesikeln, die Charakteristika von Endosomen und Lysosomen aufweisen. Diese Vesikel speichern ebenfalls Cholesterin. Durch den Nachweis unterschiedlicher Organell-spezifischer Marker in den großen Vesikeln wurde darauf geschlossen, dass manche der Limp-2 Vesikel mit frühen und andere mit späten Endosomen korrespondieren. Die Herkunft dieser großen Vesikel basiert nicht auf Lysosomen, was mittels der Endocytose von Dextran nachgewiesen wurde. Das internalisierte Dextran konnte nur in Lysosomen, nicht aber in den großen Vesikeln nachgewiesen werden. Für die Formierung der großen Vesikel ist vermutlich die GTP-gebundene aktive Form von Rab5b nötig (Kuronita *et al.*, 2002).

1.7 Das Limp-2 Gen

Das humane Gen, das für Limp-2 codiert, wird als *CD36L2*, *hLimpII* oder *SCARB2* bezeichnet und liegt auf Chromosom 4 in der Region 4q21.1 (Gamp *et al.*, 2003). Die menschliche cDNA wurde erstmals 1992 von Fujita *et al.* isoliert, das Homolog aus der Ratte wurde bereits 1991 von Fujita *et al.* kloniert. Die beiden Limp-2 aus Mensch und Ratte sind auf Nukleotidebene zu 79% und auf Aminosäureebene zu 86% identisch (Fujita *et al.*, 1992). Das humane Limp-2-Gen besitzt eine Länge von 2329 bp, die für 478 Aminosäuren codieren. Das Protein hat dadurch ein berechnetes Molekulargewicht von 54.3 kD. Die murine cDNA von Limp-2 wurde erst 1997 von Tabuchi *et al.* isoliert und hat eine Länge von 1853 bp. Wie bei dem humanen Gen codiert das Murine für 478 Aminosäuren und hat ein berechnetes Molekulargewicht von 54.1 kD. Die beiden Limp-2 aus Mensch und Maus haben eine Sequenzidentität von 84% auf Nukleotidebene und von 86% auf Aminosäureebene.

Das humane Gen für Limp-2 umfasst 52.7 kb und wird von 12 Exons codiert. Die Exons 11 und 12 codieren die zytoplasmatische Domäne, wobei sich das Dileucin-Motiv in Exon 12 befindet. Der Translationsstart liegt in Exon 1 (NCBI Genome).

Das Vorkommen der Boten-RNA von Limp-2 wurde bisher in verschiedenen Geweben, wie z.B. Auge, Haut, Lunge und PNS nachgewiesen (NCBI-Pubmed).

In der Ratte wird das Limp-2 Gen in zwei alternativ gespleißten Formen von 2.2 und 4.2 kb exprimiert. Die höchste RNA-Konzentration liegt dort in der Leber, die niedrigste in der Lunge vor (Tabuchi *et al.*, 2000).

Abbildung 5 zeigt die Region um den Genlocus von Limp-2 mit bekannten menschlichen Krankheitsbildern. Darunter befinden sich die Gene für Mucopolidose II und III A, beides lysosomale Speichererkrankungen, die durch den Ausfall der N-Acetylglucosamin-1-Phosphotransferase verantwortlich sind (Varki *et al.*, 1982). Ebenfalls befindet sich auf Chromosom 4 (in der Abbildung nicht mehr sichtbar) beim Genlocus 4p das Gen *WFS1*, das für das Krankheitsbild Wolfram-Syndrom (DIDMOAD) verantwortlich ist (Simsek *et al.*, 2003). Hierbei handelt es sich um eine Krankheit, die mit Diabetes, Taubheit und Optikusatrophie einhergeht. Des Weiteren können periphere Neuropathien und Nieren- und Blasenfehlfunktionen folgen (Smith *et al.*, 2004). Ein anderes Krankheitsbild mit dem Genlocus in der Region von Limp-2 ist die renale tubuläre Azidose Typ II (proximale Form), bei der unter anderem

Nierensteine, Nephrokalzinose und Kalziummangel entstehen, die zur Niereninsuffizienz führen können (Pschyrembel, 2002).

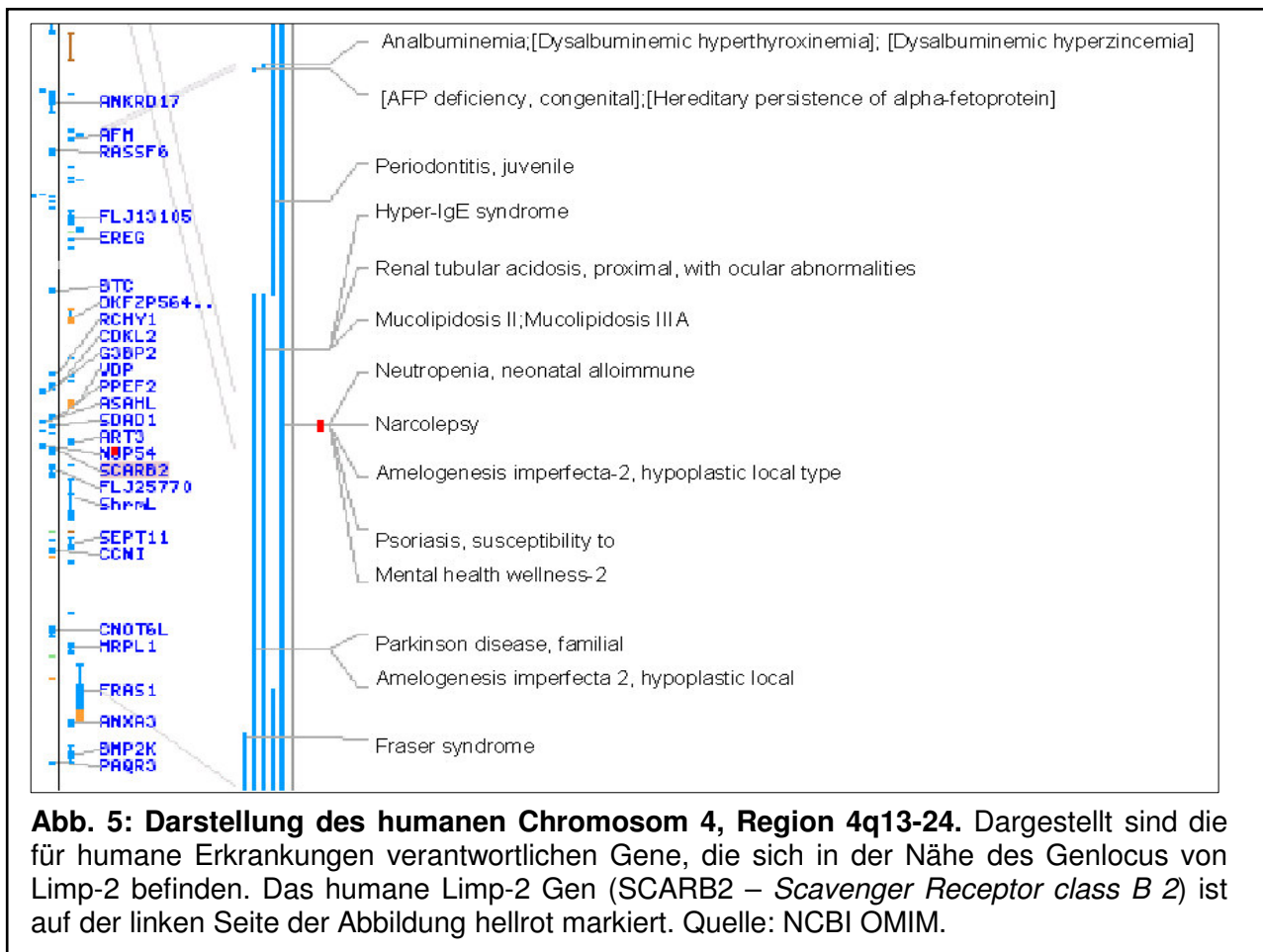


Abb. 5: Darstellung des humanen Chromosom 4, Region 4q13-24. Dargestellt sind die für humane Erkrankungen verantwortlichen Gene, die sich in der Nähe des Genlocus von Limp-2 befinden. Das humane Limp-2 Gen (SCARB2 – *Scavenger Receptor class B 2*) ist auf der linken Seite der Abbildung hellrot markiert. Quelle: NCBI OMIM.

1.8 Die Limp-2 Knock-out-Maus

Limp-2 defiziente Mäuse sind lebensfähig und fruchtbar. Es gibt keine deutlichen Unterschiede in Wachstum und Gewicht zu gleichaltrigen Kontrolltieren. Der Phänotyp zeichnet sich durch drei unterschiedliche Merkmale aus:

- Entwicklung einer Ureterstenose mit folgender uni- und bilateraler Hydronephrose
- Degeneration der Stria vascularis mit resultierender Taubheit im fortgeschrittenen Alter
- Entwicklung einer peripheren Neuropathie (Gamp *et al.*, 2003).

1.8.1 Entwicklung von Hydronephrosen in Limp-2 defizienten Mäusen

Das Urothel kleidet den gesamten Ureter und die Blase aus. Im ungedehnten Zustand ist es bis zu 7 Zellschichten hoch und enthält eine charakteristische Schicht oberflächlicher Zellen, die Deckzellen, die wie ein Schirm die nächsttieferen Zellschichten überdecken. Die Deckzellen wiederum werden von einer Sialinsäurehaltigen Mukopolysaccharidschicht bedeckt (Fritsch und Kühnel, 2003).

Der proximale Teil des Ureters am Nierenbecken weist in Limp-2 defizienten Mäusen Verdickungen in Form einer Stenose auf, die vermutlich durch eine Hyperproliferation des Urothels zustande kommt. Durch diese Verengung des Ureters bis auf einen kleinen Spalt kommt es zu einem kontinuierlichen Rückstau des Urins in die Nieren. Im Alter von 3-16 Monaten entwickeln die Limp-2 defizienten Mäuse zu 65% eine unilaterale Hydronephrose, in den anderen Fällen bilaterale Hydronephrosen (Gamp *et al.*, 2003). Diese pathologische Veränderung verursacht eine Dilatation des Nierenbeckens und der Nierenkelche (s. Abb. 6, normale Darstellung der Nierenanatomie). Die Nieren sind im Fall einer ausgeprägten Hydronephrose der Limp-2 defizienten Mäuse etwa um das 15- bis 20-fache vergrößert. Das Nierengewebe ist durch den ständigen Urinstau stark angegriffen und bildet sich zurück. Das Nierenbecken weitet sich, wird dünnwandig und ist mit klarem Urin gefüllt.

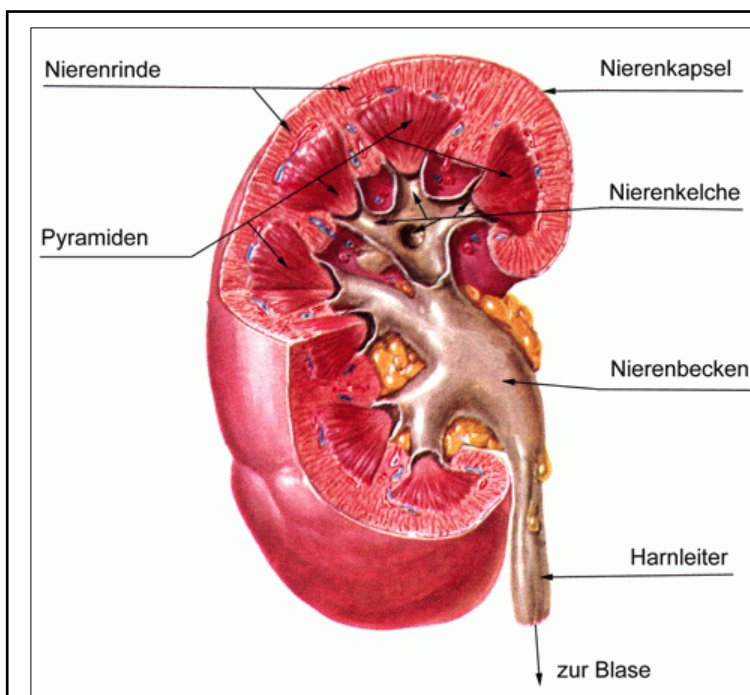


Abb. 6: Schematische Darstellung der Niere. Die Niere besteht aus harnbildenden und harnableitenden Strukturen (Fritsch und Kühnel, 2003). Ganz außen liegt die Nierenrinde, die aus einer Vielzahl von Nierenkörperchen (Nephronen) gebildet wird. Auf die Nierenrinde folgen nach innen das Mark und schließlich das Nierenbecken (Pelvis renalis), welches sich bei einer Hydronephrose stark vergrößert. Das Endprodukt der Nieren ist der Urin, der über die Ureter (Harnleiter) zur Blase transportiert wird. Quelle *medicine worldwide* (m-ww.de).

Die LIMP-2 defizienten Deckzellen werden metaplasisch, weisen Mikrovilli auf und entwickeln eine symmetrische Plasmamembran mit einer Glykokalyx. Im gesunden Zustand ist die Plasmamembran des Urothels mit konkav geformten Platten bedeckt, die durch Scharniere miteinander verbunden sind. Diese Struktur kommt durch integrale Membranproteine zustande, die Uroplakine (UPs) genannt werden und spezifisch für das Urothel sind (Sun *et al.*, 1996). In den apikalen Bereichen der veränderten Urothelzellen ist die Uroplakin-Verteilung gestört, die im gesunden Urothel über 90% der apikalen Schicht bedeckt (Hu *et al.*, 2000). Im Lumen der Deckzellen befinden sich diskoidale/fusiforme Vesikel, die Uroplakine enthalten (s. Abb. 7) und dadurch ihre starre Form erhalten. Ihre Aufgabe ist der stetige Austausch der Uroplakine an der Urotheloberfläche. Bei der LIMP-2 defizienten Maus verschwinden die meisten der diskoiden/fusiformen Vesikel und werden durch runde ersetzt, die nur noch geringe Mengen Uroplakin enthalten. Die gleichen Veränderungen des Urothels sind auch in der Blase zu finden.

Bei den Uroplakinen werden vier Formen unterschieden: die UPs Ia (27 kD), Ib (28 kD), II (15 kD) und die Gruppe UP IIIa (47 kD) und IIIb (35 kD) (Wu und Sun, 1993; Lin *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1994). Uroplakine bilden Heterodimere, die sich zu Plaques zusammenlagern und einen Durchmesser von 0.2-0.5 μm haben (Kachar *et al.*, 1999). Die Heterodimere setzen sich aus UP Ia und UP II, UP Ib und UP IIIa, UP Ib und UP IIIb zusammen (s. Abb. 7). Urotheliale Plaques bestehen aus 16 nm großen Proteinen, die sich hexagonal arrangieren und dabei zweidimensionale Kristalle bilden (Deng *et al.*, 2002). In ihrer Mitte befindet sich ein 6 nm großer Uroplakin-freier, Lipid-haltiger Bereich (s. Abb. 7; Min *et al.*, 2003).

Es wird angenommen, dass die urothelialen Plaques verantwortlich sind für

- die Festigkeit und Stabilisierung des Ureters und der Blase (Staehein *et al.*, 1972),
- die Regulierung der apikalen Oberfläche durch stetiges Austauschen der Plaques (Minsky und Chlapowski, 1978; Lewis und de Moura, 1982),
- die bemerkenswerte Undurchlässigkeit des Urothels (Chang *et al.*, 1994; Negrete *et al.*, 1996).

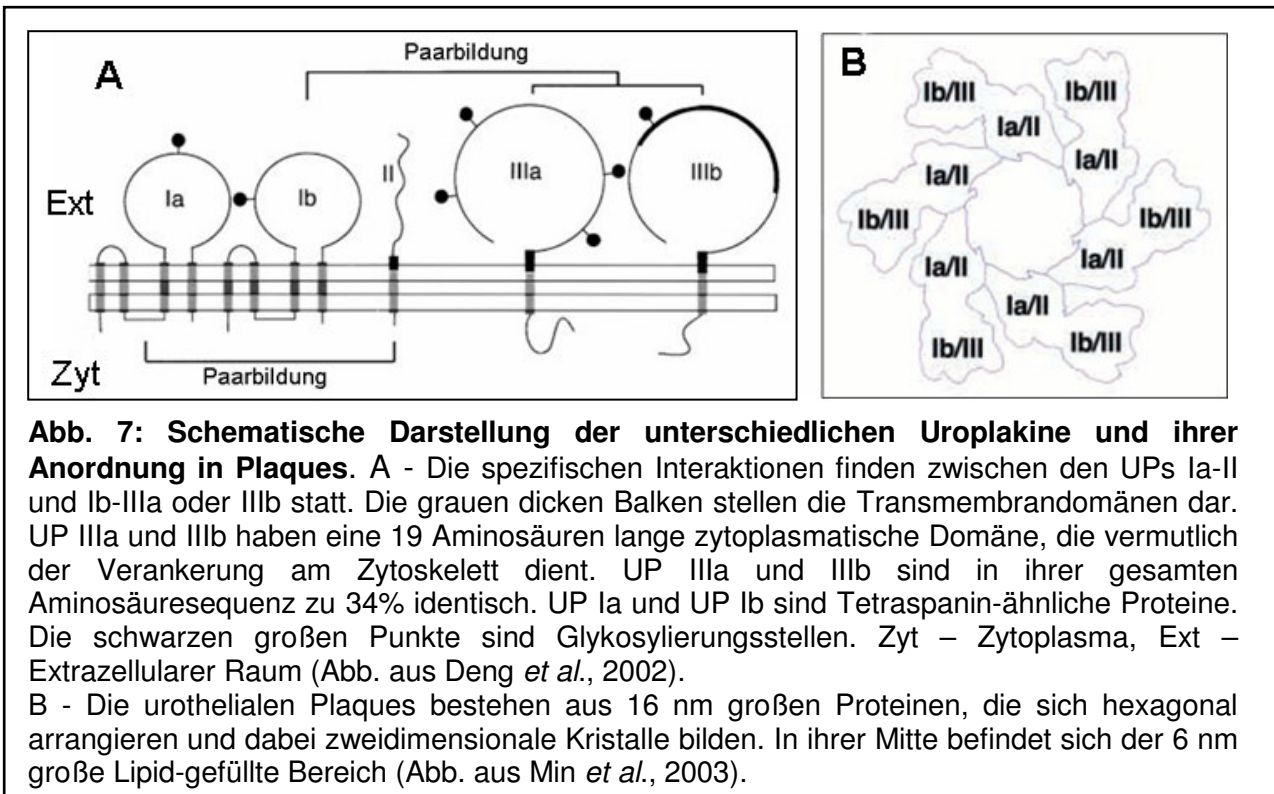


Abb. 7: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Uroplakine und ihrer Anordnung in Plaques. A - Die spezifischen Interaktionen finden zwischen den UPs Ia-II und Ib-IIIa oder IIIb statt. Die grauen dicken Balken stellen die Transmembrandomänen dar. UP IIIa und IIIb haben eine 19 Aminosäuren lange zytoplasmatische Domäne, die vermutlich der Verankerung am Zytoskelett dient. UP IIIa und IIIb sind in ihrer gesamten Aminosäuresequenz zu 34% identisch. UP Ia und UP Ib sind Tetranspanin-ähnliche Proteine. Die schwarzen großen Punkte sind Glykosylierungsstellen. Zyt – Zytoplasma, Ext – Extrazellulärer Raum (Abb. aus Deng *et al.*, 2002).

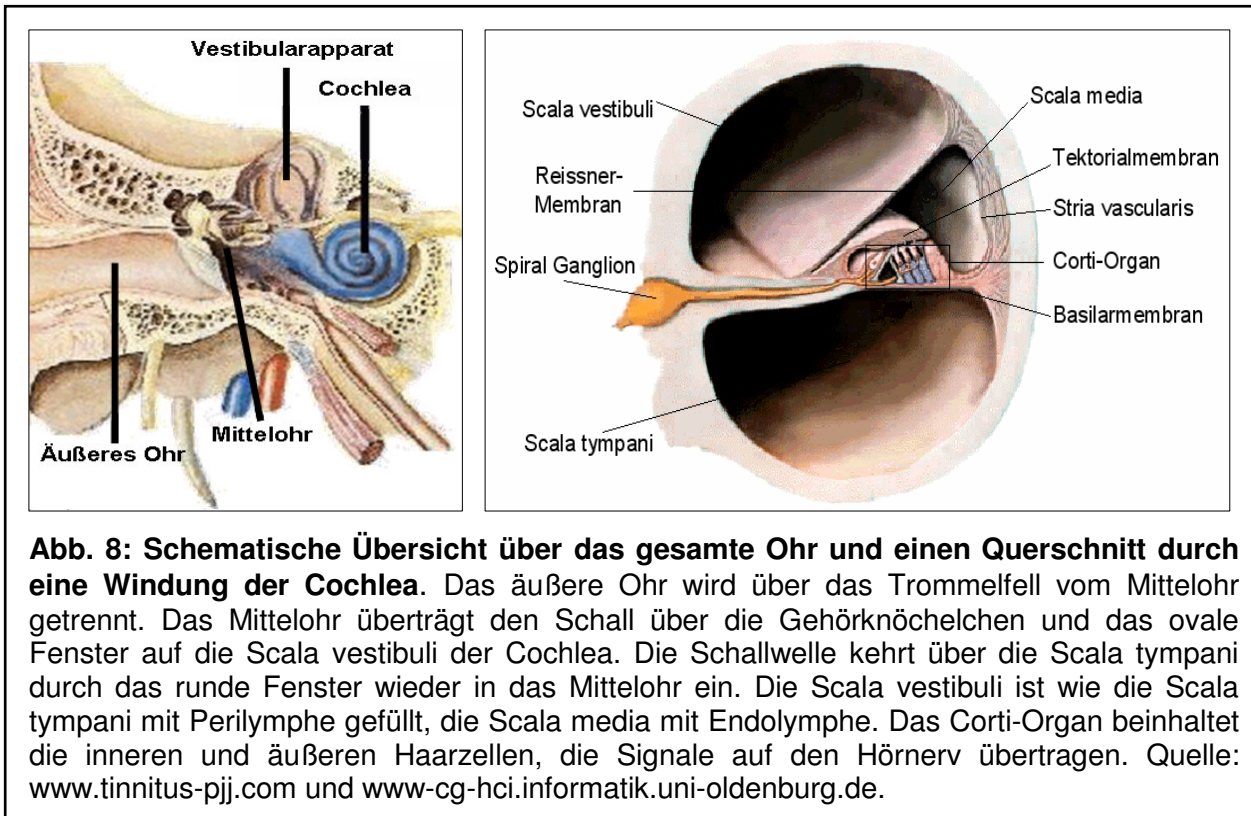
B - Die urothelialen Plaques bestehen aus 16 nm großen Proteinen, die sich hexagonal arrangieren und dabei zweidimensionale Kristalle bilden. In ihrer Mitte befindet sich der 6 nm große Lipid-gefüllte Bereich (Abb. aus Min *et al.*, 2003).

1.8.2 Taubheit der Limp-2 Knock-out-Mäuse

Das Ohr gliedert sich in drei Bereiche: das äußere Ohr, das Mittelohr und das Innenohr. Der Schall wird mit der Luft über das äußere Ohr zum Mittelohr (Paukenhöhle) geleitet. In ihr liegen die Gehörknöchelchen, die den Schall über Hammer, Amboss und Steigbügel zum ovalen Fenster und dann zum flüssigkeitsgefüllten Innenohr weiterleiten (Willems *et al.*, 2000). Das Innenohr untergliedert sich in das Gleichgewichtsorgan (Vestibularapparat) und die Cochlea (Abb. 8).

Die Cochlea besteht aus drei schneckenförmig gewundenen Kanälen (Abb. 8). Die Scala media ist mit Endolympe, die Scala tympani und die Scala vestibuli mit Perilymphe gefüllt (Willems *et al.*, 2000). Die Schwingungen werden auf die Perilymphe übertragen, wodurch eine Wanderwelle entsteht, die die Basilarmembran, die Tektorialmembran und die Reissner-Membran (Abb. 8) in Schwingungen versetzt. Dies hat zur Folge, dass die Sinneshärchen (Stereocilien) der äußeren Haarzellen, durch das Protein Prestin vermittelt, umgebogen werden (Zheng *et al.*, 2000). An den inneren Haarzellen entsteht eine Änderung des

Membranpotentials, das zur Freisetzung afferenter Transmitter führt, die an ihre Rezeptoren gebunden, in der Nervenzelle ein Nervenaktionspotential auslösen (Slepecky, 1996).



Voraussetzung für den Hörvorgang ist das endocochleare Bestandpotential, das durch die ungleiche Kalium- und Natriumionen Verteilung zwischen Endo- und Perilymphe zustande kommt. Dadurch liegt über den Haarzellen eine hohe Potentialdifferenz von etwa 155 mV (Brunner und Nöldeke, 2001). Der Zyklus von Kaliumionen in der Endolymphe wird über Kaliumkanäle gesteuert. Unter anderem KCNQ1 und KCNE1 in der Stria vascularis, KCNQ4 in den äußeren Haarzellen und Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter in der basolateralen Membran der Marginalzellen (Steel, 1999). Taubheit kann durch viele verschiedene Mutationen verursacht werden, allein Mutationen in sechs verschiedenen Genen sind direkt mit dem Kaliumtransport verbunden (Steel, 1999; Minowa *et al.*, 1999).

Limp-2 defiziente Mäuse werden ab einem Alter von drei bis sieben Monaten taub. Bei histologischen Untersuchungen der Cochlea von zwei Monate alten Limp-2 Knock-out-Mäusen fiel die beginnende Degeneration der Stria vascularis auf (Gamp

et al., 2003). Diese dreischichtige Zellschicht in der Scala media (Abb. 8) ist für die Sezernierung von Kaliumionen in die Endolymphe verantwortlich, was für den Erhalt des endocochlearen Potentials essentiell ist. Ohne dieses Potential findet kein Hörvorgang statt, da keine mechanoelektrische Transduktion mehr stattfinden kann. In dem beginnenden Stadium des Hörverlusts (zwei Monate alt) sind die drei Schichten der Stria vascularis noch erkennbar, die Degenerierung schlägt sich zunächst in einer Reduktion der Breite und des Verlustes der Fortsätze der apikalen Schicht (Marginalzellen) zum basalen Bereich nieder. Mit zunehmendem Alter bildet sich eine extrazelluläre Matrix um die Kapillaren der Stria vascularis, deren Herkunft noch nicht geklärt ist. Ab einem Alter von etwa sechs Monaten beginnt der Degenerierungsprozess der äußeren Haarzellen, gefolgt vom Verlust der inneren Haarzellen (Gamp *et al.*, 2003). Das letzte Merkmal der Taubheit der *Limp-2* defizienten Mäuse ist, als Folge der nicht mehr vorhandenen Ausschüttung der Transmitter, die Reduzierung der Neuronen im Spiralganglion bei Tieren, die älter als neun Monate sind (Gamp *et al.*, 2003).

1.8.3 Periphere Neuropathie in *Limp-2* defizienten Mäusen

Das periphere Nervensystem (PNS) der Vertebraten besteht aus den Nervenknoten oder Ganglien und den peripheren Nerven, die außerhalb von Gehirn und Rückenmark verlaufen.

Die Axone sind von einer Hülle aus Nervenfasern umgeben, die Markscheide genannt wird. Sie besteht aus Myelin, einem Lipoprotein, das bei dem PNS von Schwann-Zellen gebildet wird. In regelmäßigen Abständen (1-3 mm) wird die Markscheide von tiefen Einschnürungen, den *Ranvier*-Knoten, unterbrochen, an denen Synapsen und Axonabzweigungen vorkommen (Platzer *et al.*, 2003). Der Abschnitt zwischen zwei *Ranvier*-Knoten (das Internodium) entspricht der Ausdehnung einer Schwann-Zelle (Garbay *et al.*, 2000). Im Querschnitt sind die Axone in strenger Regelmäßigkeit von etwa 100 Lagen konzentrischer dunkler und heller Membranlamellen umgeben (Lemke, 1993), wobei die dunklen Ringe spezialisierte Myelinproteine darstellen und die hellen Ringe Lipide enthalten (Abb. 9; Kahle und Frotscher, 2002).

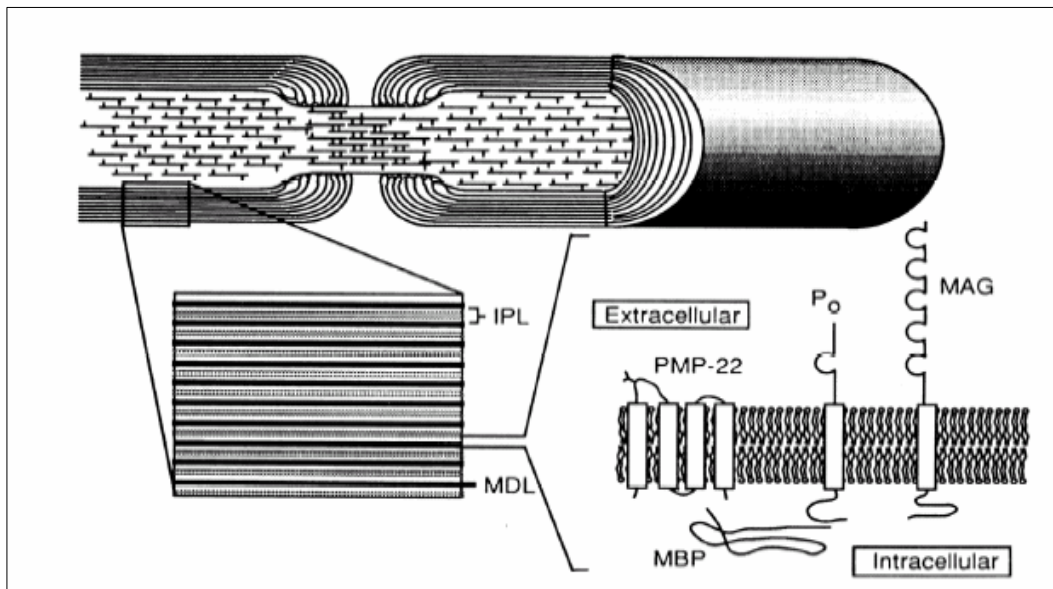


Abb. 9: Schematische Darstellung des Aufbaus der Myelinscheide. Die Schwann-Zellen wickeln sich in mehreren Schichten um ein Axon. Die verschiedenen Schichten werden durch die Myelinproteine stabilisiert und verbunden. IPL – Intra Period Line (helle Ringe), MDL – Major Dense Line (dunkle Ringe), PMP22 – Peripheres Myelinprotein 22 kD, MBP – Myelin Basisches Protein, P0 – Myelin Protein Zero und MAG – Myelin Assoziiertes Glykoprotein. (Abb. modifiziert nach Suter und Scherer, 2003).

Die Hauptkomponente des Lipidanteils bilden Phospholipide, Cholesterin und Glykosphingolipide (Smith und Curtis, 1979). Die meisten PNS-Myelinproteine (Abb. 10) sind Glykoproteine (Shuman *et al.*, 1983), wie das Protein Zero (P0, Brown und Lemke, 1997), das Periphere Myelinprotein 22 kD (PMP22, Pareek *et al.*, 1997), das Myelin assoziierte Glykoprotein (MAG, Owens und Bunge, 1989) und das Myelin basische Protein (MBP).

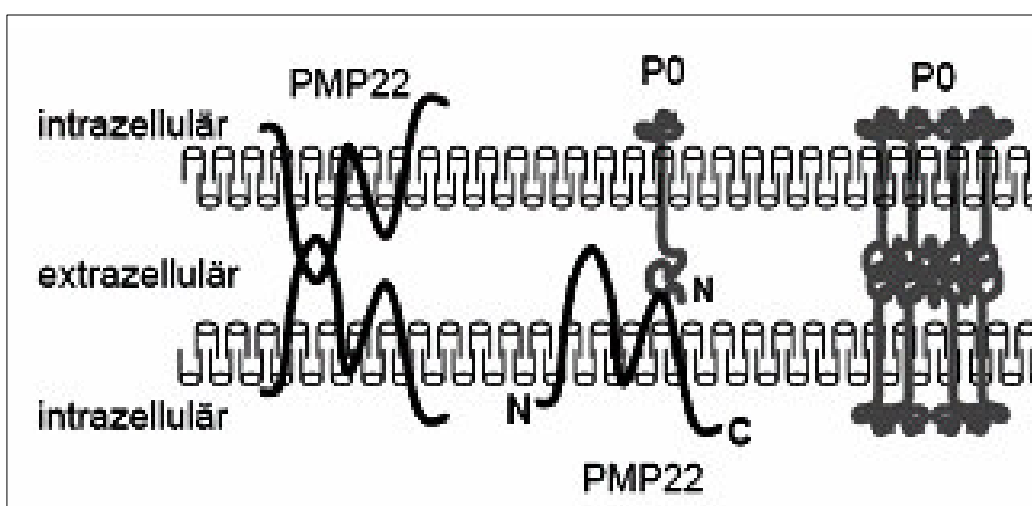


Abb. 10: Modell der Interaktion von PMP 22 und P0 in kompaktem Myelin. PMP22 und P0 konzentrieren sich in räumlicher Nähe und bilden die adhäsiven homophilen und heterophilen trans-Interaktionen aus. Diese Interaktionen könnten den Zusammenhalt der multilamellaren Myelinschicht von Schwann-Zellen im peripheren Nerv bewirken. N – N-terminus, C – C-terminus (Abb. modifiziert nach Suter und Scherer, 2003).

Die Myelinproteine sind essentiell für die Festigkeit und Stabilität der konzentrischen Ringe, da sie untereinander Bindungen eingehen (Abb. 10). Mittels der Myelinisierung wird die schnelle saltatorische Erregungsleitung ermöglicht, die ausschließlich an den *Ranvier*-Knoten stattfindet.

Die häufigste vererbte Neuropathie im Menschen ist die Charcot-Marie-Tooth Erkrankung (CMT). Die CMT1 ist durch Hypomyelinisierung des peripheren Nervensystems und Schwann-Zell-Hypertrophie, den sogenannten *onion bulbs* charakterisiert, die durch den stetigen Wechsel von De- und Remyelinisierung entstehen (Young und Suter, 2003; Suter und Scherer, 2003). Dadurch kommt es zu verminderter Nervenleitungsgeschwindigkeit und fehlenden Muskel-Dehnungsreflexen (Keller und Chance, 1999). CMT1 ist weiterhin unterteilt in CMT1A, Mutationen im PMP22-Gen (Naef und Suter, 1999; Maier *et al.*, 2003), CMT1B, Mutationen im P0 (You *et al.*, 1991; Chapon *et al.*, 1999) und CMTX, Mutationen im Connexin 32 (Patel und Lupski, 1994; Ressot *et al.*, 1998; Keller und Chance, 1999).

Die Durchmesser der peripheren Nerven der *Limp-2* defizienten Maus sind bis zu 150% dicker als die Nerven der gleichaltrigen Kontrolltiere. Dieser Effekt wird begleitet von einer Reduktion der Anzahl der einzelnen Nervenfasern in einem Nerv. Die Verdickung des gesamten peripheren Nervs kommt durch den stetigen Ab- und Aufbau der Myelinisierung durch die Schwann-Zellen zustande (Gamp *et al.*, 2003). Durch die Westernblot-Analyse stellte sich heraus, dass die Expression der Myelinproteine PMP22, P0 und MBP bei zwölf Monate alten *Limp-2* defizienten Tieren reduziert war (Gamp *et al.*, 2003). Dadurch verlieren die konzentrischen Membranlamellen der myelinisierten Schwann-Zellen den Kontakt zueinander und eine sogenannte Zwiebelringstruktur (*onion bulbs*) um die Axone entsteht (Gamp *et al.*, 2003).

Des Weiteren enthalten die *Limp-2* defizienten Schwann-Zellen abnormale dichte Einschlüsse und Vakuolen, die mit Zytoplasma gefüllt sind. Die Einschlüsse der Schwann-Zellen ähneln in ihrer Struktur den abnormalen Einschlüssen des Urothels (Gamp *et al.*, 2003).

2. Problemstellung

Zur Funktionsanalyse des lysosomalen Membranproteins Limp-2 wurde in Vorarbeiten durch homologe Rekombination ein Limp-2 defizienter Mausstamm hergestellt. Die gezielte Ausschaltung des Limp-2 Proteins in Mäusen soll Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins auf Grund des Phänotyps der Limp-2 Knock-out-Mäuse erlauben.

Initiale Untersuchungen zeigten eine charakteristische Pathologie, die sich durch die gezielte Ausschaltung des murLimp-2-Gens in der Maus ergeben hat. Dabei wurden wichtige Funktionen von Limp-2 in den ableitenden Harnwegen, den peripheren Nerven und im auditorischen System gefunden, da die Limp-2 defiziente Maus an Hydronephrosen, einer peripheren Neuropathie und Taubheit leidet.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Funktionen von Limp-2 näher zu beschreiben. Dies soll mittels der Analyse von Limp-2 defizienten primären Zellen und detaillierten histologischen Analysen der verschiedenen betroffenen Gewebe geschehen. Besonderes Augenmerk wird dabei auf das auditorische System und den Harntrakt gelegt.

Des Weiteren soll der Zusammenhang der drei Charakteristika des Phänotyps der Limp-2 defizienten Maus beachtet werden, da alle Merkmale auf der gleichen Funktionsstörung basieren können.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

96-well-Mikrotiterplattenleser Sunrise	Tecan, Crailsheim, D
Agarosegelkammer Modell H5	Roth, Karlsruhe, D
Analysenwaage	Kern & Sohn, Dürrewangen, D
Autoklav	Tecnomara Integra, Fernwald, D
Brutschrank	Heraeus, Hanau, D
Chemilumineszenzkamera LAS-1000	Fujifilm, Carrollton, USA
CO ₂ -Inkubatoren	Heraeus, Hanau, D
DNA-Photometer	GeneQuant pro, Biochrom, Cambridge, UK
Elektrischer Bunsenbrenner	HORO, Ostfildern, D
Färbetröge und Objektträgerschlitten	Assistent, Sondheim, D
Flüssigkeitsszintillationszähler	Beckman, Krefeld, D
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg, D
Homogenisator Xenox	Roth, Karlsruhe, D
Horizontalschüttler RM 5	Assistent, Sondheim, D
Mikrotom	Jung AG, Heidelberg, D
Mikroskope	
Fluoreszenzmikroskop, Modell Axiovert	Zeiss, Jena, D
Fluoreszenzkamera, Axiovert 200M	Zeiss, Jena, D
Fluoreszenzfilter – A350/A488/A594	Zeiss, Jena, D
Phasenkontrastmikroskop	Leika
Mikrowellenherd	Panasonic, Japan
Multipette	Eppendorf, Hamburg, D
Nass-Blot-Apparatur (Trans Blot/Wet Blot)	BioRad, München, D
PCR-Cycler	Perkin Elmer, USA
pH-Meter	Krick, Langenselbold, D
Phosphoimager – BAS-1000/LAS-1000	Fujifilm, Kanagawa, Japan
Photometer	Hitachi, Japan
Pipetten	Gilson, Middleton, USA
Rundumschüttler	Assistent, Sondheim, D

Schlauchpumpe Ecoline VC-280	Ismatec, Wertheim-Mondfeld, D
SDS-Geltrockner GelAir Dryer	BioRad, Hamburg, D
SDS-PAGE, Mini-Protean 3-Elektrophoresis-System oder großes Gelkammersystem	BioRad, Hercules, USA
Semi-Dry-Blot-System, Transblot SD	BioRad, München, D
Spannungsquellen PowerPack 200/300	BioRad, München, D
Sterilbank danLAF VFR 1806	Claus Damm A/S, Humlebaek, DK
Strecktisch	Medax Nagel, Kiel, D
Thermoblock	Eppendorf, Hamburg, D
Ultraschall Stab, High Intensity Ultrasonic Processor	Walter F.C. Ebel, Hamburg, D
UV-Tisch	} Intas UV-Systeme, Intrascience Imaging Instruments, Göttingen, D
Video-Drucker	
Video-Kamera	
Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, CH
Waage	Sartorius, Göttingen, D
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach, D
Wasserbad	GFL, Burgwedel, D
Zentrifugen:	
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, D
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, D
Zellzentrifuge Universal 32, Typ1605	Hettich, Tuttlingen, D

3.1.2 Verbrauchsmaterial

6- und 24-Loch-Zellkulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht, D
96-Loch-Platten	Sarstedt, Nümbrecht, D
Cellophanfolien	BioRad, Hercules, CA, USA
DAKO-Pen	DAKO, Glustrup, DK
Deckgläschen Ø13mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Einfrierröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Einmalkanülen Microlance	Becton Dickinson, Fraga, E
Einmalspritzen	Becton Dickinson, Madrid, E
Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel, D
Handschuhe	Roth, Karlsruhe, D

Immersionsöl	Zeiss, Jena, D
Mikrotomklingen Feather S35	pfm, Köln, D
Neubauerzählkammer	Brand, Wertheim, D
Nitrocellulose	Roth, Karlsruhe, D
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Objektträger Superfrost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Parafilm M	American National Can, Greenwich, GB
pH-Indikatorstreifen	Macherei-Nagel Düren, D
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Plastik-Einmalpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, D
Präparationsbesteck	FST, Heidelberg, D
PVDF-Membran	Roth, Karlsruhe, D
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, D
Skalpell Feather, Nr.10	pfm, Köln, D
Sterile Plastikröhrchen (15 & 50ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Sterilfilter Filtropurs 0.2	Sarstedt, Nümbrecht, D
Whatman Papier	Roth, Karlsruhe, D
Zellkulturschalen 3cm, 6cm und 10cm	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, D

3.1.3 Chemikalien

A:		B:	
Accutase	PAA Laboratories, Linz, A	Benzoessäure- Methylester	Roth, Karlsruhe, D
Aceton	Merck, Darmstadt, D	β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D
Acrylamid Gel 30	Roth, Karlsruhe, D	BSA	Sigma, Steinheim, D
Agarose	Roth, Karlsruhe, D	Bromphenolblau	Canalco, Bethesda, Md
Aktivkohle	Merck, Darmstadt, D		
C:		D:	
Calciumchlorid	Sigma, Steinheim, D	DABKO	Sigma, Steinheim, D
Collagenase Typ 1	Sigma, Steinheim, D	DAPI	Sigma, Steinheim, D
Coomassie Brilliant Blue	Merck, Darmstadt, D	Dextran	Molecular Probes, Oregon, USA
Complete Proteinaseinhibitor	Roche, Mannheim, D	DMSO	Sigma, Steinheim, D
		DNA-Marker 1kb	Roche, Mannheim, D
		dNTPs	Fermentas, St.Leon- Rot, D
		DTT	Sigma, Steinheim, D

E: EBSS Gibco, Paisley, UK EDTA Roth, Karlsruhe, D Essigsäure Riedel-de Haën, Seelze, D Eosin Merck, Darmstadt, D Ethanol Roth, Karlsruhe, D Ethanolamin Sigma, Steinheim, D Ethidiumbromidlösung Roth, Karlsruhe, D	F: Formaldehyd Merck, Darmstadt, D Filipin Sigma, Steinheim, D Formalin Merck, Darmstadt, D Forskolin Sigma, Steinheim, D Fugene 6 Roche, Mannheim, D
G: Gelatin Sigma, Steinheim, D Glutaraldehyd 25% Agar Stansted, UK Glycerin Merck, Darmstadt, D Glycin Roth, Karlsruhe, D	H: Hämalaun Merck, Darmstadt, D HEPES p.a. BDH Laboratory Supplies, Poole, UK
I: Isopropanol Roth, Karlsruhe, D	K: Kaliumchlorid Roth, Karlsruhe, D
L: LysoTracker Red Molecular Probes, DND-99 Oregon, USA	M: Magermilchpulver Roth, Karlsruhe, D Magnesiumchlorid Roth, Karlsruhe, D Methanol Roth, Karlsruhe, D Mowiol Calbiochem, LaJolla, USA
N: Natriumazid Sigma, Steinheim, D Natriumchlorid Roth, Karlsruhe, D Natriumcitrat Merck, Darmstadt, D Natriumdesoxycholat Merck, Darmstadt, D Natriumdodecylsulfat Roth, Karlsruhe, D	P: Paraformaldehyd Merck, Darmstadt, D Pikrinsäure Merck, Darmstadt, D p-Nitrophenyl 2- acetamido-2-deoxy- b-D-glucopyranoside NBS-Biologicals, Cambs, UK Ponceau S Sigma, Steinheim, D Prokainhydrochlorid Sigma, Steinheim, D Protein G-Sepharose Amersham, Uppsala, S
S: Saponin Sigma, Steinheim, D Silbernitrat Merck, Darmstadt, D Salzsäure Roth, Karlsruhe, D	T: TEMED Roth, Karlsruhe, D Transferrin Molecular Probes, Oregon, USA Tribromethanol Sigma, Steinheim, D Triton X-100 Sigma, Steinheim, D Tris Roth, Karlsruhe, D Tween 20 Sigma, Steinheim, D
W: Wasserstoffperoxid Interox, Höllriegelskreuth, D Wortmannin	X: Xylol Roth, Karlsruhe, D

3.1.4 Verwendete Kits

Zur Proteinbestimmung wurde das *BCA-Protein Assay Reagent Kit* von Pierce genutzt. Zur Auswertung der Immunodetektion von Proteinen auf Membranen wurde das *ECL-Advanced Kit* von Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK eingesetzt. Die Immunpräzipitation des Limp2-HA-Konstrukts aus MEF-Zellen wurde mit Hilfe des *HA-Tag IP/Co-IP-Kits* von Pierce durchgeführt. Für die Isolierung der DNA aus Schwanzspitzen wurde das *Invisorb Spin Tissue Kit (50)* von Invitex verwendet.

3.1.5 Vektoren

Die Vektoren pcDNA 3.1 und p409 stammen von Invitrogen (Karlsruhe, D). Das Plasmid pcDNA 3.1 wurde mit der cDNA von murLimp-2, humLimp-2, KCNQ1 und KCNE1 versehen und für Transfektionsversuche eingesetzt. In das Plasmid p409 wurde murLimp-2 mit C-terminalem HA-Tag kloniert.

3.1.6 Oligonukleotide

Die verwendeten Primer wurden von Sigma Genosys (Steinheim, D) erworben.

a) Primer für den Nachweis der Limp-2 Abwesenheit in den Knock-out-Tieren:

Limp2-5'- Intron 7 – 5' TCT ATG TCA ACC ACT GCA GGT 3'

Limp2-3'- Intron 8 – 5' CAG TGA GAA GTG TGT ACT CAC 3'

b) Primer für den Mycoplasmen-Nachweis:

Myc-vorwärts F1 – 5' ACA CCA TGG GAG CTG GTA AT 3'

Myc-vorwärts F2 – 5' GTT CTT TGA AAA CTG AAT 3'

Myc-rückwärts R1 – 5' CTT CWT CGA CTT YCA GAC CCA AGG CAT 3'

Myc-rückwärts R2 – 5' GCA TCC ACC AWA WAC TCT 3'

3.1.7 Zelllinien und Kulturmedien

Zelllinie	Beschreibung	Medium	Referenz
Li-2 -/- MEF, Linie 1-8	embryonale Mausfibroblasten, „Limp-2-defiziente-Maus“ primär oder spontan transformiert	DMEM mit 10% FKS und 1% Pen/Strep	Eigene Herstellung
Li-2 +/+ MEF, Linie 1-6	embryonale Mausfibroblasten, „Limp-2-positive-Maus“ primär oder spontan transformiert	DMEM mit 10% FKS und 1% Pen/Strep	Eigene Herstellung
Li-2 -/- Kokultur aus DRG und Schwannzellen	Kokultur aus dorsalen Wurzel- Ganglienzellen und Schwann- Zellen aus dem Nervus ischia- dicus Limp-2 defizienter Mäuse	DMEM mit 10% FKS, 1% Pen/Strep und 5 mg/ml Glucose	Eigene Herstellung
Li-2 +/+ Kokultur aus DRG und Schwannzellen	Kokultur aus dorsalen Wurzel- Ganglienzellen und Schwann- Zellen aus dem Nervus ischia- dicus von Kontroll-Mäusen	DMEM mit 10% FKS, 1% Pen/Strep und 5 mg/ml Glucose	Eigene Herstellung
Li-2 -/- und +/+ Schwann- Zellen	Kultivierte Schwann-Zellen aus dem Nervus ischiadicus beider Genotypen	DMEM mit 10% FKS und 1% Pen/Strep	Eigene Herstellung
Li-2 -/- adulte Schwanz- Fibroblasten	adulte Fibroblasten aus dem Schwanz der Limp-2-defizienten Maus	DMEM mit 10% FKS und 1% Pen/Strep	Eigene Herstellung
Li-2 +/+ adulte Schwanz- Fibroblasten	adulte Fibroblasten aus dem Schwanz der CD53S Wildtyp- Maus	DMEM mit 10% FKS und 1% Pen/Strep	Eigene Herstellung
Li-2 -/- adulte Cornea- Fibroblasten	adulte Fibroblasten aus der Cornea der Limp-2-defizienten Maus	DMEM mit 10% FKS und 1% Pen/Strep	Eigene Herstellung
Li-2 +/+ adulte Cornea- Fibroblasten	adulte Fibroblasten aus der Cornea der CD53S Wildtyp-Maus	DMEM mit 10% FKS und 1% Pen/Strep	Eigene Herstellung
COS7	<i>Nieren-Fibroblasten aus der afr. Grünen Meerkatze Cercopithecus aethops, immortalisiert mit dem großen SV40 T-Antigen</i>	DMEM mit 10% FKS und 1% Pen/Strep	ATCC, etablierte Zelllinien

3.1.8 Mausstämme

Limp-2 +/+	Synonym - <i>CD53S</i> - Wildtyp mit einem gemischten genetischen Hintergrund aus C 57 BL/6J x 129 SV/J, eigene Auszucht
Limp-2 -/-	Synonym – <i>Eli II 24</i> - Limp-2 defizienter Stamm mit einem gemischten genetischen Hintergrund aus C 57 BL/6J x 129 SV/J, eigene Auszucht
Limp-2 +/-	Synonym – <i>Eli II 24 x Bl/6</i> - Auszucht aus <i>Eli II 24 -/-</i> mit C 57 BL/6J +/+

3.1.9 Zellkulturmedien und Lösungen zur Arbeit mit Zellen

PBS:	150 mM NaCl 120 mM KCl 10 nM Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄	pH 7.4
TBS:	20 mM Tris 150 mM NaCl 1 mM EDTA	pH 7.4
DMEM:	Gibco/BRL, Eggenstein, D und PAA Laboratories, Linz, A	
FKS:	30 min hitzeinaktiviert bei 56 °C Biochrom und PAA (chargenabhängig)	
Penicillin/Streptomycin:	100 x konzentrierte Stammlösung (10.000 µg/ml), PAA Laboratories, Linz, A	
Nutrient Mixture:	Gibco/BRL, Eggenstein, D	
Trypsin-EDTA:	Gibco/BRL, Eggenstein, D	

Für die Dissoziation der Nerven wurden benötigt:

Dispase II:	Roche, Mannheim, D
Collagenase Typ IV:	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

3.1.10 Eingesetzte Primärantikörper

Antigen	Immunisierte Spezies, Ig-Klasse, Bezeichnung	IF-Verd.	WB-Verd.	Referenz
α Limp2, Kaninchen	Ratte, IgG, LGP85 Serum, LGP85 tail	AK 1:50	Serum 1:500	Tabuchi <i>et al.</i> , 1997
α Lamp2, Ratte	Maus, IgG, ABL-93	1:50	1:300	DSHB
α Lamp1, Ratte	Maus, IgG, 1D4B	1:50	1:100	DSHB
α Cathepsin D, Kanin.	Maus, IgG, S-II 5	1:100	1:1000	Pohlmann <i>et al.</i> , 1995
α MPR46, Kaninchen	Maus, IgM, MSC1	1:50	1:1000	Klumpermann <i>et al.</i> , 1993
α MPR300, Kaninchen	Ratte, IgG, I-5	1:100	1:400	Claussen <i>et al.</i> , 1995
α γ -Adaptin, Maus	Ratte, IgG	1:100	X	Santa Cruz, D
α KCNE1, Kaninchen	Ratte, IgG, anti-IsK	1:200	X	Lesage <i>et al.</i> , 1993
α KCNQ1, Kaninchen	Ratte, IgG	1:100	X	Santa Cruz, D
α Megalyn, Ziege	Ratte, IgG	1:100	X	Santa Cruz, D
α myc, Maus	Ratte, IgG, 9E10	1:40	X	Santa Cruz, D
α HA, Ratte	Maus, IgG, 3F10	1:500	1:1000	DSHB
α Uroplakin Ia, Kanin.	Maus, IgM	1:200	1:2000	Liang <i>et al.</i> , 2001
α Uroplakin Ib, Kanin.	Maus, IgM	1:2000	1:5000	Sun, New York
α Uroplakin II, Kanin.	Maus, IgM	1:200	1:2000	Liang <i>et al.</i> , 2001
α Uroplakin IIIa, Maus	Rind, IgG1, AU1	1:50	1:2000	Progen, D
α Uroplakin IIIb, Kanin.	Maus, IgM	1:200	1:2000	Liang <i>et al.</i> , 2001
α RAB27b, Kaninchen	Ratte, IgG	1:500	X	Seabra <i>et al.</i> ,
α S100, Kaninchen	Ratte, IgG	1:100	X	Santa Cruz, D
α PMP22, Kaninchen	Maus, IgM	1:1000	1:3000	Suter <i>et al.</i> ,
α P0, Maus	Ratte, IgG	1:5000	1:3000	Suter <i>et al.</i> ,
α MBP, Maus	Ratte, IgG	X	1:500	Suter <i>et al.</i> ,

Alle Erst-Antikörper wurden für die Immunfluoreszenz in 0.75% (Paraffinschnitte) oder 3% (Zellkulturzellen) BSA in PBS und für den Westernblot in 3% Magermilchpulver in TN-T verdünnt.

3.1.11 Eingesetzte Sekundärantikörper

Bezeichnung	Kopplung	IF-Verd.	WB-Verd.	Herkunft
Ziege α Kaninchen	A488 & A594	1:500	X	Molecular Probes, Oregon, USA
Ziege α Ratte	A488 & A594	1:500	X	Molecular Probes, Oregon, USA
Ziege α Maus	A488 & A594	1:500	X	Molecular Probes, Oregon, USA
Ziege α Esel	A594	1:500	X	Molecular Probes, Oregon, USA
Esel α Kaninchen	A488 & A594	1:500	X	Molecular Probes, Oregon, USA
Esel α Kaninchen	HRP sc-2313	X	1:10000	Santa Cruz, Heidelberg, D
Kaninchen α Maus	HRP	X	1:10000	Santa Cruz, Heidelberg, D

Die Sekundärantikörper wurden für den Westernblot in 3% Magermilchpulver in TN-T eingesetzt.

Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden die Sekundärantikörper in 0.75% (Paraffinschnitte) oder 3% (Zellkulturzellen) BSA in PBS verdünnt. Zusätzlich wurde 1% Ziegen-Serum zu den in der Ziege erzeugten Antikörpern hinzugegeben.

TN-T: 100 mM Tris/HCl pH 7.4
 150 mM NaCl
 0.05% Tween 20

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

Alle Zelllinien wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Medien wurden vor Verwendung auf 37°C erwärmt.

3.2.1.1 *Präparation primärer Fibroblasten aus Limp-2 defizienten Embryonen und Kontroll-Embryonen aus der Maus*

Ein trächtiges Limp-2-defizientes Weibchen und ein entsprechendes Wildtyp-Weibchen wurden nach Betäubung am Embryonaltag 12.5-14.5 durch Dislokation der Halswirbelsäule getötet. Der Uterus wurde herauspräpariert und in sterilem PBS gereinigt. Die Embryonen wurden in PBS aus dem Uterus und der Amnionhöhle herausgelöst und nochmals in frischem PBS gereinigt.

Vom Embryonalgewebe wurden die Organe Herz und Leber mit einer Pinzette entfernt und jeder Embryo einzeln in eine 3 cm-Schale gesetzt. Die Embryonen wurden mit einem sterilen Skalpell in etwa 2 mm große Stücke geschnitten, wobei auch in das Plastik der Schale eingeschnitten wurde. An diesen Schnitten konnten die Gewebestücke gut an- und auswachsen. Bis zum Auswachsen der Embryonenstücke wurden die Fibroblasten in D50 kultiviert, danach wurde auf D20-Medium gewechselt und nach dem ersten Passagieren der Zellen in 6 cm-Schalen wurden diese in DMEM, 10% FKS und 1% Pen/Strep kultiviert.

D50: DMEM
50% FKS
1% Pen/Strep

D20: DMEM
20% FKS
1% Pen/Strep

3.2.1.2 Präparation adulter Fibroblasten aus *Limp-2* defizienten Mäusen und Kontroll-Mäusen

Zur Kultivierung adulter Fibroblasten aus der Schwanzspitze von Mäusen wurde den Tieren beider Genotypen die Schwanzspitze abgetrennt und in 70% Ethanol von Bakterien gereinigt. Die Schwanzspitzen wurden anschließend in 3 cm-Schalen gelegt. Zur Herstellung adulter Fibroblasten aus der Cornea wurden den jeweiligen verwendeten Tieren beider Genotypen nach Tötung durch Dislokation der Halswirbelsäule die Augen herauspräpariert. Die Cornea wurde in 1 x PBS von dem restlichen Auge abgetrennt und in je eine 3 cm-Schalen gelegt.

Beide Gewebe der adulten Mäuse wurden mit einem sterilen Skalpell in 2 mm große Stücke geschnitten. Das An- und Auswachsen der Gewebestücke erfolgte in D50, danach wurde auf D20-Medium gewechselt und nach dem ersten Passagieren der Zellen auf 6 cm-Schalen wurden diese in DMEM, 10% FKS und 1% Pen/Strep kultiviert.

D50: DMEM
50% FKS
1% Pen/Strep

D20: DMEM
20% FKS
1% Pen/Strep

3.2.1.3 Kokultivierung von dorsalen Wurzelganglien und Schwann-Zellen aus dem Nervus ischiadicus

(Methode modifiziert nach Watabe *et al.*, 1990 und Keilhoff *et al.*, 1999)

Zur Herstellung einer Kokultur aus dorsalen Wurzelganglien (DRG) und Schwann-Zellen des Nervus ischiadicus wurden die Mäuse durch Dislokation der Halswirbelsäule getötet und die Ischiasnerven präpariert. Anschließend wurde den Tieren die Wirbelsäule entfernt und die DRG in 1 x PBS zwischen dem Wirbelkörper und den Querfortsätzen der Wirbelsäule herausgetrennt. Die Ischiasnerven wurden zusammen mit den DRG in 1 x PBS in der Zellzentrifuge Universal 32 bei 600 x g sedimentiert und für 2-3 Stunden im CO₂-Inkubator mit 3 ml Dispase und

Collagenase dissoziiert. Etwa alle 30 min wurde die Lösung mit den Nerven und Ganglienzellen gevortext, da das Gewebe am Boden sedimentierte. Nach der enzymatischen Dissoziation folgte die mechanische Dissoziation mit Glas-Pasteurpipetten. Dazu wurden die Pasteurpipetten in drei verschiedene Größen mit einem Gasbrenner eingeschmolzen. Die Lösung mit den Nerven und Ganglien wurde mit den unterschiedlich großen Pasteurpipetten jeweils etwa zehnmal aufgenommen und abgegeben und die Schwann-Zellen der Nerven dadurch vereinzelt. Nach der Dissoziation wurde die Kokultur nochmals in der Zellzentrifuge Universal 32 bei 600 x g sedimentiert und das Pellet in DMEM, 10% FCS, 1% Pen/Strep und 5 mg/ml Glucose aufgenommen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte auf Glas-Deckgläschen in 24-Loch-Schalen oder in 3 cm-Schalen.

<u>Dissoziationslösung:</u>	DMEM
	10% FCS
	1% Pen/Strep
	1.25 U/ml Dispase 2
	0.05% Collagenase Typ IV

3.2.1.4 Passagieren von adhärennten Zellen

Das Medium wurde aus einer Schale mit konfluenten Zellen abgesaugt und die Zellen anschließend mit 5-10 ml 1 x PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen und inhibierende Einflüsse von Serumbestandteilen auf die Trypsinaktivität zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen mit 0.5-1 ml (je nach Schalengröße) Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen abrundeten und vom Untergrund ablösten. Der Ablösungsprozess wurde stetig mit einem inversen Mikroskop kontrolliert. Die Trypsin-Reaktion wurde durch eine Verdünnung mit dem 10-fachen Zellkulturmedium-Volumen gestoppt und durch mehrfaches Auf- und Absaugen mit einer Pipette wurden die Zellen vereinzelt. Die entstandene Suspension wurde anschließend in der gewünschten Verdünnung mit zusätzlichem frischem Medium in neue Zellkulturschalen ausgesät.

Medien und Lösungen: PBS, 37 °C (s. 3.1.9)
 Trypsin-EDTA-Lösung, 37 °C (s. 3.1.9)
 verschiedene Zellkulturmedien, 37 °C (s. 3.1.7)

3.2.1.5 *Cryokonservierung von Zellen*

Die bis zu einer Dichte von 95% gewachsenen Zellen wurden von einer 10 cm-Zellkulturschale, wie unter Punkt 3.2.1.4 beschrieben, abgelöst und die Zellsuspension in der Zellzentrifuge Universal 32 für 5 min bei 600 x g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das gesamte Zellpellet in 1 ml 37°C-warmem Einfriermedium resuspendiert und in Einfrierröhrchen mit Schraubverschluss überführt. Das Einfrieren der Zellen erfolgte sofort in -80 °C für 24 Stunden. Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt.

Einfriermedium: 90% FCS
 10% DMSO

3.2.1.6 *Revitalisierung von Zellen*

Nach der Entnahme des Einfrierröhrchens aus dem Stickstofftank wurden die Zellen bei 37 °C fast vollständig aufgetaut, bis nur noch ein kleines Eisstückchen in dem Röhrchen zu sehen war. Die Zellsuspension wurde in ein 15-ml-Röhrchen überführt, mit dem 5-fachen Volumen DMEM, 10% FKS, 1% Pen/Strep aufgefüllt und 5 min bei 600 x g in der Zellzentrifuge Universal 32 sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das verbleibende Zellpellet in warmem Zellkulturmedium resuspendiert und die Suspension in Zellkulturschalen ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt, um tote Zellen, die den Einfrier-/Auftauprozess nicht überlebt hatten, zu entfernen.

3.2.1.7 *Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen*

Die Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, je vier in ein Loch einer 6-Loch-Schale, und bis zu einer Dichte von etwa 60% kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Fugene-Reagenz transient transfiziert. Hierzu lagen die zu transfizierenden cDNA-Konstrukte in dem Expressionsvektor pCDNA3.1 vor.

Für die Transfektion wurden 200 µl DMEM ohne Serum mit 6 µl Fugene und 1.5 µg DNA in einem 1.5 ml-Eppendorfgefäß gemischt und für mindestens 15 min bei RT stehen gelassen. Das lipophile Reagenz bildet mit der zu transfizierenden DNA einen Lipid-DNA-Komplex, der zu einer effizienten DNA-Aufnahme in die Zelle und anschließender Expression in dieser führen soll. Vor der Zugabe des Gemisches zu den Zellen in Kultur wurde das Zellkulturmedium noch einmal gewechselt. Das Transfektionsreagenz blieb für 48 Stunden auf den Zellen, die anschließend mit Methanol oder PFA fixiert (s. 3.2.1.8) und für Immunfluoreszenz-Färbungen eingesetzt wurden.

3.2.1.8 *Indirekte Immunfluoreszenz an Zellkulturzellen*

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz können Proteine in der Zelle lokalisiert werden. Alle beschriebenen Schritte erfolgten bei Raumtemperatur.

Die Zellen wurden auf runde Deckgläschen (Ø 13 mm) in 24-Loch-Platten oder in 6-Loch-Schalen ausgesät, so dass nach einer Wachstumszeit von ein bis drei Tagen ein semikonfluenter Zellrasen aus gut ausgebreiteten Zellen entstanden war. Diese Zellen wurden fixiert und mit Antikörpern markiert.

Vor der Fixierung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Methanol oder PFA fixiert. Nach der Fixation wurden die Zellen nochmals zweimal mit PBS gewaschen um das Fixativ zu entfernen und sofort mit Antikörpern markiert oder bei 4 °C in ausreichend PBS gelagert.

Methanol: 5 min mit eiskaltem Methanol bei -20 °C

PFA: 30 min bei Raumtemperatur mit 4% PFA in PBS

Die in PFA fixierten Zellen wurden erst 5 min mit 0.2% Saponin oder 0.1% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Anschließend folgte die Absättigung der freien Aldehydgruppen für 10 min mit 0.12% Glycin in PBS. Zwischen den Schritten wurde jeweils einmal mit PBS gewaschen.

Die in Methanol fixierten Zellen mussten nicht zusätzlich permeabilisiert werden, da dieses schon durch den Wasserentzug mit Methanol geschehen war.

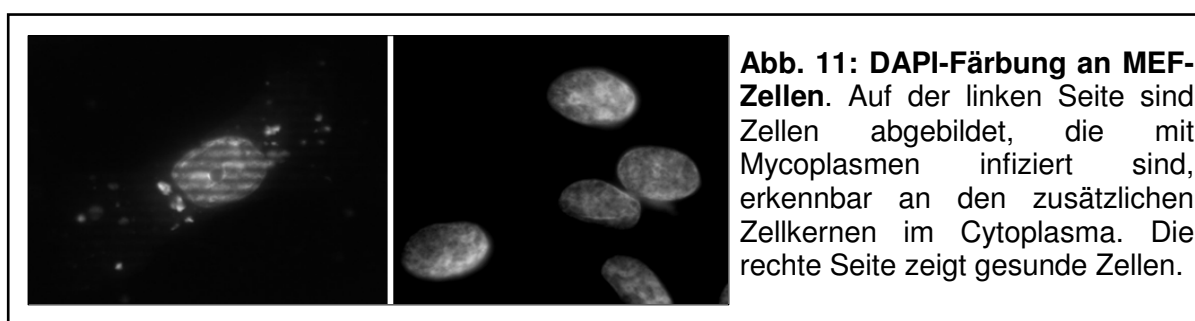
Um unspezifische Proteinbindungen zu verhindern, wurden die Zellen 15-30 min mit 3% BSA in PBS blockiert. Zur Bindung des Primärantikörpers (Verdünnung s. 3.1.10) wurden 20 µl der Antikörperverdünnung in 3% BSA auf Parafilm pipettiert und die Deckgläschen, mit der Zellseite zur Lösung gewandt, auf das Parafilm gelegt. Nach einer Inkubationszeit von 1-2 Stunden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (Verdünnung s. 3.1.11) wurde auf die gleiche Weise wie der Primärantikörper für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation musste unter Lichtausschluss stattfinden, um das Ausbleichen des lichtempfindlichen Fluoreszenzfarbstoffs zu verhindern. Vor der Einbettung der Zellen wurde dreimal mit PBS, einmal mit dest. H₂O gewaschen und die Deckgläschen kurz auf Zellstoffpapier abgetropft. Anschließend wurden die Zellen in einem Gemisch aus Mowiol, DABKO und DAPI eingebettet. DABKO enthält Antibleichmittel, Stabilisatoren und Signalverstärker, DAPI färbt den Zellkern und hilft damit bei der morphologischen Erkennung der Zellen. Die auf den Objektträgern fixierten Deckgläschen wurden bei 4 °C oder -20 °C im Dunkeln gelagert.

<u>Einbettungsmedium:</u>	17% Mowiol
	33% Glycerin
	50 mg/ml DABKO
	1 µg/ml DAPI in DMSO

3.2.1.9 *Mycoplasmandetektion und -behandlung*

Es wurde in regelmäßigen Abständen untersucht, ob die kultivierten Zellen mit Mycoplasmen infiziert waren. Die Detektion erfolgte auf zwei Wegen:

DAPI-Färbung – die Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und bei einer Dichte von 80% fixiert. Die fixierten Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und in einem Mowiol/DABKO-Gemisch, das 1 µg/ml DAPI enthielt, auf Objektträgern fixiert (s. 3.2.1.8). Waren zusätzlich zu den Zellkernen weite Bereiche des Cytoplasmas und zum Teil auch extrazelluläre Bereiche unregelmäßig angefärbt, wurde auf eine Infektion mit Mycoplasmen geschlossen (Abb. 11). Der Vorteil dieser Methode besteht in der einfachen Durchführung. Die Sensitivität des Verfahrens beschränkt sich aber auf ein relativ spätes Stadium der Infektion.



Nested PCR – Für einen genaueren Nachweis wurde ein Mycoplasmen-Test mit Hilfe einer Nested PCR durchgeführt, bei der in Anwesenheit von Mycoplasmen Fragmente mit einer Länge von 300-500 bp entstanden. Die Zellen wurden zwei Tage in serumfreiem Medium kultiviert, anschließend wurden dem Medium 2 µl entnommen und diese 1 min bei 95 °C im Thermoblock inkubiert. Danach wurden die Eppendorfgefäße mit dem Medium 1 min bei 4000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. 1 µl des Überstands wurde für die PCR verwendet. Bei jedem Versuch wurden eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle, bei der anstelle des Überstands 1 µl H₂O eingesetzt wurde, mitgeführt. Die hohe Sensitivität des Verfahrens ermöglichte eine sichere Detektion schon in frühen Infektionsstadien.

Bei einem Positivergebnis wurden die Zellen mit Ciprofloxacin in einer Endkonzentration von 10 µg/ml in DMEM, 10% FKS und 1% Pen/Strep behandelt. Da es sich bei Ciprofloxacin um eine lichtempfindliche Substanz handelt, wurde das

Medium alle drei Tage gewechselt. Die Behandlung wurde für einen Zeitraum von etwa drei Wochen fortgesetzt. Anschließend erfolgten ein DAPI- und PCR-Test. Konnten keine Mycoplasmen nachgewiesen werden, wurden die Zellen wieder auf normales Zellkulturmedium umgestellt und die Untersuchungen fortgesetzt.

3.2.1.10 **Fluoreszenzmarkierung von Cholesterol in embryonalen und adulten Zellen**

Bei dieser Methode lässt sich z.B. freies Cholesterol in der Zelle lokalisieren. Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Das Aussäen und Fixieren der Zellen auf Deckgläschen wurde in Punkt 3.2.1.8 beschrieben.

Freies Cholesterol wurde mit dem Antibiotikum Filipin nachgewiesen. Filipin gehört zu der Gruppe der makroliden Polyene und wird aus dem Bakterium *Streptomyces filipinensis* extrahiert (Abb. 12). Filipin bindet sehr spezifisch an freies Cholesterol, wobei ein blau-fluoreszierender Filipin-Cholesterol-Komplex entsteht. Verestertes Cholesterol wird nicht gebunden.

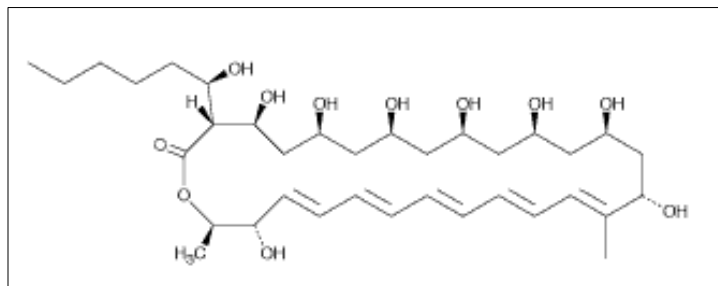


Abb. 12: Strukturformel von Filipin III. Filipin III ist ein makrolides Polyen, das aus dem Bakterium *Streptomyces filipinensis* extrahiert wird, und spezifisch an freies Cholesterol bindet.

Da es sich bei Filipin um eine licht- und sauerstoffempfindliche Substanz handelt, wurde die 100-fach konzentrierte Stammlösung in DMSO bei -20°C im Dunkeln in Stickstoffatmosphäre verwahrt. Die in 4% PFA-fixierten Zellen (s. 3.2.1.8) wurden in einer Filipinlösung (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in PBS eine Stunde unter sanftem Schütteln und Lichtausschluss inkubiert. Es schlossen sich zwei PBS- und drei H_2O -Waschgänge an, bevor die Deckgläschen mit einem Mowiol/DABKO-Gemisch (s. 3.2.1.8) auf Objektträgern fixiert wurden. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop mit den Filtern G365 und BP445/59, da Filipin III Licht der Wellenlänge 350 nm emittiert.

3.2.1.11 Internalisierungs-Experimente von Dextran, Transferrin und Lyso-trackern in embryonale Fibroblasten

Die Zellen wurden auf runde Deckgläschen (\varnothing 13 mm) in 24-Loch-Platten ausgesät und bis zu einer Dichte von 70% kultiviert.

a) Dextran-Internalisierung zum Nachweis von Endosomen/Lysosomen

Dextran ist ein β -1,6-Glucan mit einigen Glucoseseitenketten, die hauptsächlich über 1,3- aber teilweise auch durch 1,4- und 1,2-Bindungen mit der Hauptkette verbunden sind (Abb. 13). Dextran ist in Wasser gut löslich und wird über die Pinocytose, also ohne Rezeptorbindung, von den lebenden Zellen aufgenommen. Dort wird es nicht degradiert und ist durch die Kopplung mit Fluoreszenzmarkern in den Endosomen oder Lysosomen, je nach Dauer der Inkubationszeit (*Chase-Periode*), nachweisbar.

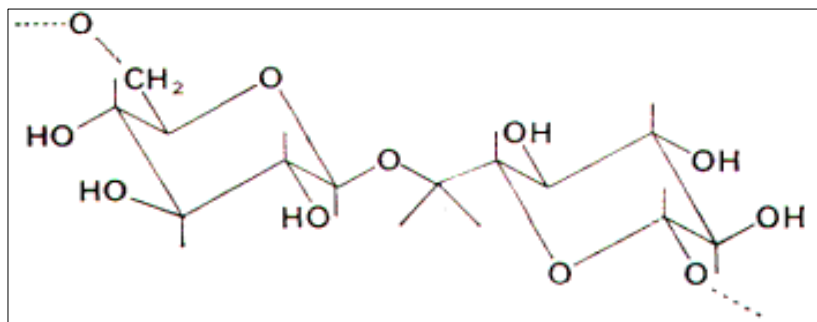


Abb. 13: Strukturformel von Dextran. Dextran ist ein β -1,6-Glucan, das ohne Membranpermeabilisierung in die Zelle internalisiert werden kann. Dort wird es in Endosomen oder Lysosomen transportiert. Durch die Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff kann es in der Zelle lokalisiert werden.

Die Zellen wurden dreimal mit DMEM/BSA gewaschen. Ein Tropfen der Dextran-Verdünnung (5 mg/ml) in DMEM/BSA wurde auf Parafilm getropft und das Deckgläschen mit der Zellseite zur Lösung gewandt auf Parafilm gelegt. Die Dextran-Internalisierung von lebenden Zellen erfolgte für 90 min (*Pulse*) bei 37°C im Brutschrank in einer feuchten, geschlossenen Kammer. Da das verwendete Dextran mit dem fluoreszierenden Farbstoff Texas-Red gekoppelt und lichtempfindlich ist, wurde die Inkubation auf dem Parafilm unter Lichtausschluss vorgenommen. Nach der Inkubation wurde das Medium abgesaugt, die Deckgläschen wieder in 24-Loch-Schalen transferiert und mit DMEM, 10% FKS und 1% Pen/Strep versehen. Die

Zellen wurden für bis zu 12 Stunden in diesem Zellkulturmedium kultiviert (*Chase*), damit das Dextran über die Endosomen bis in die Lysosomen gelangen konnte. Nach der *Chase*-Zeit wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in PFA fixiert. Danach erfolgte die Einbettung in Mowiol + DABKO + DAPI (s. 3.2.1.8). Zur Kontrolle wurde ein Deckgläschen direkt nach der Inkubation mit Dextran, also ohne eine *Chase*-Periode, in PFA fixiert und in Einbettungslösung (s. 3.2.1.8) auf einen Objektträger gelegt. Die Auswertung der Internalisierung erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop (s. 3.2.5).

DMEM/BSA: DMEM

1 mg/ml BSA

b) Transferrin-Internalisierung zum Nachweis der Endosomen

Das monomere Glycoprotein Transferrin ist das wichtigste Transportprotein für Eisen im Serum, das allen Zellen Eisen zur Verfügung stellt. Das an den Transferrin-Rezeptor – dieser wird in hohen Mengen an der Zelloberfläche exprimiert - gebundene Transferrin wird über Rezeptor-vermittelte Endocytose in die Zelle aufgenommen (Qian *et al.*, 2002).

Die lebenden Zellen wurden 15 min mit DMEM/BSA inkubiert. Anschließend erfolgte eine Markierung für 45 min mit 0.1 mg/ml Transferrin in DMEM/BSA in einer feuchten, geschlossenen Kammer in einem Tropfen auf Parafilm. Transferrin ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 594 gekoppelt und wurde daher ebenfalls unter Lichtausschluß inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium mit dem Transferrin abgesaugt und die Zellen auf den Deckgläschen in 24-Loch-Schalen zweimal mit PBS gewaschen. Die folgende *Chase*-Periode erfolgte für 4 Stunden mit DMEM, 10% FKS, 1% Pen/Strep Zellkulturmedium. Nach der *Chase*-Zeit wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in PFA fixiert. Danach erfolgte die Einbettung in Mowiol + DABKO + DAPI (s. 3.2.1.8). Zur Kontrolle wurde ein Deckgläschen direkt nach der Inkubation mit Transferrin, also ohne eine *Chase*-Periode, in PFA fixiert und in Einbettungslösung (s. 3.2.1.8) auf einen Objektträger gelegt. Die Auswertung der Internalisierung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

DMEM/BSA: DMEM

1 mg/ml BSA

c) LysoTracker-Internalisierung zum Nachweis der Lysosomen

Als Lysosomenmarker wurde neben verschiedenen Antikörpern der Fluorophor-gekoppelte basische Farbstoff *LysoTracker Red DND-99* verwendet. Der basische Farbstoff ist bei neutralem pH-Wert partiell protoniert. Das Prinzip der Färbung basiert auf der Azidität der Lysosomen, in denen der Farbstoff akkumuliert. Der genaue Mechanismus der Akkumulierung ist nicht geklärt, es wird eine Protonierung des Farbstoffes durch das saure Milieu angenommen (*Molecular Probes*, 2004). Der Farbstoff wurde bei -20°C im Dunkeln als 1 mM Stammlösung in DMSO gelagert. Zur Färbung wurden die Zellen einmal in serumfreien DMEM/BSA gewaschen und 30 min in DMEM/BSA mit 50 nM *LysoTracker Red* inkubiert. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation in Zellkulturmedium. Danach wurden die Zellen mit PFA fixiert (s. 3.2.1.8) und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

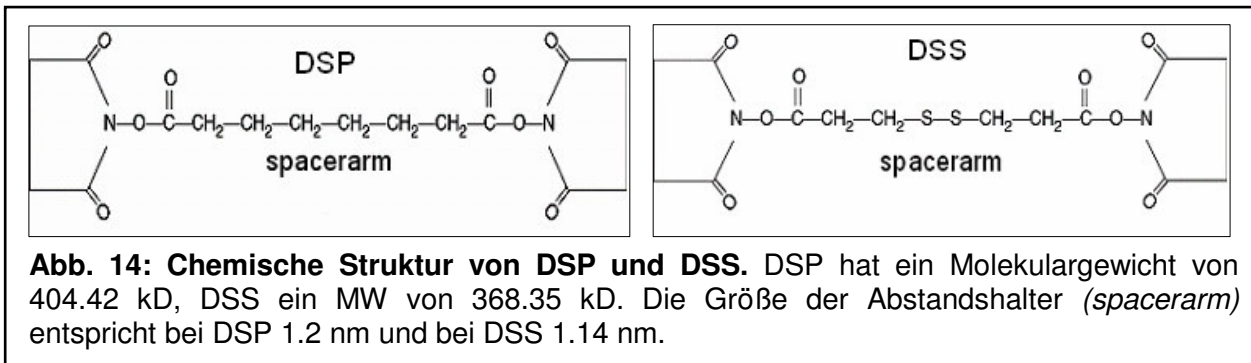
DMEM/BSA: DMEM

1 mg/ml BSA

3.2.1.12 Quervernetzung (Crosslink) von Proteinen an lebenden Zellen

Zur Quervernetzung der Proteine wurden DSS (*Disuccinimidylsuberate*) und DSP [*Dithiobis(succinimidylpropionat)*], auch *Lomant's Reagenz* genannt, genutzt. Die beiden *crosslinker* sind homobifunktional, haben also zwei gleiche Reaktionsseiten (Abb. 14). Die lipophilen Chemikalien werden als Stammlösung (15 mM) in DMSO gelöst. Sie können die Zellmembran passieren und primäre Amine in verschiedenen Proteinen binden. Die unterschiedlichen Proteine müssen sich in räumlicher Nähe zueinander befinden, da die Abstandshalter (*spacerarm*) zwischen den Protein-Bindungsstellen sehr kurz sind (DSS – 11.4\AA , DSP – 12\AA). Bei Interaktionspartnern ist diese Nähe in der Zelle Voraussetzung für das Zusammenspiel der jeweiligen Partner.

DSP ist spaltbar mit Reduktionsmitteln, wie z.B. DTT oder β -Mercapto-Ethanol, und kann daher als Kontrolle zu dem nicht-spaltbaren DSS gut eingesetzt werden.



Die Zellen wurden in 10 cm-Schalen bis zu einer Dichte von 100% kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen auf Eis dreimal mit kaltem EBSS/Hepes gewaschen. Die Quervernetzung der Proteine fand mit 0.6 mM DSS oder DSP in EBSS/Hepes für 30 min bei 37°C im Brutschrank statt. Nach dieser Reaktion wurden die Zellen auf Eis gestellt, das Medium mit dem Reagenz abgesaugt und die Zellen mit neuem, kaltem EBSS/Hepes versorgt, das 20 mM Ethanolamin zum Stoppen der Quervernetzungsreaktion enthielt. Die Stoppreaktion wurde für 15 min auf Eis durchgeführt und die Zellen danach dreimal mit EBSS/Hepes gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Medium nicht abgesaugt, sondern die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt und in 15-ml-Röhrchen 5 min bei 600 x g in der Zellzentrifuge Universal 32 sedimentiert. Das Pellet wurde in Lysispuffer resuspendiert und wie in Kapitel 3.2.2.3 beschrieben homogenisiert.

EBSS/Hepes: EBSS
 10 mM Hepes pH 7.0

3.2.2 Biochemische Methoden

3.2.2.1 *Herstellung von Homogenaten aus Mausgeweben und -organen für die SDS-PAGE*

Die Gewebe und Organe wurden einer kurz zuvor getöteten Maus entnommen und sofort auf Eis in kaltem 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Gewebe und Organe in Lysispuffer überführt und für 20 sec mit dem Xenox-Homogenisator auf Eis zerkleinert. Bei großen Organen, die nach dieser Zeit noch nicht ganz zerkleinert waren, wurde der Homogenisierungsschritt wiederholt. Zur vollständigen Isolierung sowohl der Membran- als auch der löslichen Proteine aus den Zellmembranen wurden die Homogenate für 10 min auf Trockeneis schockgefroren und bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt und die Homogenate auf Eis für 20 sec sonifiziert. Die Membranreste wurden 3 min bei 14000 rpm sedimentiert und der Protein-Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die Proteinlösung wurde 10-fach mit H₂O verdünnt und eine Proteinbestimmung durchgeführt.

Lysispuffer: TBS (s. 3.1.9)
0.05% Tween 20
1 mM EDTA
Complete EDTA-frei

3.2.2.2 *Isolierung von Blasenurothel für die SDS-PAGE*

(Methode modifiziert nach Wu *et al.*, 1990 und Hu *et al.*, 2000)

Für die Isolierung des Blasenurothels wurde die Blase nach dem Töten der Maus präpariert und mit einem Skalpell aufgeschnitten, um restlichen Urin abzulassen. Das Urothel wurde anschließend mit einem stumpfen Spatel vorsichtig von der Muskelschicht in Lysispuffer ohne Detergenzien auf Eis abgeschabt. Die Innenseite der ausgeschabten Blase wurde zusätzlich mit Lysispuffer abgespült, um alle Urothelreste in den Puffer zu überführen. Zur vollständigen Isolierung der

Membranproteine und löslichen Proteine wurde das Urothel für 10 min auf Trockeneis schockgefroren und bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt, die Membranreste 3 min bei 14000 rpm in der Tischzentrifuge sedimentiert und der Überstand in ein neues Gefäß pipettiert. Die Proteinlösung wurde 10-fach mit H₂O verdünnt und eine Proteinbestimmung durchgeführt.

Urothel-Lysispuffer: 10 mM Hepes
1 mM EDTA
Complete EDTA-frei

3.2.2.3 Herstellung von Homogenaten aus Zellkulturzellen für die SDS-PAGE

Zellen einer konfluent gewachsenen 6 oder 10 cm Zellkulturschale wurden einmal mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA abgelöst und 5 min bei 600 x g in der Zellzentrifuge Universal 32 sedimentiert. Das Pellet wurde je nach Größe in 50-400 µl Lysispuffer aufgenommen, zur Lyse für 10 min auf Trockeneis eingefroren und anschließend im 37°C-Wasserbad wieder aufgetaut. Dieser Zyklus wurde dreimal wiederholt und die Homogenate auf Eis für 10 sec sonifiziert. Die Membranreste wurden 3 min bei 14000 rpm in der Tischzentrifuge sedimentiert, der Protein-Überstand abgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt.

Lysispuffer: TBS (s. 3.1.9)
0.1% Triton X-100
1 mM EDTA
Complete EDTA-frei

3.2.2.4 Immunpräzipitation (IP) von Proteinen aus Zell-Lysaten

Die verschiedenen Zell-Lysate (s. 3.2.2.1 – 3) wurden für zwei Stunden bei 4°C mit G-Sepharose vorinkubiert, um Proteine, die unspezifisch an die Sepharose binden, herauszufiltern. Die Sepharose wurde in der Tischzentrifuge 3 min bei 14000 rpm sedimentiert und das Zell-Lysat in ein neues Gefäß überführt. Zu dem Lysat wurden 2-5 µl Primärantikörper gegeben und für zwei Stunden oder über Nacht bei 4°C auf dem Rundumschüttler inkubiert. Danach wurden 30 µl Protein G-Sepharose in Lösung zugegeben und für weitere 2 Stunden bei 4°C auf dem Rundumschüttler inkubiert. Diesen Inkubationen schloss sich eine Zentrifugation an (3 min, RT, 14000 rpm, Tischzentrifuge). Der Überstand wurde abgenommen und die Protein G-Sepharose mit den gebundenen Antikörpern in 500 µl Waschpuffer zweimal gewaschen. Zwischen den Arbeitsschritten wurde die Sepharose immer wieder sedimentiert (3 min, RT, 14000 rpm, Tischzentrifuge). Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand sehr sorgfältig abgenommen. Das Sepharose-Pellet mit dem gebundenen Protein wurde in 2 x Solubilisierungspuffer (s. 3.2.2.7) aufgenommen und 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine über die SDS-PAGE für weitere Analysen aufgetrennt.

Waschpuffer: 1 x TBS (s. 3.1.9)
0.1% Tween 20

3.2.2.5 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinmengen wurden mit Hilfe des *BCA Protein Assay Reagent Kits* bestimmt, was auf der Reduktion von Kupfer²⁺ zu Kupfer¹⁺ durch Proteine basiert (*Biuret-Reaktion*). Dabei wurden die Hersteller-Reagenzien A (Pufferlösung mit verschiedenen Salzkonzentrationen, Herstellergeheimnis) und B (Kupferlösung, Herstellergeheimnis) im Verhältnis 50:1 gemischt und 200 µl dieser Lösung für 30 min bei 37°C mit einer spezifischen µl-Menge Proteinlösung in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte inkubiert. Als Standard wurde eine Konzentrationsreihe (5, 10, 15 und 20 µg) mit BSA hergestellt. Die Auswertung erfolgte in einem Mikrotiterplattenleser von Tecan.

3.2.2.6 **Aktivitätsbestimmungen der lysosomalen Hydrolase β -Hexosaminidase in Homogenaten aus dem Nervus ischiadicus**

Zur Bestimmung der Aktivität der lysosomalen Hydrolase β -Hexosaminidase wurden die Homogenate aus dem Nervus ischiadicus hergestellt (s. 3.2.2.1) und die Proteinkonzentration wurde bestimmt. Anschließend wurden 15 μ l des Homogenats mit 100 μ l Substratpuffer und 10 mM Substrat (*p*-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside) über Nacht für etwa 14 Stunden im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit Stopplösung beendet und die Extinktion bei 405 nm im Photometer gemessen. Die Proben wurden immer als Doppelwerte angesetzt und gemessen. Als Kontrollen wurden Enzym-Leerwerte (Homogenat + Substratpuffer) und Substrat-Leerwerte (Substrat + Substratpuffer + H₂O) mitgeführt.

Substratpuffer: 0.1 M Natrium-Citrat pH 4.6
0.2% (w/v) BSA

Stopplösung: 0.4 M Glycin pH 10.4

Berechnung der spezifischen Aktivität der β -Hexosaminidase:

$$\Delta E \times F = \text{mU/ml}$$

$$F = \frac{V_{\text{Gesamt}} (\mu\text{l})}{18.5 \times V_{\text{Homogenat}} (\text{ml}) \times \text{Inkubationszeit} (\text{min})}$$

3.2.2.7 **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in denaturierenden Polyacrylamidgelen (PAGE) erfolgte im diskontinuierlichen Gelsystem nach Laemmli (1970) in der Mini-Protean-Elektrophoresekammer oder einer großen Gelkammer von BioRad. In der großen Gelkammer konnte bedingt durch die Größe und variablen Dicke des SDS-Gels die 4-fache Proteinmenge aufgetrennt werden. Die 1.5 mm dicken Trenngele waren 7-15%ig und wurden bei konstanten Voltstärken

gefahren. Je nach Art des Experiments wurden die Proteine in reduzierendem oder nicht-reduzierendem 2 x Solubilisierungspuffer aufgenommen, vor dem Auftragen 5 min bei 95°C denaturiert und 3 min bei 14000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Eine Ausnahme bildeten hierbei die Proteine des Urothels, die sogenannten Uroplakine, die nicht durch Aufkochen denaturiert wurden, da manche Uroplakine beim Kochen zum Aggregieren neigen.

Laufpuffer: 25 mM Tris/HCl pH 7.5
200 mM Glycin
3.5 mM SDS

2x-Solubilisierungspuffer: 20% Glycin
4.5% SDS
125mM Tris/HCl pH 6.8
1 Spatelspitze Bromphenolblau

reduzierend: 10% β -Mercaptoethanol

Proteinstandard: Precision Plus ProteinTM Standard (BioRad, München). Protein-Standard-Größen –
10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 und 250 kD

3.2.2.8 Coomassie-Färbung

Im Anschluss an die Trennung der Proteine durch die SDS-PAGE erfolgte teilweise eine Färbung des Gels mit Coomassie-Färbelösung für 1-2 Stunden. Der unspezifisch gefärbte Hintergrund wurde anschließend durch das Waschen mit Entfärberlösung entfernt.

Coomassie-Färbelösung: 50% Methanol
7% Essigsäure
0.18% Coomassie Brilliant Blue R 250

Entfärberlösung: 40% Methanol
7% Essigsäure
3% Glycerin

3.2.2.9 Silberfärbung nach Blum (Blum et al., 1987)

Bei sehr geringen Proteinmengen im SDS-Gel wurde eine Silberfärbung durchgeführt, die bereits Proteinmengen im ng-Bereich anfärbt. Diese Färbung kann auch im Anschluss an eine Coomassie-Färbung durchgeführt werden, wenn das SDS-Gel gut vom Coomassie entfärbt wird.

Bei der Silberfärbung wurde das SDS-Gel eine Stunde fixiert und dreimal für 20 min in Ethanol gewaschen. Zur Reduzierung der Hintergrundfärbung erfolgte für 1 min eine Inkubation mit 0.02% Natriumthiosulfat. Diese beruht darauf, dass Natriumthiosulfat lösliche Protein-Komplexe bindet, die sonst wahllos Komplexe mit Silber bilden. Dadurch werden unlösliche Präzipitate auf den Acrylamidgelen verhindert. Die Reduzierung wurde durch dreimaliges Waschen für 20 sec mit Wasser beendet und das Gel 20 min mit Silbernitrat inkubiert. Zur Verringerung der Hintergrundfärbung wurde nach der Silbernitrat-Behandlung zweimal für 20 sec mit Wasser gewaschen und die Banden entwickelt. Waren die Banden gut sichtbar, wurde die Reaktion 10 min in Stopplösung beendet und das Gel mehrmals mit Wasser gewaschen.

Fixierer: 40% Ethanol
10% HAc

Waschlösung: 30% Ethanol

Entwickler: 3% Na₂CO₃
250 µl Formaldehyd

Stopplösung: 0.1% Glycin

3.2.2.10 *Trocknen von gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen*

Das Trocknen der SDS-Gele erfolgte in Cellophanfolien mit dem Gel-Luft-Trockner (s. 3.1.1). Vor dem Trocknen wurden die Gele für mindestens 5 min gewässert, zwischen zwei Cellophanfolien gelegt und für 3 Stunden unter heißer Luftzufuhr getrocknet.

3.2.2.11 *Westernblot (Transfer von Proteinen auf Membranen)*

Der Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen aus 10-15%igen Gelen auf PVDF-Membranen erfolgte mittels einer *Semi-Dry-Blot*-Apparatur. Das SDS-Gel wurde kurz in Transferpuffer equilibriert und blasenfrei auf die mit Methanol aktivierte PVDF-Membran gelegt. Beiderseits wurden zwei Lagen Whatman-Papier der Stärke 1.5 mm hinzugefügt. Die Proteine wurden für 45-70 min bei 20 Volt transferiert.

Der Transfer von großen Proteinen, die in 7%igen Gelen aufgetrennt wurden, auf die PVDF-Membran erfolgte in der Nass-Blot-Apparatur von BioRad. Dabei wurde das SDS-Gel unter Transferpuffer blasenfrei auf die Membran zwischen je eine Lage Whatman-Papier (1.5 mm) und je einen Schwammfilter gelegt und in der Transferlösung über Nacht bei 15 Volt transferiert. Zur Transferkontrolle wurden die SDS-Gele nach dem Transfer mit Coomassie gefärbt.

Transferlösung: 192 mM Glycin
 25 mM Tris/HCl pH 8.5
 10% (v/v) Methanol

3.2.2.12 *Immunodetektion von Proteinen auf Membranen*

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde diese dreimal 20min mit 3% Magermilchpulver in TN-T gelegt, um die direkte Bindung von Antikörpern an die Membran zu verhindern. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte in einem 50 ml-Röhrchen für 2 Stunden bei 37°C oder über Nacht bei 4°C auf einem Rundumschüttler bei 6 rpm. Die Antikörper wurden in 3% Magermilchpulver verdünnt

(s.3.1.10) und für eine Proteinmarkierung wurden 3 ml der Verdünnung eingesetzt. Die Membran wurde danach dreimal 20 min mit TN-T gewaschen und für eine Stunde mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung s. 3.1.11) bei Raumtemperatur im 50 ml-Röhrchen mit einem Volumen von 3 ml auf einem Rundumschüttler inkubiert. Vor der Detektion mit dem *ECL-Advanced-Kit* wurde die Membran dreimal 20 min mit TN-T gewaschen und anschließend 750 µl der *ECL*-Lösung für 30 sec auf die Membran pipettiert, die dazu auf einer Glasplatte platziert wurde. Die Auswertung erfolgte über die Chemilumineszenzkamera LAS-1000 mit dem Programm AIDA Version 3.21.

Blockierungslösung: TN-T (s. 3.1.11)
 3% Magermilchpulver

3.2.2.13 *Ponceau S-Färbung der Westernblot Membran*

Nach der Antikörpermarkierung des Blots (s. 3.2.2.12) und der Auswertung wurde der Blot mit Ponceau S angefärbt, um zum einen den Transfer und zum anderen die gleichmäßige Beladung der einzelnen Proteinmengen zu kontrollieren. Der Farbstoff wurde für 10 min auf den Blot aufgetragen und bei RT stehen gelassen. Anschließend wurde der durch Ponceau S unspezifisch angefärbte Hintergrund mit destilliertem Wasser abgespült und der Blot bei RT getrocknet.

Ponceau S: 0.5% Ponceau S
 1% HAc

3.2.2.14 *Freiwaschen der PVDF-Membranen von Antikörpern*

Durch effektives *Strippen* von Westernblot-Membranen können unterschiedliche Proteine nacheinander bei unveränderter Proteinmenge auf einer Membran detektiert werden. War die Membran bereits getrocknet, wurde sie erst 5 min in Methanol equilibriert und anschließend zweimal 15 min in *Stripping*-Puffer bei 70°C von Antikörpern freigewaschen. Um alle Reste des *Stripping*-Puffers zu entfernen, wurde

die Membran mindestens 1 Stunde unter kontinuierlicher Bewegung in TN-T (s. 3.1.11) gewaschen. Dabei wurde der Puffer mehrfach gewechselt.

Stripping-Puffer: 62.5 mM Tris pH 6.8
2% SDS
100 mM β -Mercapto-Ethanol

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1 *Isolierung genomischer DNA aus Mausgewebe (Schwanzbiopsien)*

Den Mäusen wurden 0.5 cm der Schwanzspitze mit einer scharfen Schere abgeschnitten und die enthaltene DNA mit dem *Invisorb Spin Tissue Kit* isoliert. Dabei wurden die Schwanzspitzen mit 400 μ l Lysispuffer G und 40 μ l Proteinase K für zwei Stunden bei 52°C vollständig verdaut. Die nicht verdaubaren Knochen und Haare wurden abzentrifugiert und der Überstand mit 200 μ l *Binding Puffer T* (Zusammensetzung ist Herstellergeheimnis) gevortext. Das Gemisch wurde auf kleine Säulen verteilt und 2 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Die Säulen wurden zweimal mit 550 μ l Waschpuffer gewaschen und Ethanolreste durch weiteres Zentrifugieren entfernt. Die Elution der DNA erfolgte mit 50 μ l, 52°C warmem Hersteller-Elutionspuffer und durch anschließendes Zentrifugieren der DNA. Die isolierte genomische DNA wurde bei 4°C gelagert.

3.2.3.2 *Konzentrationsbestimmung von DNA*

Die isolierte DNA wurde photometrisch bei 260 nm gegen H₂O in einer 10 mm Quarzküvette gemessen. Die OD₂₆₀ = 1 entspricht einer Konzentration von 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA.

3.2.3.3 DNA-Amplifikation über die Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten Reaktion (PCR) ist eine Methode, mit der definierte DNA-Bereiche amplifiziert werden können.

Die PCR basiert auf drei Schritten, die für die Synthese der DNA notwendig sind:

1. Denaturierung der Ausgangs-DNA (*Template*) in Einzelstränge
2. Bindung von Oligonukleotidprimern an beide Einzelstränge (*Annealing*)
3. Synthese der DNA durch die Polymerase ausgehend von den gebundenen Primern (*Extension*)

PCR-Ansatz: dNTP-Mix – je 2 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP

10 x Puffer – 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂,

100 mM Tris/HCl pH 9.0

Taq-Polymerase – 5 U/μl von Roche

3.2.3.4 Genotypisierung der Mäuse durch den Nachweis von *Limp-2* DNA per PCR

Bei dieser PCR wurden Primer verwendet, die sich direkt vor und hinter dem Exon 8 (im Intron-Bereich) des *Limp-2*-Gens befinden, da die eingebaute Neomycin-Kassette von 1200 bp im Exon 8 (120 bp) liegt. Bei den *Limp-2*-defizienten Mäusen wird in dieser PCR ein Fragment von 1320 bp amplifiziert, während bei *Limp-2* homozygoten Wildtyp-Mäusen ein 120 bp Fragment und bei *Limp-2* heterozygoten Mäusen zusätzlich zu dem 120 bp Fragment das 1320 bp große Fragment mit der Neomycin-Kassette amplifiziert wird.

1 x PCR-Ansatz: 1.5 µg DNA
 1 µl Primer Li2-5'-Intron 7 (s.3.1.6)
 1 µl Primer Li2-3'-Intron 8 (s.3.1.6)
 5 µl Puffer
 5 µl dNTP Mix
 0.5 µl Taq-Polymerase
 mit H₂O auf 50 µl Gesamtvolumen auffüllen

PCR-Programm:

15 sec	95°C Denaturierung	} 30 Cyclen
30 sec	55°C Annealing	
2 min	72°C Extension	

30 µl jedes PCR-Ansatzes wurden mit Auftragspuffer gemischt und auf ein 2% Agarosegel aufgetragen.

3.2.3.5 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurden Agarosegele verwendet. Die für die Gele benutzte Konzentration an Agarose richtete sich nach der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente.

Agarosekonzentration (%)	Trennbereich (kb)
1	0.5 – 7
1.5	0.2 – 4
2	0.1 – 3

Die erforderliche Agarosemenge wurde in 300 ml 1x TAE in der Mikrowelle aufgekocht und nach dem Abkühlen auf 55°C mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0.5 µg/ml versetzt. Die Agarose wurde in eine Gelform gegossen und bei RT abgekühlt. Das erstarrte Gel wurde in die Elektrophoresekammer überführt, die Proben mit 1 x Auftragspuffer versetzt und in die vorgeformten Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei konstanter

Spannung von 140 V durchgeführt. Durch das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht als Banden sichtbar und das Gel konnte auf dem UV-Transilluminator mit einem Videosystem aufgenommen werden. Anschließend wurde das Bild per Ausdruck auf Thermopapier dokumentiert.

TAE: 40 mM Tris/HCl pH 8.0
25 mM EDTA

3.2.4 Histologische Methoden

3.2.4.1 *Perfusion von Mäusen*

Die benötigten Versuchsmäuse wurden mit 100 µl/10 g Körpergewicht Tribromethanol (TBE) intraperitoneal anästhesiert. Nach dem Testen der Reflexe am Hinterlauf und den Augen wurden die Tiere vom Bauch bis zum Thorax aufgeschnitten und das Herz mittels Aufschneiden der Rippen an beiden Seiten des Sternums freigelegt. Der rechte Vorhof des Herzens wurde eröffnet und die Injektionsnadel in die linke Herzkammer gesetzt. Die Perfusion, die künstliche Durchströmung der Körpergefäße, wurde mit der Schlauchpumpe Ecoline VC-280 durchgeführt, welche über zwei Pumpenrollen mit konstantem Druck die Flüssigkeit in die Gewebe abgibt. Aufgrund des Einsetzens der Pumpe war der Flüssigkeitstransfer stets präzise und dadurch reproduzierbar. Durch die anfängliche Perfusion mit 60 ml PBS/Prokain, einem lokalen Anästhetikum (Dudel *et al.*, 1999), wurde das gesamte Blut aus Geweben und Organen gespült, um eine Thrombose zu vermeiden. Direkt danach wurde das Tier mit 80-100 ml ¼ Bouin/PBS oder 4% PFA/PBS fixiert. Der Perfusionsdruck betrug dabei konstant 12-14 ml/min. Nach der Fixierung wurde den Tieren das Fell abpräpariert, die benötigten Gewebe und Organe entnommen und über Nacht in ¼ Bouin/PBS oder 2% PFA/PBS in Glasgefäßen nachfixiert.

PBS/Prokain: PBS (s. 3.1.9)
1 g Prokain/100 ml PBS

<u>PFA:</u>	4% PFA in PBS, pH 7.4	
<u>¼ Bouin-PBS:</u>	18% Pikrinsäure	} pH 2.5
	6% Formalin	
	1.2% Eisessig	
	74.8% PBS	

Zur elektronenmikroskopischen Analyse der Mäuse wurde die Perfusion mit 60 ml PBS/Prokain und anschließend mit 60-80 ml 6% Glutaraldehyd (GA) durchgeführt. Die Nachfixierung der Tiere erfolgte in 3% GA über Nacht.

3.2.4.2 Einbettung der Gewebe in Paraffin

Zur Einbettung der fixierten Gewebe wurden diese in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, wobei jede Alkoholkonzentration zweimal 30 min - 2 h mit den fixierten Geweben unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert wurde:

2 x 50% EtOH, 2 x 70% EtOH, 2 x 80% EtOH,
2 x 90% EtOH, 2 x 100% EtOH, 2 x Methylbenzoat

Der letzte Entwässerungsschritt in Methylbenzoat erfolgte so lange, bis die Gewebe nicht mehr auf der Lösung schwammen, sondern sich so mit Methylbenzoat vollgesogen hatten, dass sie absanken.

Damit die Gewebe ausreichend Paraffin aufnehmen konnten, wurden sie über Nacht in flüssigem Paraffin bei 56°C inkubiert. Das Paraffin wurde noch einmal gewechselt, um alle Reste des Methylbenzoats zu entfernen, und anschließend zwei Stunden gewartet, damit das Paraffin wieder vollständig flüssig wurde. Um spätere Luftblasen im Paraffinblock zu vermeiden, wurde der Ofen mit den Geweben in Paraffin für mindestens vier Stunden einem Unterdruck ausgesetzt. Danach war das Paraffin vollständig blasenfrei, die Gewebe wurden in kleine Blöcke positioniert und mit Paraffin aufgegossen. Die Aushärtung des Paraffins erfolgte über Nacht.

3.2.4.3 Erzeugung der Paraffinschnitte

Die Paraffinblöcke mit den Geweben wurden auf Holzwürfel aufgeblockt. Dazu wurde das Paraffin mit einem breiten heißen Spatel vorsichtig erhitzt, damit es an der Unterseite etwas schmolz. Anschließend wurde der Paraffinblock auf das Holz gedrückt. Das Paraffin härtete sehr schnell wieder aus und blieb auf dem Holz haften.

Der Holzwürfel wurde in die dafür vorgesehene Halterung am Mikrotom eingeschraubt und an der Klinge ausgerichtet. Die anfänglichen Schnitte waren 40 µm dick, bis das Gewebe an der erwünschten Stelle angeschnitten war. Danach wurde das Mikrotom auf 7 µm Dicke umgestellt und die Schnitte wurden auf einen mit einem Wassertropfen versehenen Superfrost-Objektträger gelegt. Damit sich die Schnitte auf dem Objektträger ausbreiten konnten, wurden sie für mehrere Stunden auf 40 °C warmen Strecktischen platziert. Durch das Verdampfen des Wassers senkten sich die Schnitte auf die Objektträger ab und wurden anschließend über Nacht in einem Brutschrank bei 40 °C noch weiter getrocknet.

3.2.4.4 Deparaffinierung der Gewebe

Für weitere Färbungen der Paraffinschnitte mussten die geschnittenen Gewebe von Paraffin befreit werden. Dazu wurden die Objektträger in Schlitten sortiert und in Färbetrogen in absteigender Alkoholreihe deparaffiniert. Der Schlitten mit den Objektträgern wurde alle 5 min von einem Färbetrog in den nächsten umgesetzt:

2 x Xylol, 2 x 100% EtOH, 2 x 90% EtOH, 2 x 70% EtOH

Anschließend wurden die Schnitte auf den Objektträgern in PBS gewaschen und für Hämalaun-Eosin- (s. 3.2.4.5) und Immunfluoreszenz-Färbungen (s. 3.2.4.6) eingesetzt.

3.2.4.5 Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Zur Identifizierung der Histologie in den Paraffinschnitten und Erkennung der Lage des jeweiligen geschnittenen Objektes wurden diese zunächst deparaffiniert (s. 3.2.4.4). Danach erfolgte die Kernfärbung für 7 min mit Hämalaun nach Meyer. Die Gewebe wurden in H₂O gespült und mit HCl/Ethanol für 5 sec differenziert. Danach wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten 10-15 min unter fließendem Leitungswasser gewässert und nochmals in dest. H₂O gewaschen. Die Gewebefärbung erfolgte für 5-10 min mit Eosin. Die Gewebe wurden dann in dest. H₂O gewaschen, 5 sec in 80% EtOH differenziert und mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert:

2 x 90% EtOH, 2 x 100% EtOH, 2 x Xylol

Um die Schnitte unter dem Mikroskop beurteilen zu können, wurden sie nach dem Entwässern mit Mowiol betropft und ein großes Deckgläschen wurde auf die Objekte gelegt. Mowiol musste über Nacht bei 4 °C aushärten.

3.2.4.6 Indirekte Immunfluoreszenz an Paraffinschnitten

Die Paraffinschnitte wurden deparaffiniert (s. 3.2.4.4) und 5 min in PBS gewaschen. Zur Inaktivierung der internen Peroxidase wurden die Objekte für 30 min mit 3% H₂O₂ in Methanol inkubiert und nochmals mit PBS gewaschen.

Da sich auf einem Objektträger mehrere Schnitte des gleichen Organs befanden und unterschiedliche Primärantikörper zur Detektion eingesetzt wurden, mussten die Schnitte mittels eines DAKO-Stifts getrennt werden. Der DAKO-Stift enthält eine hydrophobe Flüssigkeit, die das Vermischen der Primärantikörper untereinander verhindert. Um unspezifische Proteinbindungen zu vermeiden, wurden die Zellen mindestens 30 min mit 0.75% BSA in PBS blockiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für 1-2 Stunden in einer feuchten, geschlossenen Kammer, wobei ein Tropfen von 20 µl der Antikörperverdünnung in 0.75% BSA (s. 3.1.10) auf die Gewebeschnitte getropft wurde. Anschließend wurden die Schnitte viermal mit PBS gewaschen und auf Zellstoff abgetropft. Die Inkubation mit dem

Sekundärantikörper (Verdünnung s. 3.1.11) erfolgte ebenfalls in der feuchten Kammer für eine Stunde bei RT, wobei diese mit Aluminiumfolie vor Lichteinfall geschützt wurde. Danach wurden die Schnitte dreimal mit PBS und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen und wieder auf Zellstoff abgetropft. Auf jeden Schnitt wurde ein Tropfen der Einbettungslösung (s. 3.2.1.8) gegeben und mit Deckgläschen, die den ganzen Objektträger abdeckten, verschlossen. Die Lagerung der fluoreszenzmarkierten Schnitte erfolgte bei 4 °C oder -20 °C im Dunkeln.

3.2.5 Mikroskopie

Zur Auswertung der fluoreszenzgefärbten Zellen wurde das Axiovert 200M-Mikroskop verwendet, das mit der Axio Vision 4.1 Software bedient wurde. Die Bilder wurden mit dem Axio Vision Viewer LE Rel. 4.1 in ein durch Adobe Photoshop lesbares Format exportiert und bearbeitet.

Die Betrachtung der verschiedenen Färbungen erfolgte mit folgenden Filtern:

G365 und BP445/59	DAPI- und A350-Fluoreszenz
BP485/20 und BP515-565	GFP- und A488-Fluoreszenz
BP565/30 und BP620/60	A594- und Texas Red-Fluoreszenz

Bei Detektionen mit zwei unterschiedlichen Primärantikörpern und damit auch zwei verschiedenen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern erfolgte die Auswertung zusätzlich mit dem Apotom.

Das Apotom berechnet computerbasiert optische Schnitte durch die Präparate, mit denen Kollokalisationsstudien durchgeführt werden können. Bei dieser Technologie wird das Prinzip der ‚Streifenprojektion‘ umgesetzt, indem eine Gitterstruktur von definierter Gitterstreifenbreite mit Hilfe eines Apotomschiebers in die Ebene der Leuchtfeldblende des Auflichtstrahlengangs des Mikroskops eingebracht wird. Die Ebene der Leuchtfeldblende ist konjugiert zu der Fokusebene, so dass bei dem Blick durch die Okulare das Gitter überlagert mit der Probe gesehen werden kann. Über einen Scanning-Mechanismus im Apotomschieber wird die Gitterstruktur in der Präparatebene in drei definierten Schritten verschoben, wobei an jeder Gitterposition ein digitales Bild aufgenommen wird. Die drei Rohbilder werden von dem Computer

zu einem Ergebnisbild verrechnet. Das berechnete Bild stellt einen optischen Schnitt durch die Probe dar.

3.2.6 Maushaltung

Die Limp-2 defizienten Mäuse und die Wildtyp-Mäuse wurden unter konventionellen Bedingungen gehalten. Die Temperatur in den Mausräumen betrug 19-21°C, die Luftfeuchtigkeit 45-60%. Es wurde ein Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden (6-18 Uhr) Helligkeit und 12 Stunden Dunkelheit eingehalten.

3.2.7 Hörmessungen

Die Hörmessungen an Wildtyp-Tieren und Limp-2 Knock-out-Tieren wurden in Kooperation mit M. Knipper am Hörzentrum der Universität Tübingen durchgeführt. Die Tiere wurden vor den Hörmessungen anästhesiert und die Messungen der *auditory brain stem responses* (ABR) und Distorsionsprodukte otoakustischer Emissionen (DPOAE) wurden nach Knipper *et al.* (2000) und Schimmang *et al.* (2003) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Nachweis der Limp-2 Defizienz

Die gesamte hier vorliegende Arbeit basiert auf der Defizienz von Limp-2 im Mausstamm *Eli II 24*, der einen gemischten genetischen Hintergrund aus *C57 Bl/6J* und *129 Sv/J* repräsentiert (s. 3.1.8). Als Kontrolle zu den Limp-2 defizienten Tieren wurden Tiere aus dem CD 53 S-Mausstamm eingesetzt, die ebenfalls einen gemischten genetischen Hintergrund haben, der identisch mit dem der Limp-2 Knock-out-Mäuse ist (s. 3.1.8). Dabei wurde beachtet, dass die zu untersuchenden Limp-2 Knock-out-Mäuse und Wildtyp-Mäuse gleichen Alters und Geschlechts waren. Die Mäuse wurden unter konventioneller Haltung gezüchtet (s. 3.2.6).

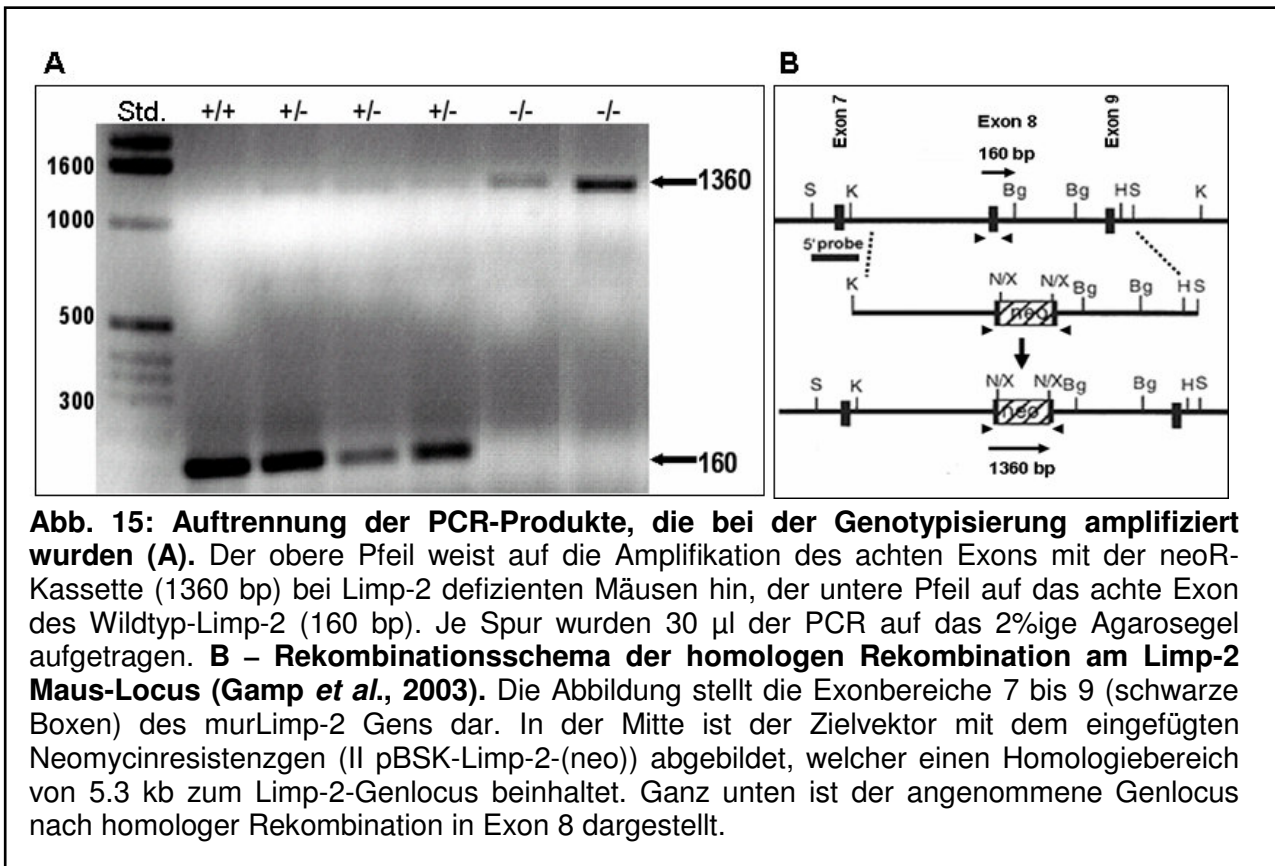
Mittels PCR:

Das murine Limp-2 (murLimp-2) Gen wurde in Vorarbeiten mittels homologer Rekombination ausgeschaltet. Diese Methode beinhaltete die Integration einer exogenen DNA-Sequenz in den offenen Leserahmen des achten Exons im murLimp-2 Gen. Die integrierte DNA-Sequenz ist mit einem Neomycinresistenzgen (neoR) als Selektionsmarker versehen. Aufgrund der Neomycin-DNA-Kassette und der darin enthaltenen Stoppsignale sollte keine vollständige Limp-2 mRNA im Cytoplasma vorliegen und somit auch kein Limp-2 Protein translatiert werden.

Bei der hier verwendeten PCR-Methode wurden Oligonukleotid-Primer verwendet, die direkt vor (5') und hinter (3') dem Exon 8, also im Intron 7 und 8 des Limp-2 Gens liegen (s. Abb. 16 A).

Das eingebaute transgene Konstrukt mit dem neoR hat eine Länge von 1200 bp. Der mitamplifizierte Genbereich des Exon 8 hat eine Größe von 160 bp. Bei den Limp-2 defizienten Mäusen wird in dieser PCR ein Fragment von 1360 bp amplifiziert, während bei Limp-2 +/- heterozygoten Mäusen zusätzlich zu dem 1360 bp großen Fragment mit dem neoR das kleinere 160 bp große Fragment des achten Wildtyp-Exons amplifiziert wird. Bei Limp-2 +/+ homozygoten Mäusen wird nur das Exon 8-Fragment (160 bp) amplifiziert. Abbildung 15 stellt das Ergebnis der PCR dar, die

zum Genotypisieren der Mäuse verwendet wurde. Von verschiedenen Mäusen wurden die Schwanzspitzen zur Präparation der DNA eingesetzt (s. 3.2.3.1).



Mittels Immunfluoreszenz:

Die während dieser Arbeit hergestellten embryonalen und adulten Fibroblasten (s. 3.2.1.1) wurden für verschiedene Experimente eingesetzt und zunächst mittels indirekter Immunfluoreszenz (s. 3.2.1.8) auf ihre Limp-2 Expression überprüft.

Dazu wurden die Zellen mit einem gegen den Carboxyterminus von Limp-2 gerichteten Antikörper inkubiert (Abb. 16). In den Kontrollzellen ist Limp-2 bei einigen Zellen verstärkt um den Zellkern lokalisiert, bei anderen gleichmäßig im Zytoplasma in kleinen vesikulären Strukturen verteilt. Die Vesikel stellen vermutlich späte Endosomen und Lysosomen dar (Abb. 16 A, C und E). Bis auf ein schwaches Hintergrundsignal in den Limp-2 defizienten MEFs und Schwanzfibroblasten (Abb. 16 B und D), erzeugt durch den Zweitantikörper (nicht gezeigt), sind in den Knock-out-Fibroblasten der Cornea unspezifische Strukturen angefärbt, die vermutlich

Mikrotubuli darstellen. Es sind jedoch keinerlei lysosomale und endosomale Strukturen erkennbar (Abb. 16 F). Aufgrund der fehlenden Färbung von Limp-2 kann davon ausgegangen werden, dass kein endogenes Limp-2 in den embryonalen und adulten Knock-out-Fibroblasten vorhanden ist.

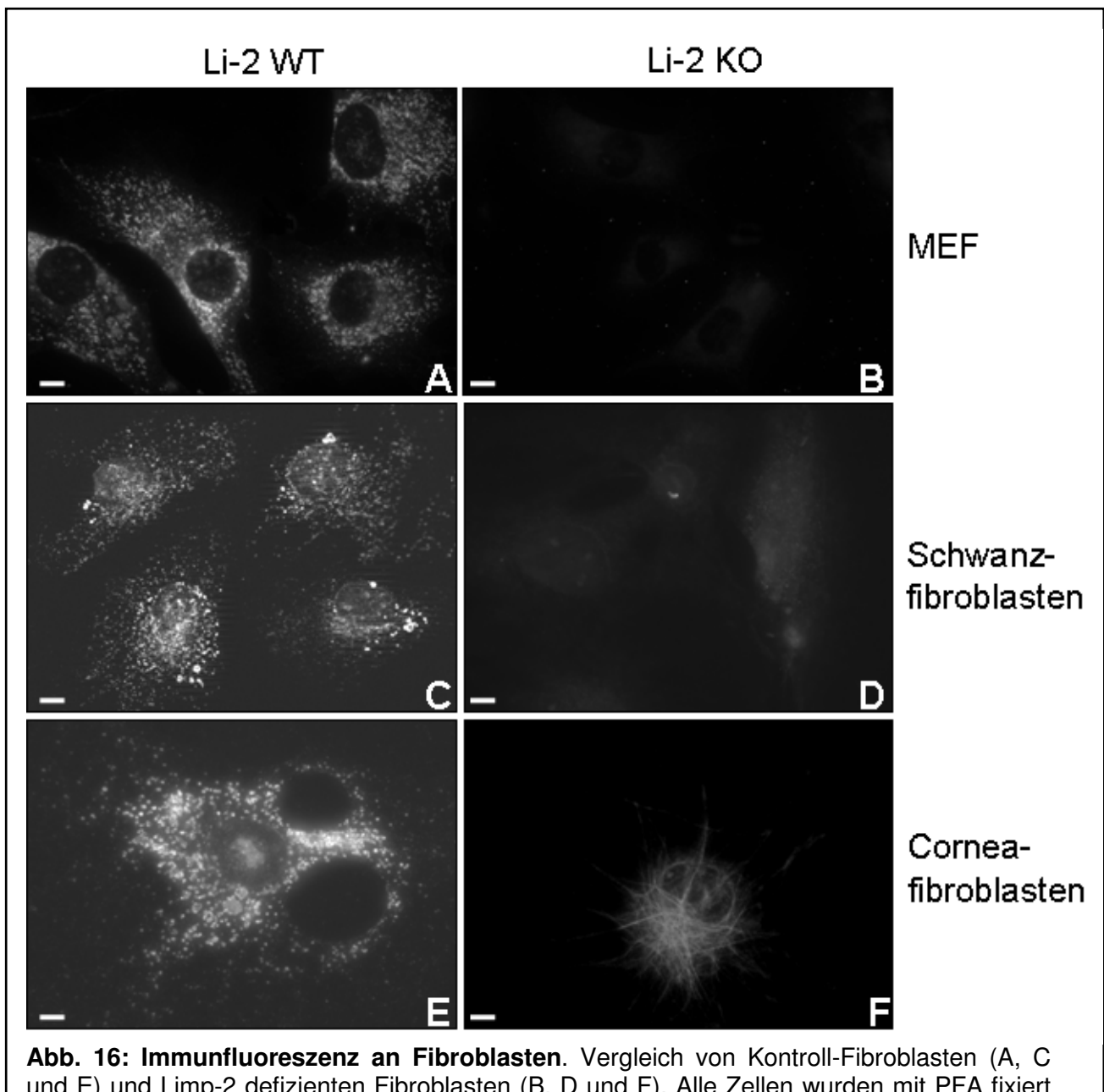
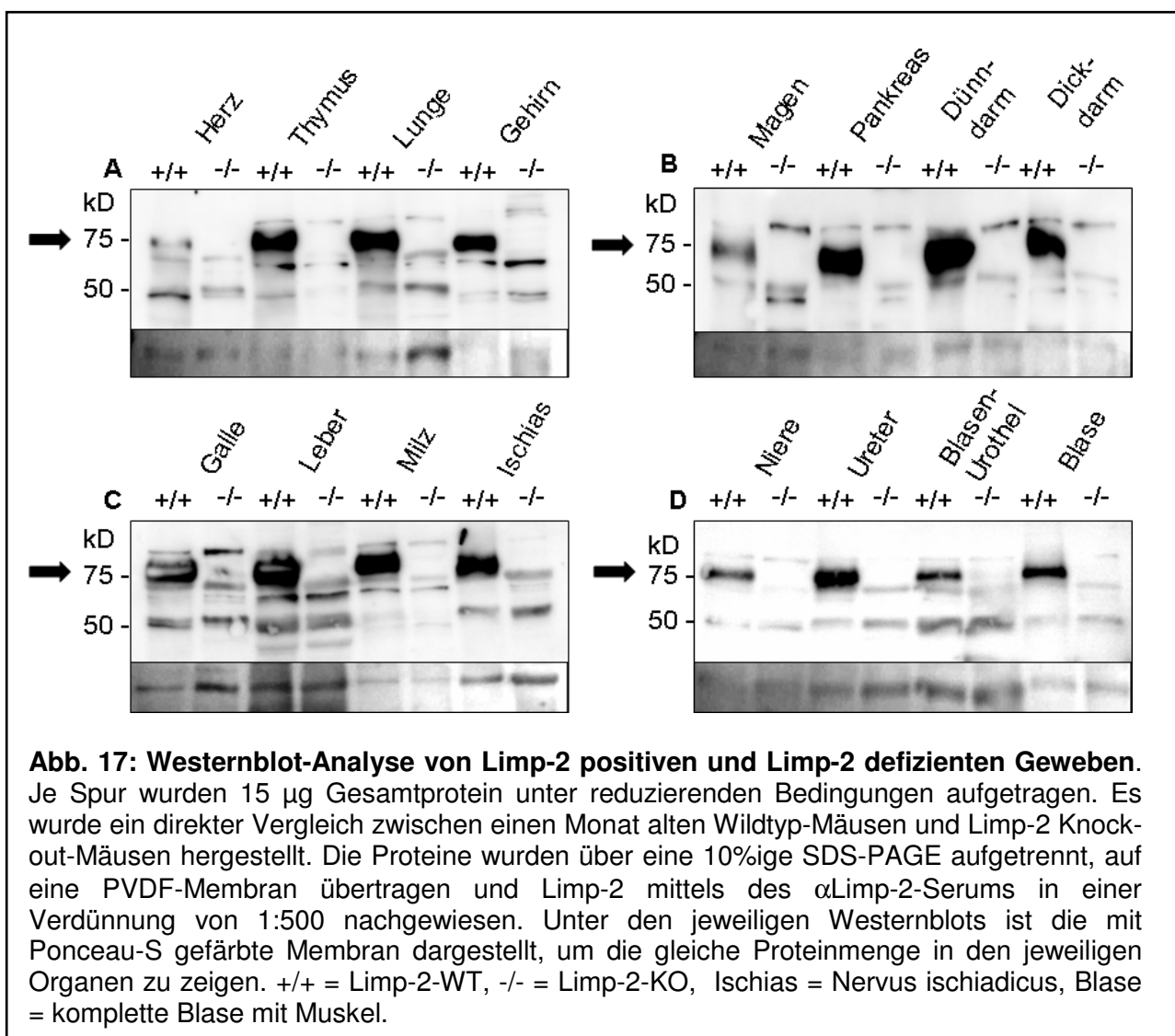


Abb. 16: Immunfluoreszenz an Fibroblasten. Vergleich von Kontroll-Fibroblasten (A, C und E) und Limp-2 defizienten Fibroblasten (B, D und F). Alle Zellen wurden mit PFA fixiert und für eine Stunde mit dem gegen den C-Terminus von Limp-2 gerichteten Antikörper inkubiert. **A** und **B** – MEF-Zellen, **C** und **D** – adulte Schwanzfibroblasten, **E** und **F** – adulte Fibroblasten aus der Cornea (Augenhornhaut). Mit Hilfe von Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörpern wurde die Expression der detektierten Proteine mit dem Fluoreszenz-Mikroskop nachgewiesen. Li-2 WT – Fibroblasten aus Kontrollmäusen, Li-2 KO – Fibroblasten aus Limp-2 defizienten Mäusen. Maßstab Balken = 10µm.

Mittels Westernblot:

Für die Westernblot-Analyse wurden verschiedene Gewebe (Gehirn, Thymus, Herz, Lunge, Galle, Leber, Pankreas, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Milz, Nieren, Ureter, Blasenurothel, komplette Blase mit Muskel und der Nervus ischiadicus) einen Monat alter Wildtyp-Mäuse und Limp-2 Knock-out-Mäuse lysiert (s. 3.2.2.1) und unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt (s. 3.2.2.6). Limp-2 wurde mit einem gegen Ratten-Limp-2 gerichteten Antiserum (s. 3.1.10) nachgewiesen (Abb. 17).



Das Antiserum gegen Limp-2 reagiert besonders ausgeprägt mit einem etwa 75 kD großen Protein, das ausschließlich in den Wildtyp-Geweben exprimiert wird. In den Limp-2 defizienten Geweben findet sich in diesem Molekulargewichts-Bereich

keinerlei Immunoreaktivität. Dieses Ergebnis wurde mit älteren fünf Monate alten Mäusen verifiziert (Daten nicht gezeigt). Die gering unterschiedlichen Molekulargewichte des Limp-2 Proteins sind auf den unterschiedlichen Glykosylierungsgrad zurückzuführen. Eine starke Expressionen des Limp-2 Proteins ist im Dünndarm und der Leber zu beobachten, während im Herzgewebe sehr wenig Limp-2 exprimiert wird. Mit der folgenden Ponceau S-Färbung der Membran wurde die gleiche Proteinladung in den paarweise zusammengehörenden Spuren gezeigt (Abb. 17).

4.2 Expressionen lysosomaler Proteine in Limp-2 defizienten Tieren

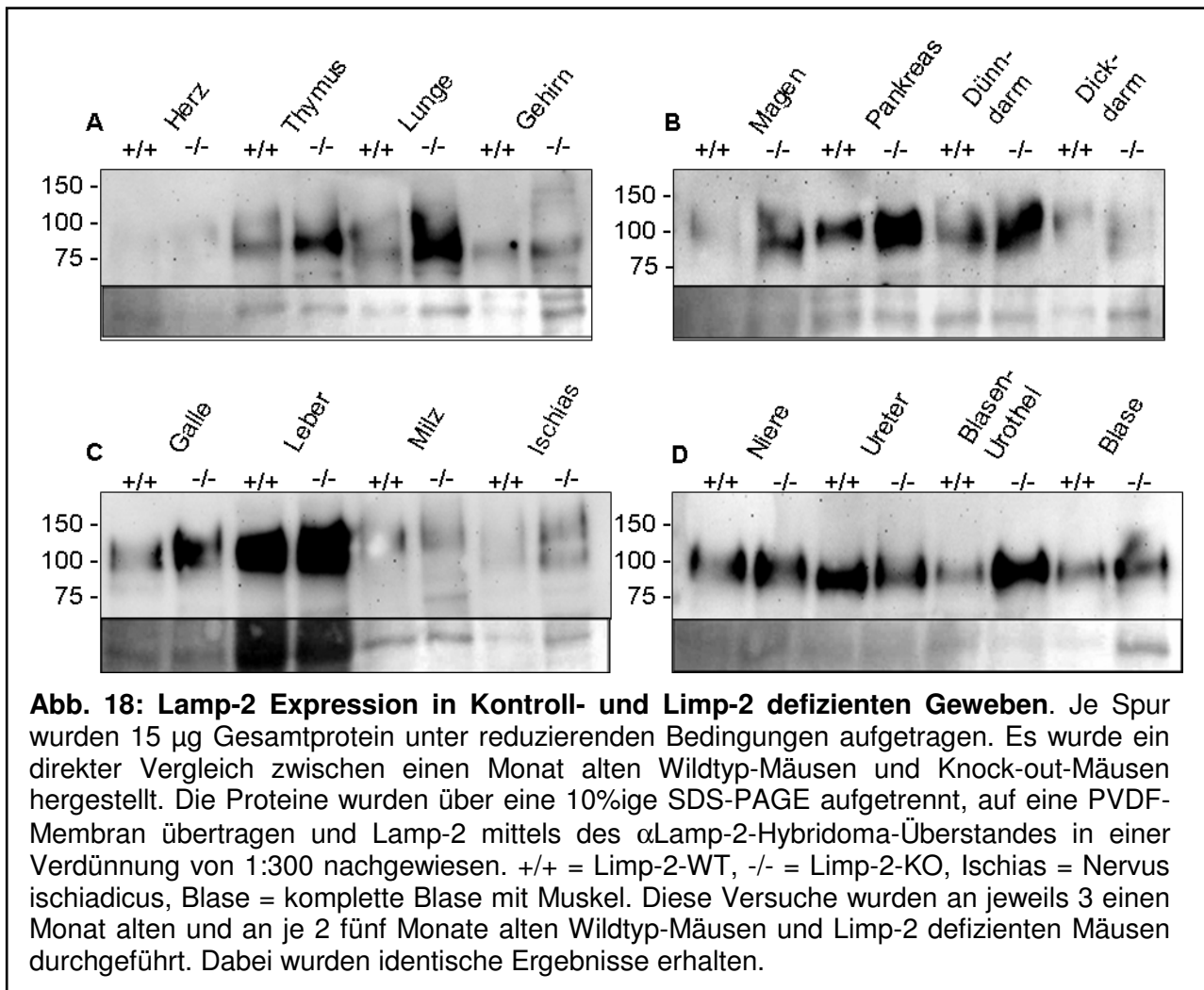
Um zu untersuchen, ob durch die Limp-2 Defizienz die Expression anderer spät endosomaler/lysosomaler Proteine beeinflusst wird, wurden die wichtigsten Organe und Gewebe mittels der Westernblot-Methode analysiert.

Die verschiedenen Gewebe (Gehirn, Thymus, Herz, Lunge, Galle, Leber, Pankreas, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Milz, Nieren, Ureter, Blasenurothel, komplette Blase mit Muskel und der Nervus ischiadicus) einen Monat alter Wildtyp-Mäuse und Limp-2 Knock-out-Mäuse wurden lysiert (s. 3.2.2.1) und unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt (s. 3.2.2.6). Danach wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und die Membran mit Antikörpern gegen Lamp-2 und Cathepsin D über Nacht inkubiert.

Lamp-2 ist ein hochglykosyliertes, lysosomales Membranprotein mit einer Größe von ungefähr 110kD, das beim Menschen in mutierter Form für die Danon-Erkrankung verantwortlich ist (Nishino *et al.*, 2000). Durch die hohe Glykosylierung sind die durch den Antikörper erkannten Banden teilweise unscharf und haben je nach Gewebe unterschiedliche Molekulargewichte (Abb. 18).

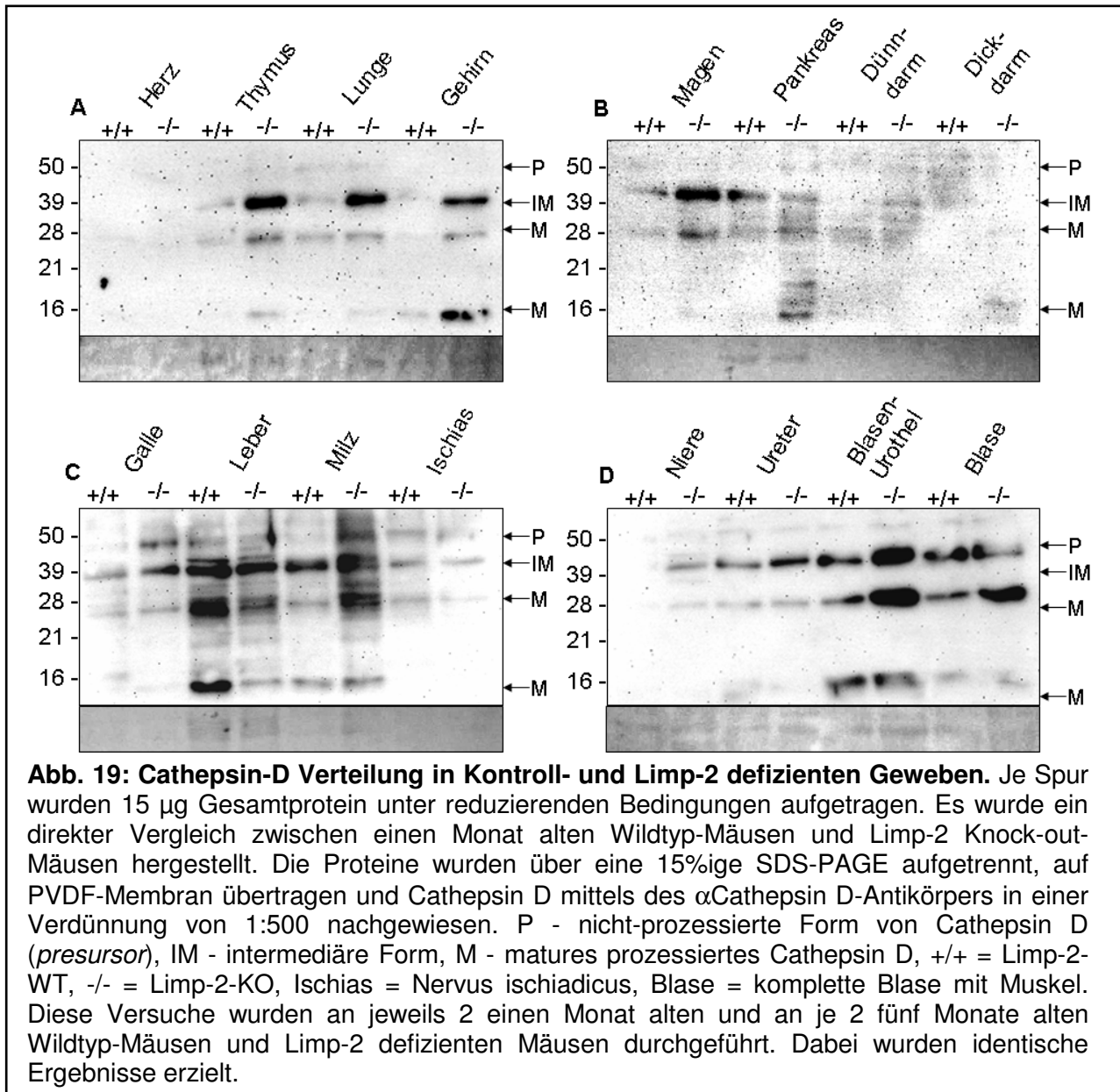
Auffällig ist eine erhöhte Expression um das 2-fache in Limp-2 defizientem Thymus (Abb. 18 A), Pankreas und Dünndarm (Abb. 18 B), in der Leber um das 1.5-fache (Abb. 18 C), der Galle das 3-fache (Abb. 18 C). In der Lunge (Abb. 18 A) und dem Blasenurothel (Abb. 18 D) ist die Lamp-2 Expression etwa um das 5-fache erhöht im Vergleich zu den Geweben der Kontrolltiere. Ähnliche Expressionlevel wie bei Lamp-2 wurden für Lamp-1 offensichtlich (Daten nicht gezeigt). Mit der folgenden

Ponceau S-Färbung der Membran wurde die gleiche Proteinladung in den paarweise zusammengehörenden Spuren gezeigt (Abb. 18 A - D).



Cathepsin D ist eine der wichtigsten Endoproteinasen der Lysosomen, die für den Abbau von Proteinen zuständig ist. Im Westernblot erkennt der Antikörper gegen Cathepsin D vier verschiedene Formen des Proteins (Abb. 19): die 53 kD große nicht-prozessierte Vorläuferform (P), die 47 kD große intermediäre Form (IM) und die 31 und 14 kD großen prozessierten muren Formen (M) der Protease (Gieselmann *et al.*, 1983; Delbrück *et al.*, 1994). Ebenso wie bei Lamp-2 (Abb. 18) und Lamp-1 (Daten nicht gezeigt) kommt es im Blasenurothel zu einer Hochregulierung der intermediären und muren Cathepsin-D Formen (Abb. 19 D). Des Weiteren ist eine erhöhte Expression insbesondere der intermediären Form in den Limp-2 defizienten Geweben Thymus, Lunge, Gehirn (Abb. 19 A) und Magen (Abb. 19 B) zu erkennen. In der Limp-2 defizienten Milz scheinen alle vier Formen von Cathepsin D stärker exprimiert zu sein. Eine niedrigere Expression der muren Formen von Cathepsin D

ist in der Limp-2 Knock-out-Leber zu beobachten (Abb. 19 C). Mit der folgenden Ponceau S-Färbung der Membran wurde die gleiche Proteinladung in den paarweise zusammengehörenden Spuren gezeigt (Abb. 19).

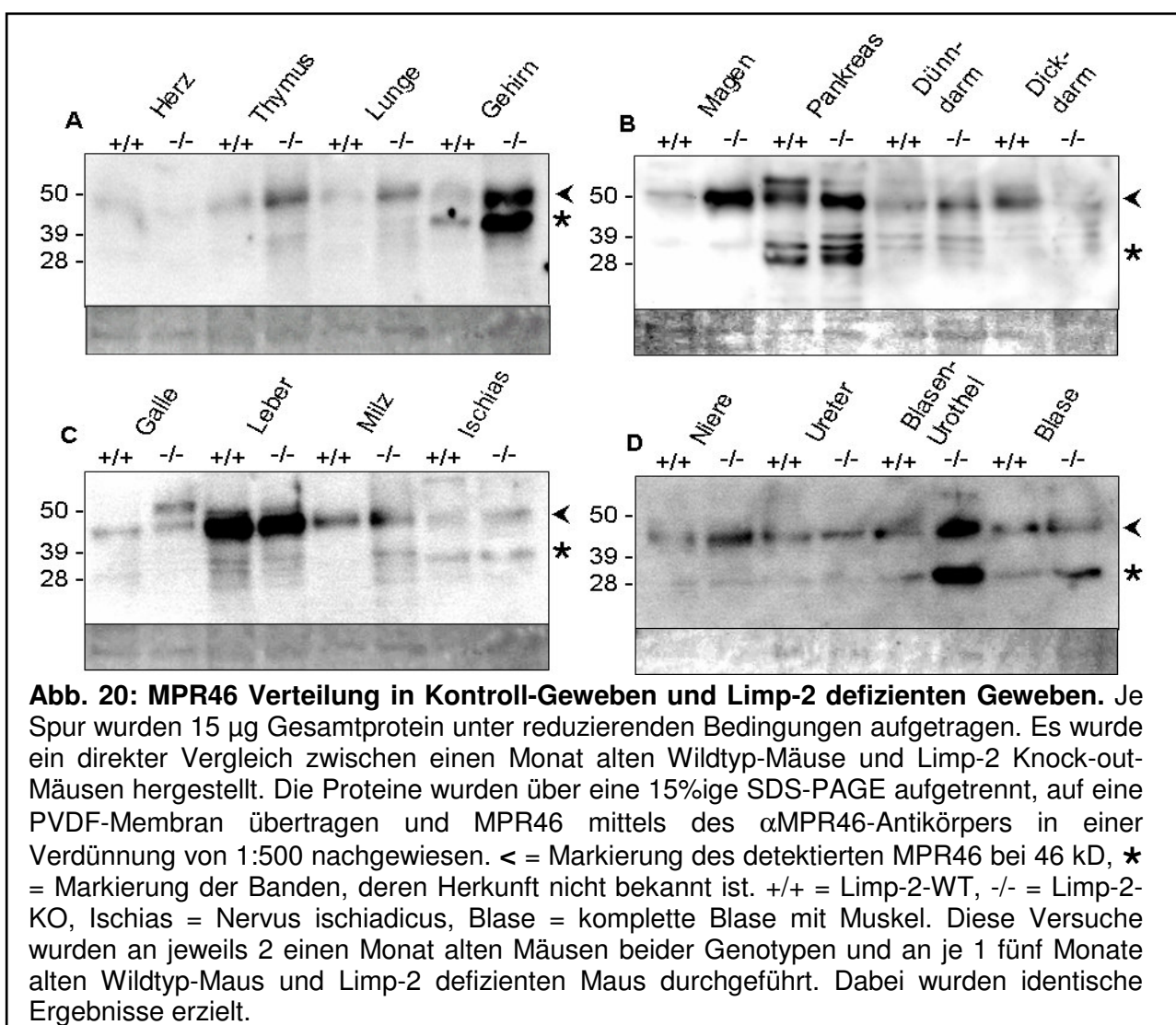


4.3 MPR46-Expression

Der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor 46kD (MPR46) ist einer der beiden Transporter, der zwischen dem TGN und den Endosomen zirkuliert und dabei lysosomale Proteine transportiert.

Die verschiedenen Gewebe (Gehirn, Thymus, Herz, Lunge, Galle, Leber, Pankreas, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Milz, Nieren, Ureter, Blasenurothel, komplette Blase mit Muskel und der Nervus ischiadicus) einen Monat alter Wildtyp-Mäuse und Limp-2 defizienter Mäuse wurden lysiert (s. 3.2.2.1) und unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt (s. 3.2.2.6). Der Nachweis erfolgte mit einem Antikörper gegen MPR46.

Auffällig bei dem Immunoblot gegen MPR46 (Abb. 20) ist die starke Expression des Proteins in Limp-2 defizientem Gehirn, Magen und Blasenurothel im Vergleich zu den Geweben der Kontrolltiere.



Eine leichte Erhöhung der Expression von MPR46 ist im Limp-2 defizienten Dünndarm zu erkennen. Wie bei den Western gegen Lamp-1 (nicht gezeigt) und Cathepsin D (Abb. 20) erscheint auch MPR46 in der Leber der Limp-2 defizienten

Tiere leicht herunterreguliert. Die Spezifität der durch den MPR46-Antikörper erkannten zweiten Banden bei 30 kD im Gehirn (Abb. 20 A) und 30 kD in Pankreas (Abb. 20 B) und Blase (Abb. 20 D) ist unklar (mit „*“ markiert). Der Westernblot wurde mit Geweben von zwei verschiedenen einen Monat alten Tieren mit gleichen Ergebnissen durchgeführt. Mittels Ponceau S-Färbung der Membran wurde die gleiche Proteinladung in den paarweise zusammengehörenden Spuren gezeigt (Abb. 20).

4.4 Zusammenfassung der bisherigen Immunoblot-Analyse

In der Tabelle 1 ist die veränderte Regulation von Lamp-2, Lamp-1, Cathepsin D und MPR46 in einen Monat alten Limp-2 defizienten Geweben aufgeführt.

	Lamp2	Lamp1	Cathepsin D	MPR46
Herz	-	-	-	-
Thymus	↑	↑	↑	↑
Lunge	↑	↑	↑	↑
Gehirn	-	↑	↑	↑↑
Magen	↑	-	↑	↑↑
Pankreas	↑	↑	↑ 14 kD	↑
Dünndarm	↑	-	-	↑ leicht
Dickdarm	-	↑	-	↓
Galle	↑	-	↑	↑
Leber	↑ leicht	↓↓	↓	↓
Milz	-	-	↑	-
N. ischiadicus	↑ leicht	↑	-	-
Niere	-	-	-	↑ leicht
Ureter	-	-	↑ leicht	-
Blasenurothel	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
kompl. Blase	-	↑	↑ 31 kD	-

Tab. 1: Zusammenfassung der Regulation des endosomalen und lysosomalen Kompartiments der Limp-2 defizienten Gewebe gegenüber den Wildtyp-Geweben. Zusammenfassung der untersuchten Gewebe aus einen Monat alten Wildtyp-Mäusen und Limp-2 Knock-out-Mäusen in tabellarischer Form. ↑ - stark erhöhte Expression in Limp-2 defizienten Geweben, ↓ - stark erniedrigte Expression in Limp-2 defizienten Geweben, ↑ - angegebene Proteine sind etwas stärker exprimiert in den Limp-2 defizienten Geweben, ↓ - angegebene Proteine sind etwas niedriger exprimiert gegenüber dem Proteinlevel der Wildtyp-Gewebe, ↑ leicht bis sehr geringe Hochregulierung, – keine Unterschiede in der Expression. Die Angaben bei Cathepsin D in kD weisen darauf hin, dass nur diese Form in Limp-2 defizienten Geweben stärker exprimiert ist, während die anderen Formen keine unterschiedliche Expression aufweisen.

Eine sehr starke Expression im Vergleich zum Kontrollgewebe ist im Blasenurothel auffällig. Eine weniger starke Expression findet man im Limp-2 defizienten Thymus und der Lunge. Eine leichte erhöhte Expression ist bei MPR46 in Dünndarm und Niere der Limp-2 defizienten Gewebe zu erkennen.

4.5 Limp-2 Defizienz führt zu einer erhöhten Mortalität

Die Mortalität von je 100 Tieren der Kontrollzucht und Knock-out-Zucht wurde über einen Zeitraum von 10 Monaten beobachtet und ausgewertet. Abbildung 21 a beschreibt den direkten Vergleich der Sterberate bzw. der Lebensdauer zwischen Kontroll-Tieren und Limp-2 defizienten Tieren. Die Kontrolltiere zeigen eine normale Sterberate von Mäusen in konventioneller Haltung, die nach sechs Monaten bei etwa 10% liegt. Im Vergleich sterben die Limp-2 defizienten Tiere wesentlich früher. Einen Sprung der Sterberate gibt es im Alter von sechs Monaten. Bis zu diesem Alter sind bereits 65% der ausgewerteten Limp-2 defizienten Tiere verendet.

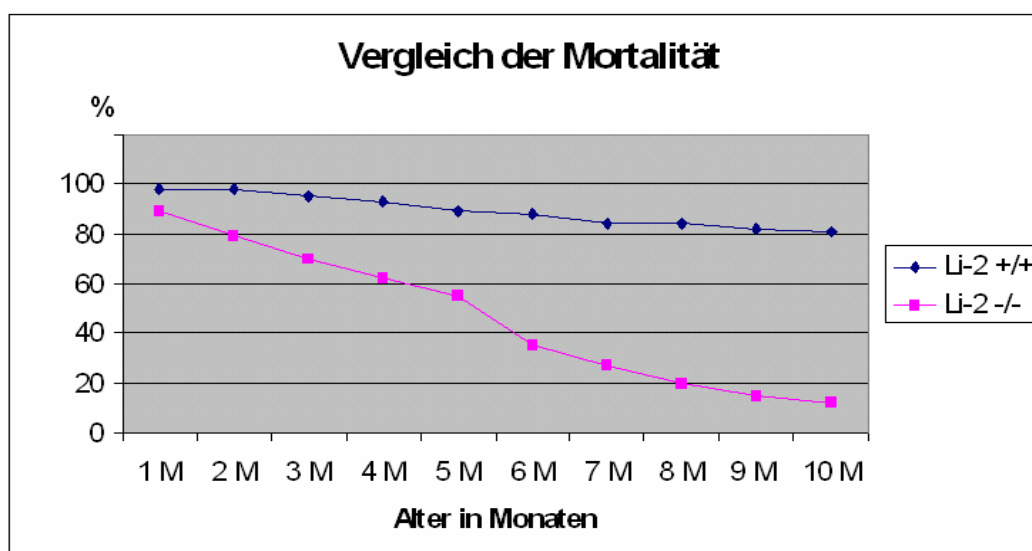
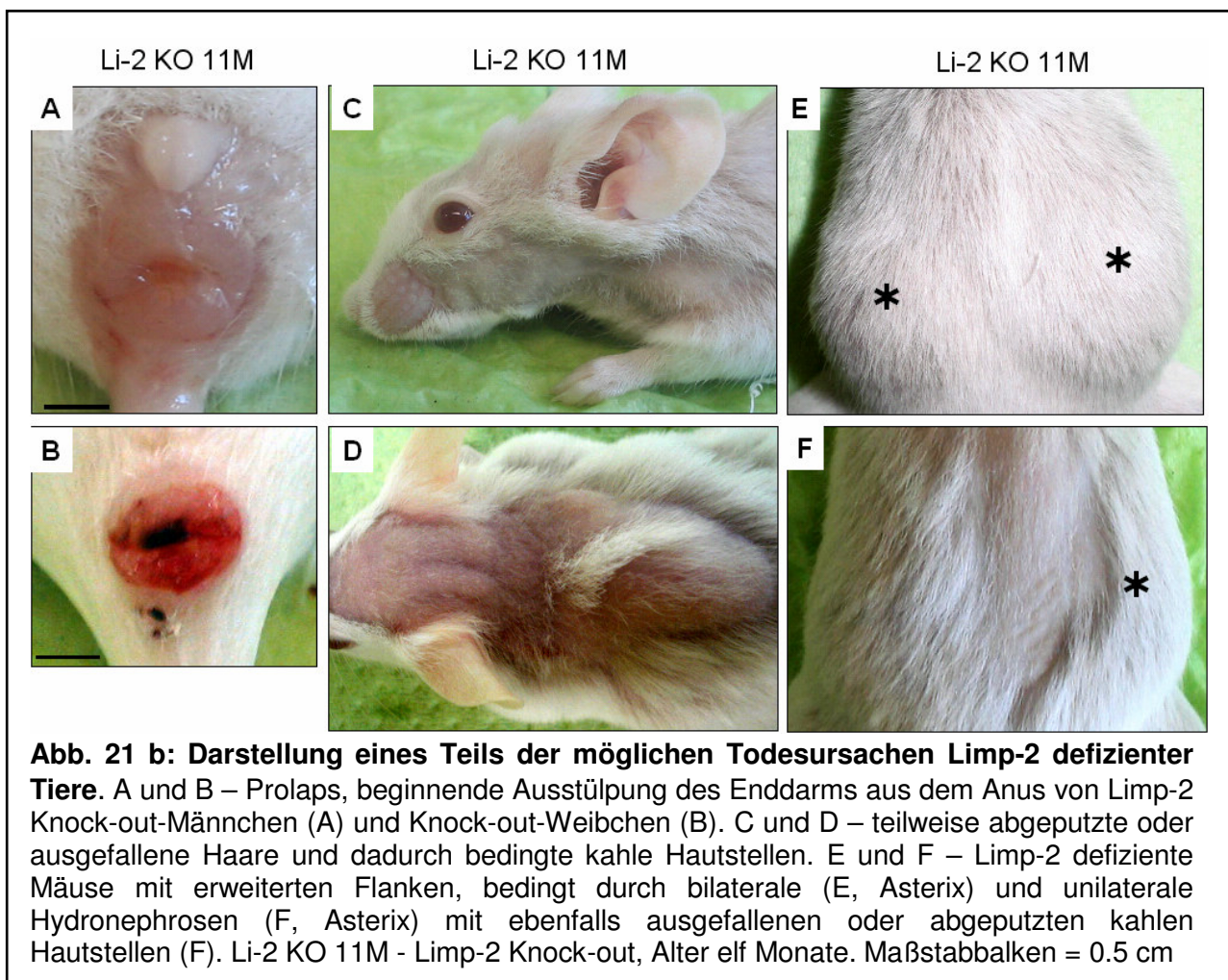


Abb. 21 a: Vergleich der Mortalität zwischen Kontroll-Mäusen und Limp-2 Knock-out-Mäusen. Die Limp-2 defizienten Tiere haben eine höhere Mortalität als die Kontrolltiere. Es wurde die Sterberate von jeweils 100 Tieren über einen Zeitraum von zehn Monaten ausgewertet, die eines natürlichen Todes starben. Nach fünf Monaten waren bereits 55% der Knock-out-Tiere verendet, während bei der Kontrollzucht nach zehn Monaten noch 81% lebten. Li-2 +/+ = Kontrolltiere, Linie mit schwarzen Rhomben markiert, Li-2 -/- = Limp-2 Knock-out-Tiere, mit viereckigen roten Kästen markiert. Die x-Achse beschreibt das Alter der Tiere in Monaten, die y-Achse stellt die Prozentzahlen der noch lebenden Tiere dar.

Mögliche offensichtliche Todesursachen waren Darmvorfälle (Prolaps, 5% der Limp-2 Knock-out-Mäuse, Abb. 21b A und B), die in einigen Fällen mit Vergrößerungen der Milz oder blutendem After einhergingen (je 5 beobachtete Fälle von 200 Tieren) und Schädigungen der Nieren in Form von uni- und bilateralen Hydronephrosen (50% der Limp-2 Knock-out-Tiere, Abb. 21b C und D, Asterixe). Die Entwicklung der Hydronephrosen häufte sich ab dem Alter von sechs Monaten. Des Öfteren wurde das Fehlen von Haaren beobachtet (40% der Limp-2 Knock-out-Mäuse), wobei noch geklärt werden muss, ob die Ursache Haarausfall ist oder die Haare durch stetiges Putzen und Kratzen der Tiere ausfallen (Abb. 21b B und C). Das Fehlen der Behaarung führte in 10% der Fälle zu Infektionen der Haut, eventuell durch Bakterienbefall oder Milben ausgelöst. Oft war die Todesursache jedoch nicht klar ersichtlich.



4.6 Limp-2 Defizienz führt zur Schädigung der ableitenden Harnwege

In der beschreibenden Arbeit über die Limp-2 defiziente Maus von Gamp *et al.* (2003) wurde die Entwicklung von uni- und bilateralen Hydronephrosen gezeigt, die wahrscheinlich durch eine Ureterabgangsstenose hervorgerufen werden. Abbildung 22 zeigt ausgeprägte Hydronephrosen von Limp-2 defizienten Tieren, die entweder bilateral (Abb. 22 A) oder unilateral (Abb. 22 C) ausgeprägt sind.

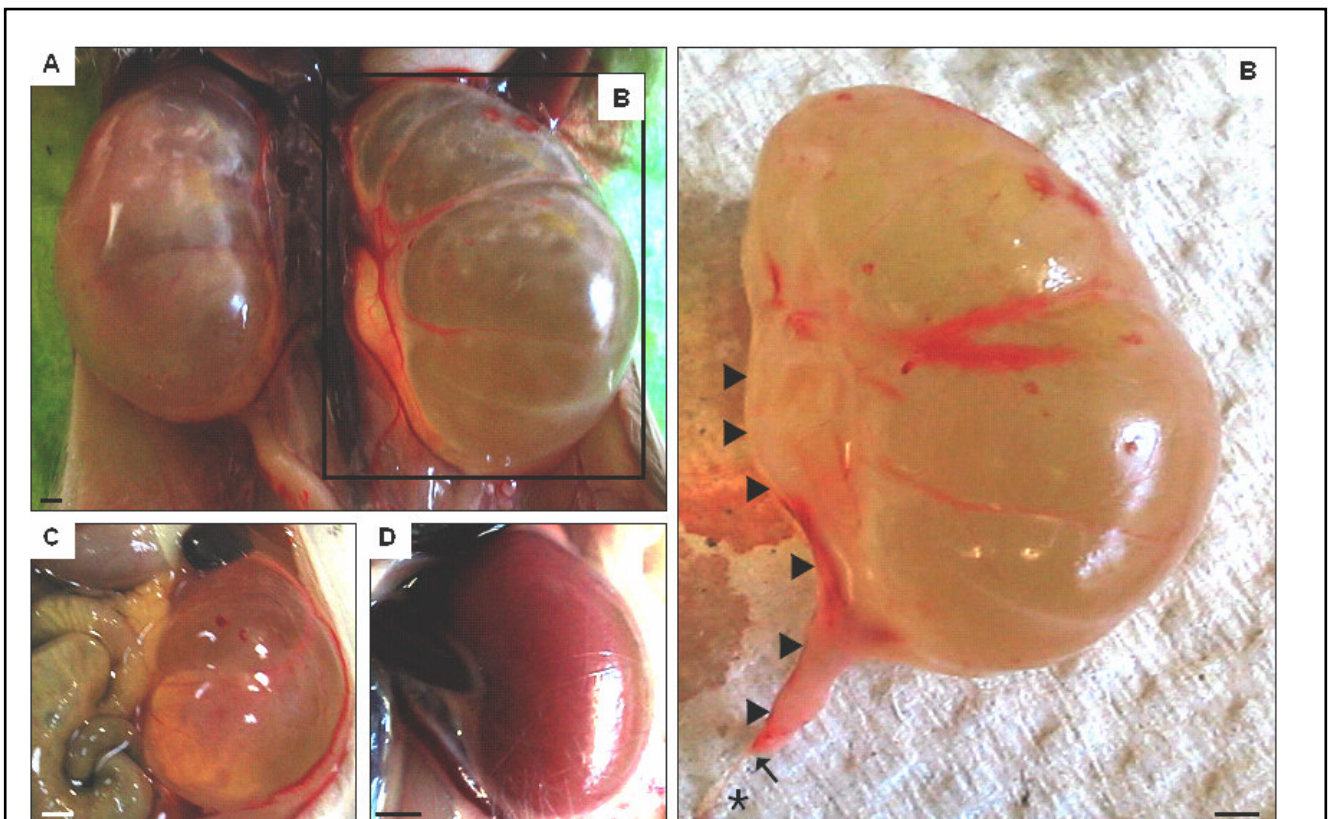


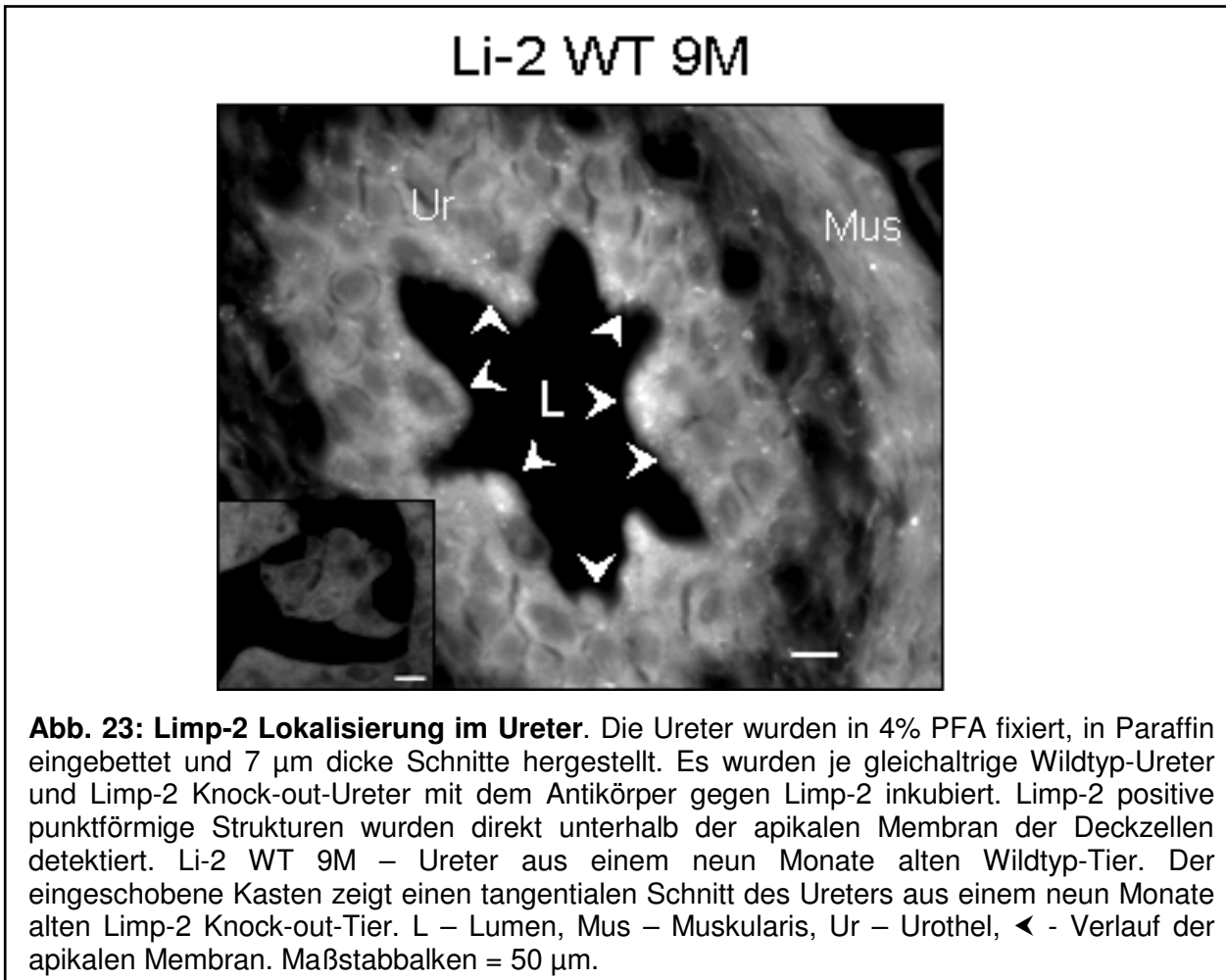
Abb. 22: Vergleich von nicht-hydronephrotischen Nieren und Hydronephrosen der Limp-2 Knock-out-Mäuse. A – bilaterale Hydronephrosen eines elf Monate alten Limp-2 defizienten Weibchens. B – präparierte linke Niere aus A mit einer Höhe von 2.3 cm und einer Breite von maximal 1.6 cm. Pfeilköpfe - Verlauf des Ureters, beginnend am Nierenbecken. Pfeil - verdickter proximaler Teil des Ureters nahe des Nierenbeckens, vermutlich bedingt durch eine Ureterabgangsstenose. Asterix - Markierung des Ureters unterhalb der Stenose. C – linke unilaterale Hydronephrose eines zwölf Monate alten Limp-2 defizienten Männchens. D – nicht hydronephrotische linke Niere einer elf Monate alten Limp-2 Knock-out-Maus mit einer Höhe von 1.2 cm und einer maximalen Breite von 0.7 cm. Maßstabebalken in A, C und D = 5 mm, in B = 2 mm.

Die hydronephrotische Niere erscheint etwa um das 2- bis 3-fache länger und breiter als die Niere eines Wildtyp-Tieres (Abb. 22 D). Den Hauptanteil an der Vergrößerung nimmt das Nierenbecken ein, es ist extrem geweitet, sehr dünnwandig und gespannt.

Die Hydronephrose ist mit klarem Urin gefüllt, das eigentliche Nierengewebe erscheint stark degeneriert und ist kaum noch makroskopisch darstellbar (Abb. 22 A, B und C). Die Ureter der Limp-2 defizienten Mäuse sind in der Nähe des Nierenbeckens stark verdickt (Abb. 22 B, die Pfeilköpfe beschreiben den Verlauf des verdickten Ureters am Nierenbecken), normalisieren sich aber im weiteren Ureterverlauf in Richtung Blase (Abb. 22 B, Asterix; der Pfeil markiert den abrupten Übergang in die distale Ureterstrecke, deren Durchmesser nicht vergrößert ist). In manchen Fällen waren die Hydronephrosen auch mit geronnenem Blut gefüllt, was eventuell durch ein defektes Blutgefäß hervorgerufen wurde. Bei ausgeprägten Hydronephrosen wurde zusätzlich Eiter in der Blase gefunden (Daten nicht gezeigt). Die Entwicklung von unilateralen Hydronephrosen bei Männchen wurde bei 20% der Tiere beobachtet, während bilaterale Hydronephrosen nur bei 1% der Limp-2 Knock-out-Männchen beobachtet wurden, deren beide Nieren unterschiedlich vergrößert waren. Bei Weibchen wurden nur bilaterale Hydronephrosen gefunden (30% der ausgewerteten Tiere). Bei den unilateralen Hydronephrosen war die linke Niere etwa so häufig betroffen wie die rechte Niere. Die Ursache für die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Entwicklung von bi- und unilateralen Hydronephrosen ist unklar.

4.6.1 Limp-2 Lokalisierung im Ureter

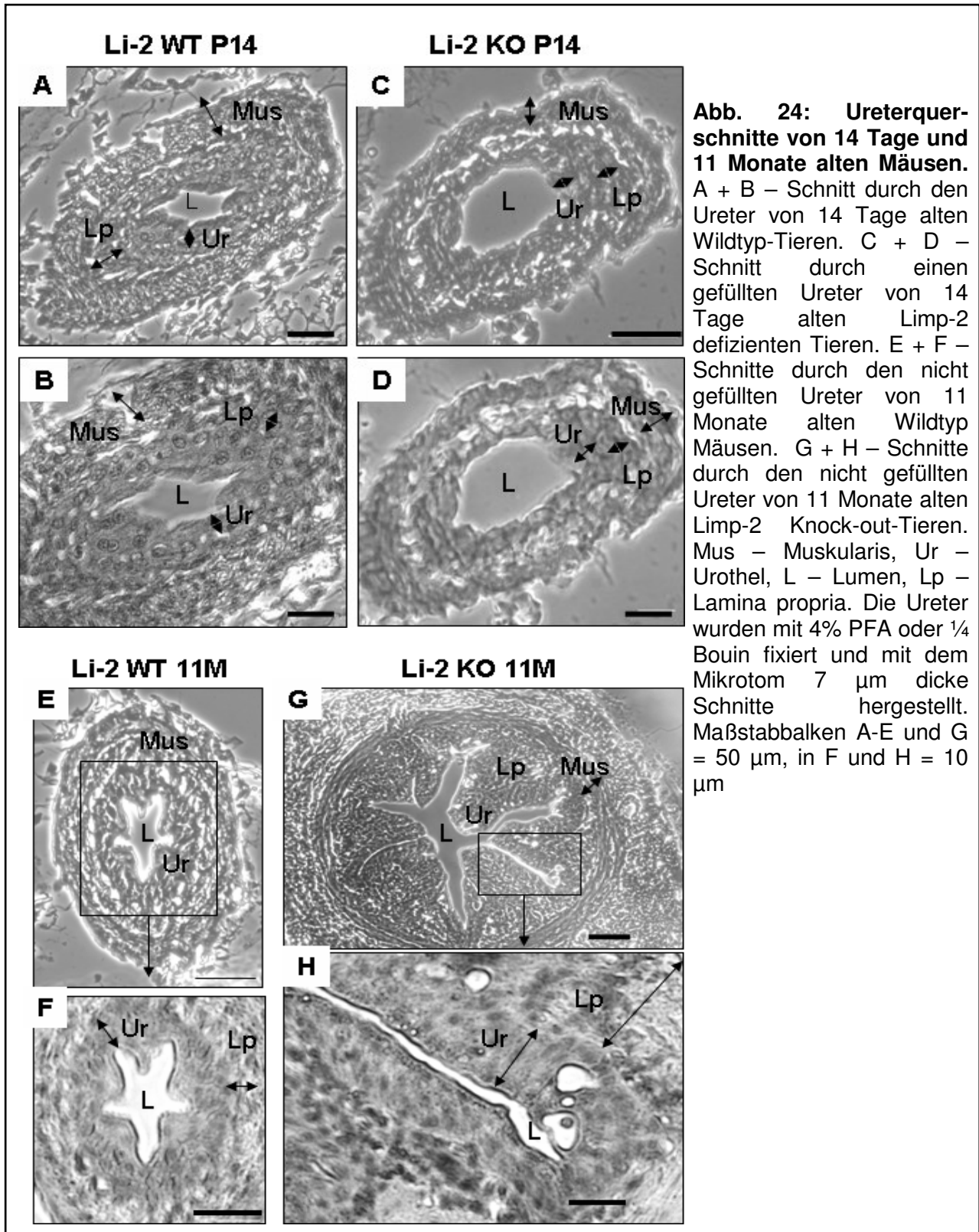
Zur präzisen Lokalisierung von Limp-2 im Ureter wurden Ureterquerschnitte von Wildtyp-Mäusen und Limp-2 Knock-out-Mäusen mit dem Antikörper gegen Limp-2 inkubiert (s. 3.1.10). Dieser wurde mittels eines fluoreszenz-gekoppelten Ziege α Kaninchen Antikörpers detektiert (s. 3.1.11). Die stärkste Lokalisierung Limp-2 positiver Vesikel im Wildtyp-Ureter wurde direkt unterhalb der apikalen Membran der Deckzellen (Abb. 23, Pfeilköpfe) beobachtet. Zur Kontrolle der spezifischen Immunoreaktivität wurden Limp-2 defiziente Ureter mit dem Antikörper gegen Limp-2 gefärbt (Abb. 23, eingeschobener Kasten). Wie erwartet konnte im Ureter der Limp-2 Knock-out-Maus kein Limp-2 detektiert werden.



4.6.2 Ureterveränderungen

Durch die von Gamp *et al.* (2003) beschriebene Ureterabgangsstenose nahe des Nierenbeckens kommt es in den Ureteren der Limp-2 Knock-out-Mäuse zu charakteristischen morphologischen Veränderungen (Abb. 24).

In 14 Tage postnatal alten Mäusen sind keine Veränderungen im Ureter zu erkennen (Abb. 24 A-D). Das Lumen ist in beiden Genotypen je nach Füllstatus mit Urin sternförmig (Abb. 24 A und B) oder rund (Abb. 24 C und D). Im weiteren Krankheitsprozess nimmt der Umfang des Ureters zu, die Schleimhaut und der Muskelmantel werden dicker (Abb. 24 G und H). Möglicherweise wird durch die veränderte Uroplakin-Expression im Urothel (Gamp *et al.*, 2003) die Stabilität und die Permeabilitätsbarriere gegen den Urin nicht mehr gewährleistet, wodurch das Gewebe durch den stetigen Kontakt mit Urin geschädigt werden kann (Hu *et al.*, 2004).



4.6.2.1 Verteilung verschiedener Uroplakine im Ureter von Wildtyp-Mäusen und Limp-2 Knock-out-Mäusen

Uroplakine (UP) sind integrale Membranproteine, die Heterodimere bilden und so genannte Plaques formen. Diese bilden eine Barriere zwischen den Zellen des Urothels und dem meist nicht isotonen Harn mit seinen aggressiven Bestandteilen (Apodaca, 2004). In Vorarbeiten zur vorliegenden Untersuchung wurde eine erniedrigte Expression von Uroplakin 3a in der apikalen Schicht des Ureter-Urothels von Limp-2 defizienten Mäusen beschrieben (Gamp *et al.*, 2003). Besonders die Lokalisierung der Uroplakine in Form von Plaques ist für den Schutz vor Schädigungen durch den Urin und die Undurchlässigkeit gegen diesen wichtig. Um die Lokalisierung der bekannten Uroplakine systematisch zu untersuchen, wurde Gewebe aus Tieren verschiedener Altersstufen fixiert, in Paraffin eingebettet und mit den Antikörpern gegen UP1a, UP2, UP1b, UP3a und UP3b inkubiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Mikroskop. Zur Quantifizierung der Expression wurden alle Uroplakine im Westernblot analysiert.

Zunächst wurden die verschiedenen Uroplakine an 14 Tage alten Wildtyp-Uretern und Limp-2 Knock-out-Uretern im Vergleich untersucht (Abb. 25). In der Expression von Uroplakin 1a gibt es keine offensichtlichen Unterschiede bei der indirekten Immunfluoreszenz zwischen Wildtyp-Mäusen und Limp-2 Knock-out-Mäusen im Alter von 14 Tagen (Abb. 25 A und B, diagonale Ureterschnitte). Wie erwartet ist die apikale Membran der Deckzellen fast komplett mit Uroplakin 1a bedeckt (Abb. 25 A und B, Pfeilköpfe). Eine vergleichbare Expression von Uroplakin 1a in 14 Tage alten Wildtyp-Uretern und Limp-2 defizienten Uretern wurde außerdem mittels Westernblot Analyse verifiziert (Abb. 25 C).

Uroplakin 2 - der vermutete Dimer-Partner von Uroplakin 1a - weist ebenfalls keine Expressionsunterschiede auf. Der Antikörper gegen UP 2 besitzt ebenso wie in der Immunoblot-Analyse eine schwache Immunoreaktivität an fixiertem Urothel. Deshalb sind die Ergebnisse hier nicht dargestellt.

Unterschiede zwischen 14 Tage alten Wildtyp-Uretern und Limp-2 defizienten Uretern sind dagegen in der Lokalisierung von Uroplakin 1b sichtbar (Abb. 25 D und E). Die Verteilung dieses Proteins im Wildtyp-Ureter ähnelt der Verteilung von Uroplakin 1a.

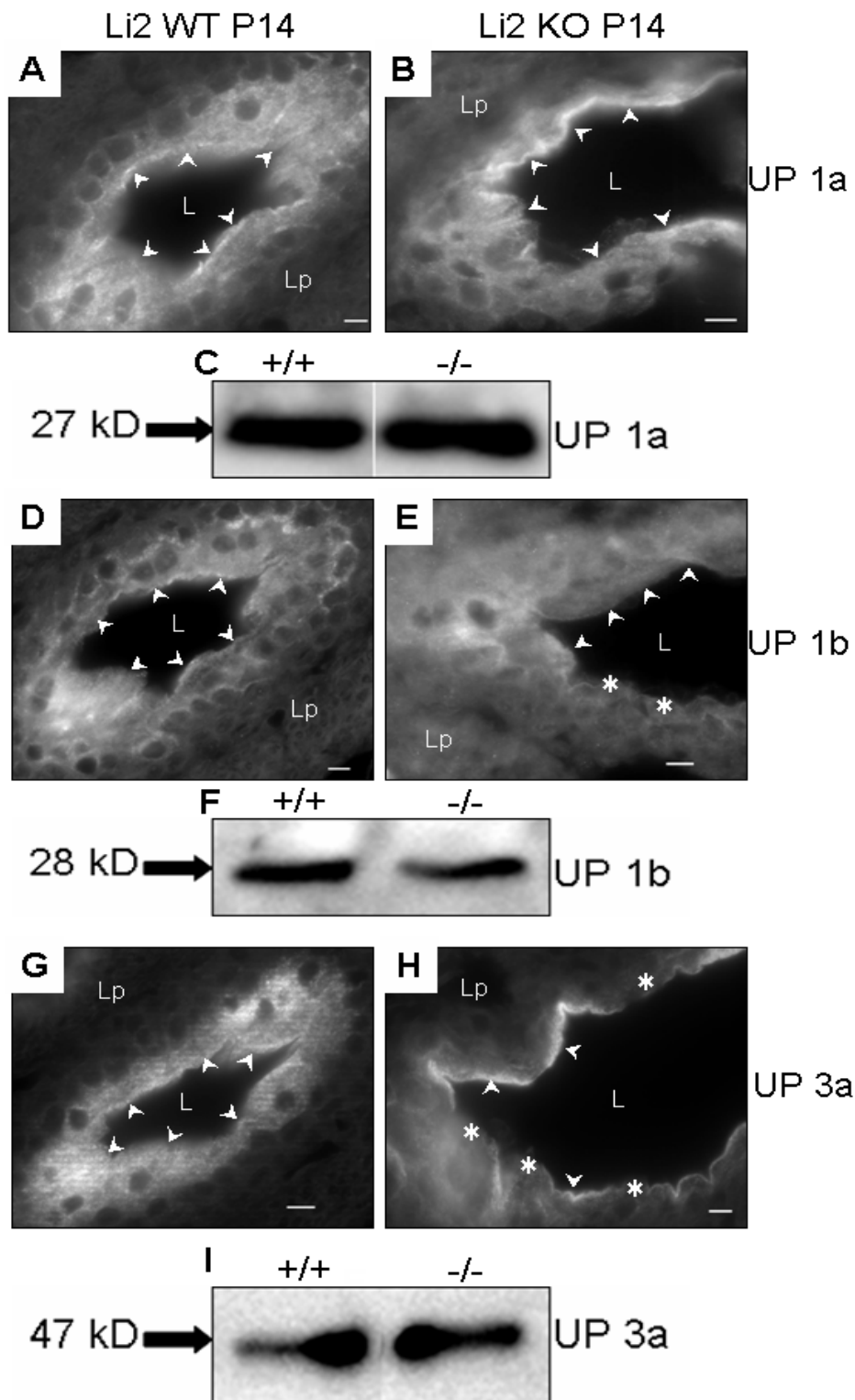


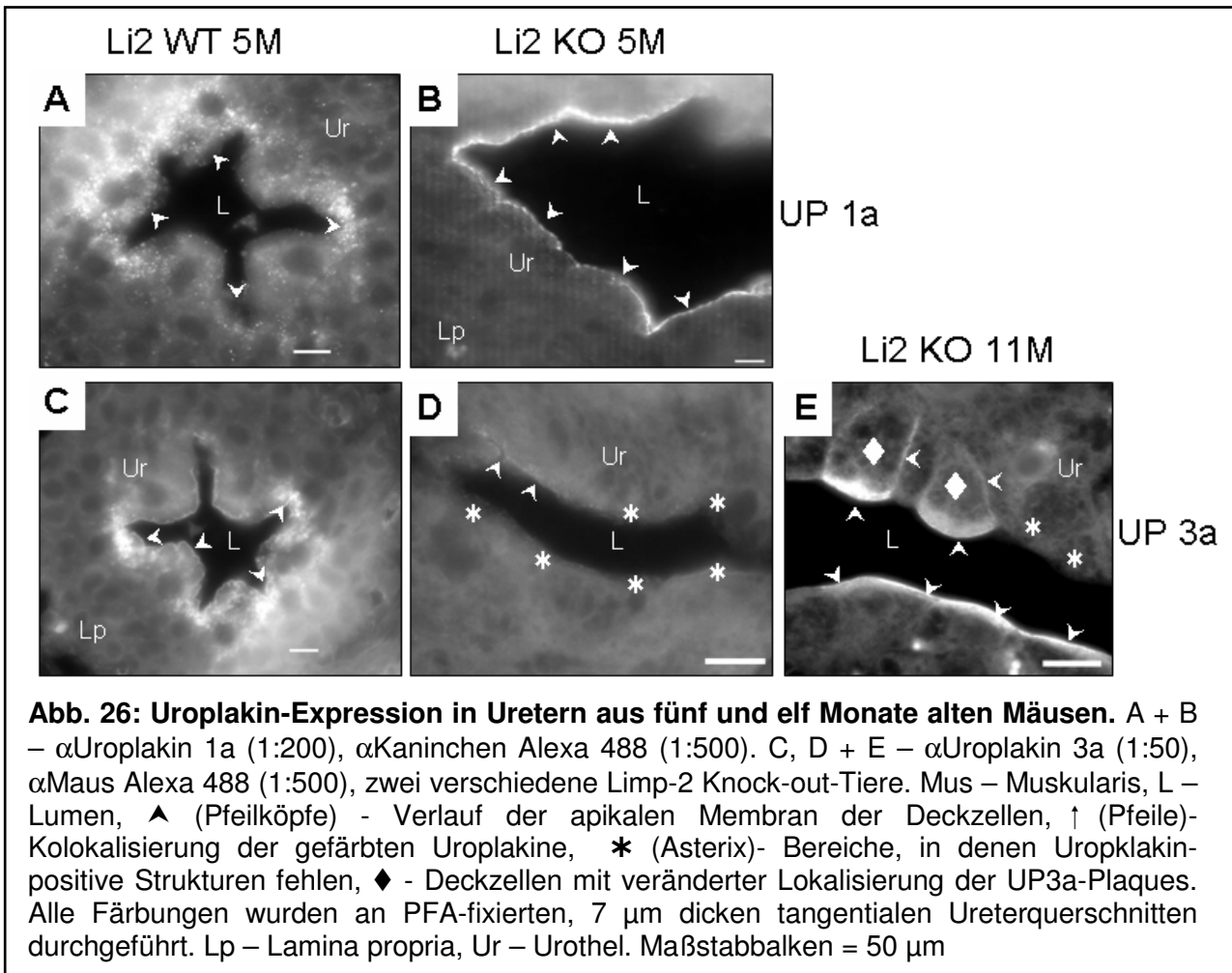
Abb. 25: Uroplakin-Expression im Ureter von 14 Tage alten Mäusen. A + B – α Uroplakin 1a (1:200), α Kaninchen Alexa 488 (1:500). C – Immunoblot-Analyse gegen Uroplakin 1a (1:2000), α Kaninchen-HRP (1:10000). D + E – α Uroplakin 1b (1:1000), α Kaninchen Alexa 488 (1:500). F – Immunoblot-Analyse gegen Uroplakin 1b (1:5000), α Kaninchen-HRP (1:10000). G + H – α Uroplakin 3a (1:50), α Maus Alexa 488 (1:500). I – Immunoblot-Analyse gegen Uroplakin 3a (1:500), α Maus-HRP (1:10000). Die indirekten Immunfluoreszenzfärbungen wurden an PFA-fixierten, 7 μ m dicken, diagonalen Ureterschnitten durchgeführt. Mus - Muskularis, * - Uroplakine-freie Bereiche, \blacktriangleright - apikale Membran des Urothels, L - Lumen. Maßstabballen = 50 μ m.

Uroplakin 1b-positive Plaques kleiden fast die gesamte apikale Membran der Deckzellen in den Uretern der Wildtyp-Mäuse aus (Abb. 25 D, Pfeilköpfe). Im Limp-2 defizienten Ureter fehlt die apikale Färbung in mehreren Bereichen (Abb. 25 E, Asterixe). Dies könnte eventuell durch eine Entwicklungsverzögerung im Limp-2 Knock-out-Ureter begründet sein. Die indirekte Immunfluoreszenz an Uroplakin 1b wurde an 5 verschiedenen Tieren wiederholt, wobei die Ergebnisse konstant waren (Daten nicht gezeigt). Bei der Quantifizierung von Uroplakin 1b im Ureter mittels Westernblot wurde festgestellt, dass die Expression dieses Uroplakins in den Limp-2 defizienten Uretern etwas geringer zu sein scheint (Abb. 25 F).

In der Lokalisierung von Uroplakin 3a - dem Herterodimer-Partner von Uroplakin 1b – wurden weitere Unterschiede festgestellt (Abb. 25 G und H). In den Uretern aus Wildtyp-Tieren ist die apikale Membran der Deckzellen durchgehend mit Uroplakin 3a-positiven Plaques bedeckt (Abb. 25 G, Pfeilköpfe). Wie bereits erwähnt, ist die Lokalisierung von Uroplakin 3a im Limp-2 defizienten Ureter im Vergleich zu der Kontrolle verändert (Gamp *et al.*, 2003). Dieser Effekt ist bereits deutlich an Uretern 14 Tage alter Tiere zu sehen, da mehrere apikale Bereiche des Urothels nicht mit Uroplakin 3a ausgekleidet sind (Abb. 25 H, Asterixe). Die Quantifizierung von Uroplakin 3a mittels Westernblot zeigte jedoch genauso wie bei Uroplakin 1b keine Unterschiede im Expressionslevel (Abb. 25 I).

Zur weiteren Untersuchung der veränderten Lokalisierung und Expression der Uroplakine in Limp-2 defizientem Urothel wurden die Ureter von fünf und elf Monate alten Tieren untersucht. In der apikalen Lokalisierung von Uroplakin 1a gab es keine eindeutigen Unterschiede zwischen Wildtyp-Urothel und Limp-2 Knock-out-Urothel (Abb. 26 A und B, Pfeilköpfe), auch nicht bei der Quantifizierung mittels Immunoblot (Daten nicht gezeigt). Die Färbung gegen Uroplakin 3a wurde an je zwei verschiedenen fünf Monate alten Wildtyp-Tieren und Limp-2 Knock-out-Tieren getestet (Abb. 26 C und D, dargestellt für je 1 Maus pro Genotyp). Die Expression von Uroplakin 3a variiert abhängig von der Schnitthöhe des Ureters und den verschiedenen untersuchten Tieren. Im proximalen Bereich des Ureters der Limp-2 Knock-out-Maus, nahe des Nierenbeckens und der Ureterabgangsstenose, waren die apikalen Bereiche frei von Uroplakin 3a-positiven Plaques (Abb. 25 D, Asterixe). Im distalen Ureter – nicht-verdickter Teil – dagegen zeigte die Mehrzahl der Deckzellen eine positive Färbung der apikalen Membranen (Abb. 26 E, Pfeilköpfe).

In elf Monate alten Limp-2 Knock-out-Mäusen wurden – neben dem größtenteils ausgeprägten apikalen Expressionsverlust - außerdem Deckzellen gefunden, in denen UP3a-positive Plaques in basolateralen Bereiche beobachtet wurden (Abb. 26 E, Rhomben). Dies könnte auf eine mögliche Fehlsortierung von Uroplakin 3a in den Uretern der Limp-2 defizienten Tiere hinweisen.



Auch bei der Expressionsanalyse von Uroplakin 3a im Limp-2 Knock-out-Ureter mittels Westernblot, wurden niedrigere Expressionen offensichtlich (Daten nicht gezeigt). Im Zytoplasma der Deckzellen Limp-2 defizienter Ureter wurden weniger Uroplakin 1a und Uroplakin 3a gefärbte Strukturen detektiert (Abb. 26 B, D und E) als in den Uretern aus Wildtyp-Mäusen (Abb. 26 A und C). Der Limp-2 defiziente Ureter hat einen größeren Durchmesser als die jeweiligen Kontrollureter.

4.6.3 Veränderungen im Blasenurothel der *Limp-2* defizienten Maus

Das Ureterurothel der *Limp-2* Knock-out-Maus zeichnet sich durch hohe Heterogenität aus, bedingt durch die Ureterabgangsstenose im proximalen Teil des Ureters. Daher wurde zunächst in Kooperation mit R. Lüllmann-Rauch und I. Richling aus dem Anatomischen Institut Kiel das Blasenurothel von Wildtyp-Mäusen und *Limp-2* Knock-out-Mäusen mit dem Raster-Elektronen-Mikroskop untersucht. Das Blasenurothel unterscheidet sich von dem Ureterurothel dahingehend, dass die einzelnen Deckzellen der Blase von *Limp-2* defizienten Mäusen homogener sind und dadurch besser untersucht und verglichen werden können.

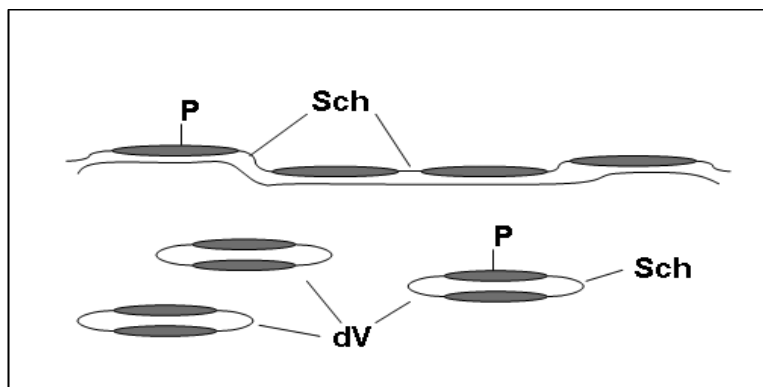


Abb. 27: Schematische Darstellung der Plaque-Verteilung im Urothel. Apikale Membran der Deckzellen in der gedehnten Blase im Elektronenmikroskopischen Schema. P – Plaques mit asymmetrischer Membran (übertrieben dick gezeichnet). Sch – “Scharniere”, die für die Beweglichkeit der Membranen beim Füllen und Leeren der Blase verantwortlich sind. dV – diskoidale/fusiforme Vesikel, die Uroplakin-Plaques beinhalten. Abbildung modifiziert nach Apodaca, 2004.

Bei den Analysen am Blasenurothel wurde eine charakteristische Veränderung in der Größe der Deckzellen *Limp-2* defizienter Blasen festgestellt. Die Plaques werden durch “Scharniere” verbunden, an denen während des Füllprozesses der Blase Membranen weiterer diskoider/fusiformer Vesikel eingefügt werden (Abb. 27).

In Aufsicht besitzen die normalen Deckzellen einen Durchmesser von bis zu 150 μm (Abb. 28 A, C und E, weiße Umrandung). Der Durchmesser der Deckzellen der *Limp-2* defizienten Blase ist wesentlich kleiner und variiert stark (Abb. 28 B, D und F, weiße Umrandung). Die kleinsten Zellen haben einen Durchmesser von nur 10 μm , die größten Zellen bis zu 150 μm (Abb. 28 F).

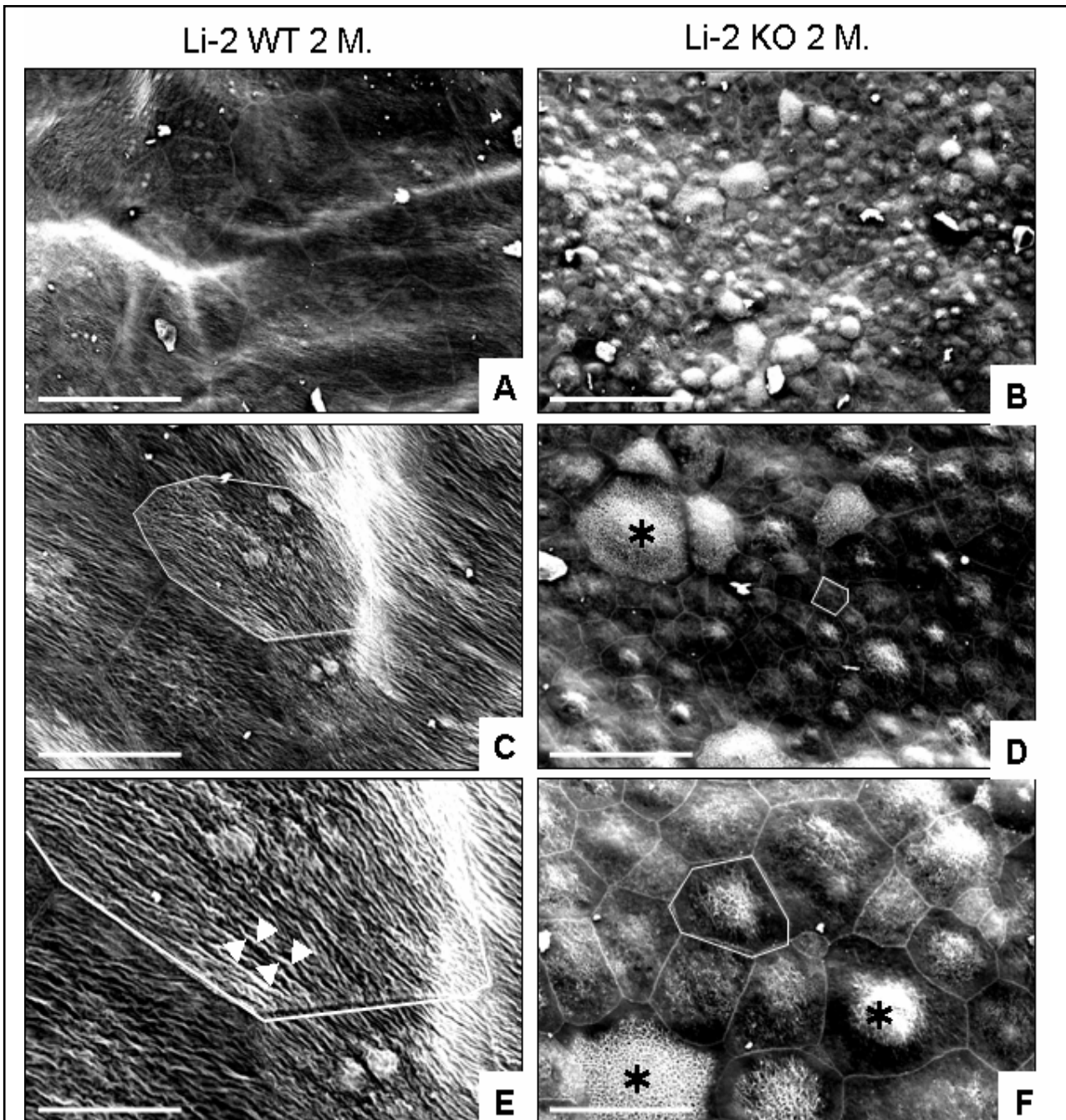


Abb. 28: Rasterelektronische Darstellung des Blasenurothels von 2 Monate alten Wildtyp-Mäusen und Limp-2 defizienten Mäusen bei jeweils identischer Vergrößerung. A + C + E zeigen das Urothel einer zwei Monate alten Wildtyp-Blase in Aufsicht. B + D + F zeigen das Urothel einer zwei Monate alten Limp-2 defizienten Blase in Aufsicht. In C - F ist die Ausdehnung jeweils einer Deckzelle mit weißen Linien nachgezeichnet. E – Markierung des Verlaufs einer "Falte", der typischen Struktur der Deckzellen in Aufsicht. D und F – Markierung der abnormalen Mikrovilli-artigen Strukturen an der apikalen Membran einiger Deckzellen mit einem Asterix. Maßstab Balken - A + B = 200 μm , C + D = 100 μm , E + F = 50 μm . Aufnahme von I. Richling.

Eine weitere mit dem Raster-Elektronenmikroskop sichtbare Veränderung ist in der Oberflächenstruktur erkennbar. Die normale Struktur der apikalen Schicht der

Deckzellen in Aufsicht ist faltig (Abb. 28 E, Pfeilköpfe). Die Deckzellen der Limp-2 defizienten Blasen verlieren größtenteils die charakteristischen Falten (Abb. 28 B, D und F) und es entwickeln sich Mikrovilli-artige Strukturen (Abb. 28 Asterix).

Die Querschnitte durch das Blasenurothel, zeigen die typischen diskoiden/fusiformen Vesikel (Abb. 29 A und C), die in den Deckzellen lokalisiert sind. In dem Limp-2 defizienten Urothel finden sich nur sehr wenig diskoide/fusiforme Vesikel. Die Deckzellen enthalten ausschließlich runde Vesikel (Abb. 29 B und D, rV), die vermutlich die typische diskoide/fusiforme Form durch den Rückgang an Uroplakinen verlieren. Außerdem kommen große Vakuolen (Durchmesser bis 60 μm) im Urothel der Limp-2 defizienten Mäuse vor, deren innere Membran der äußeren Membran der Deckzellen stark ähnelt (Abb. 29 E).

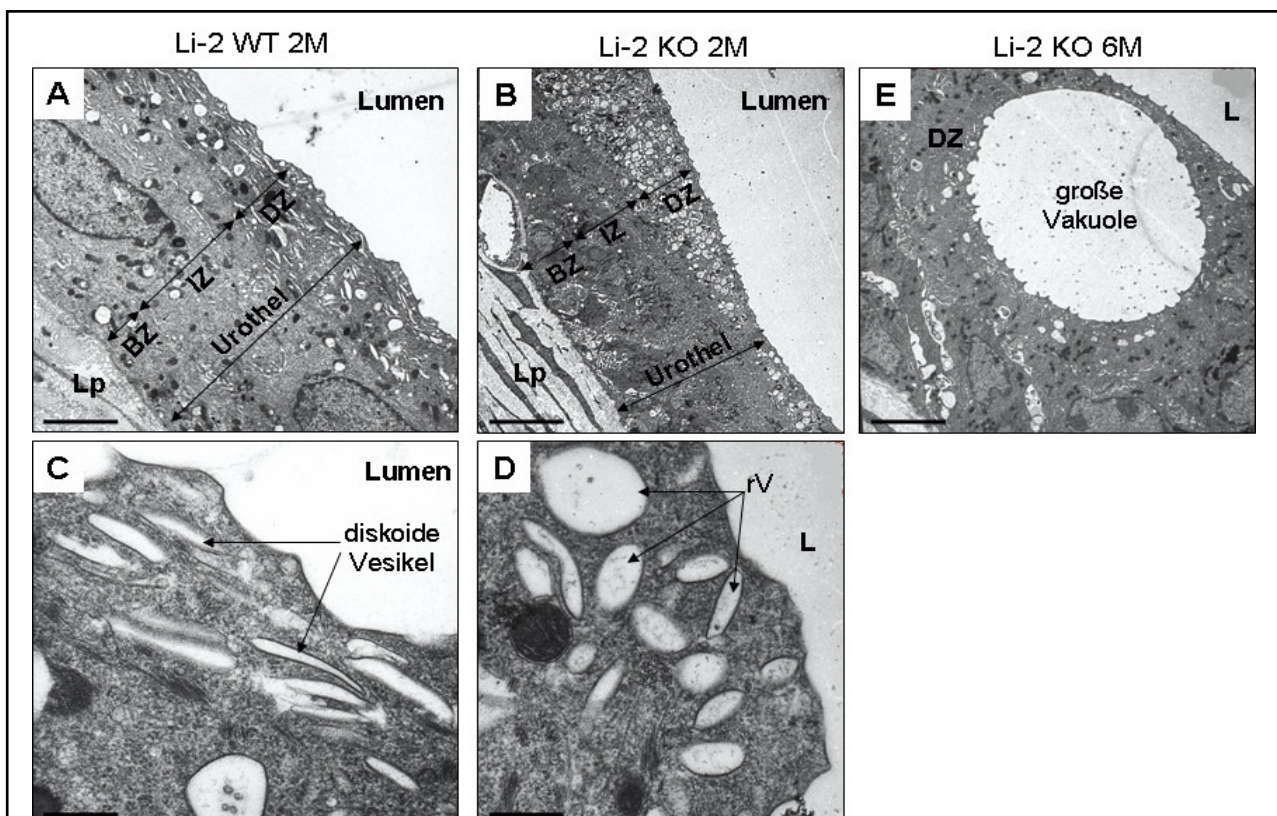
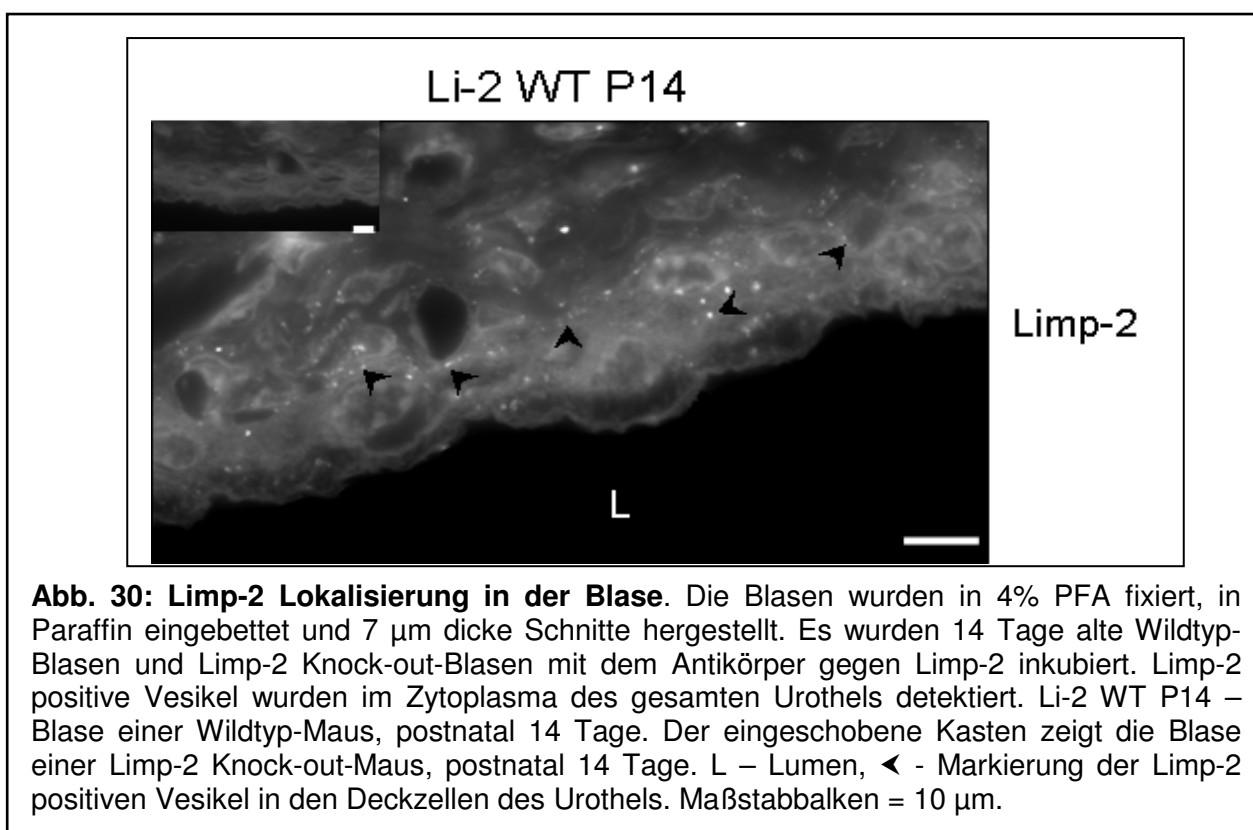


Abb. 29: Transmissions-Elektronen-mikroskopische Aufnahmen von Blasenepithelquerschnitten. A und C – Querschnitt durch das Blasenurothel einer zwei Monate alten Wildtyp-Maus (Li-2 WT 2M) mit den charakteristischen diskoiden/fusiformen Vesikeln in den Deckzellen, deren Membranen Uroplakin enthalten. B und D – Querschnitt durch das Blasenurothel einer zwei Monate alten Limp-2 defizienten Maus (Li-2 KO 2M) mit runden Vesikeln (rV) in den Deckzellen, die vermutlich kein oder nur noch geringe Mengen Uroplakin enthalten. E – Querschnitt durch das Blasenurothel einer sechs Monate alten Limp-2 Knock-out-Maus (li-2 6M) mit einer sehr großen Vakuole. Lp – Lamina propria, DZ – Deckzelle, IZ – Intermediärzelle, BZ - Basalzelle, L – Lumen der Blase. Maßstabbalken = 10 μm (A, B, E), 2 μm (C und D). Aufnahme: R. Lüllmann-Rauch

4.6.3.1 *Limp-2 Lokalisierung in der Blase*

Zur präzisen Lokalisierung von Limp-2 in der Blase wurden Blasenquerschnitte von Wildtyp-Mäusen und Limp-2 Knock-out-Mäusen mit dem Antikörper gegen Limp-2 inkubiert (s. 3.1.10). Limp-2 positive Partikel wurden in der Wildtyp-Blase im Zytoplasma des gesamten Urothels (Abb. 30, Pfeilköpfe) entdeckt. Zur Kontrolle der spezifischen Immunoreaktivität wurden Limp-2 defiziente Blasen mit dem Antikörper gegen Limp-2 gefärbt (Abb. 30, eingeschobener Kasten). Wie erwartet, konnte in der Blase aus der Limp-2 Knock-out-Maus kein Limp-2 gefunden werden.

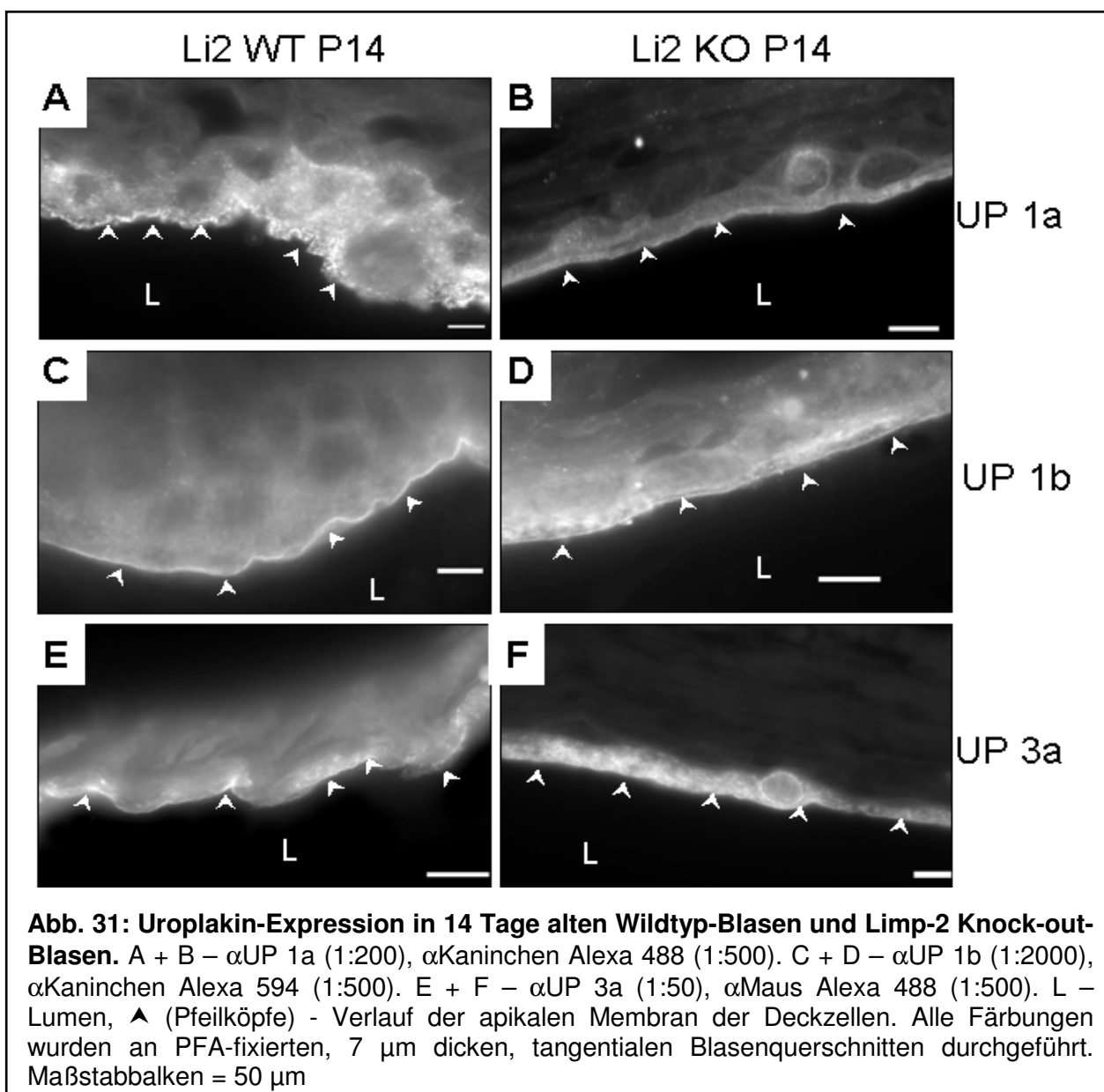


4.6.3.2 *Verteilung der verschiedenen Uroplakine im Blasenurothel*

Wie bereits in Abschnitt 4.6.2.1 erwähnt (Verteilung der Uroplakine im Ureter-Urothel), wurde wegen der Veränderungen in der Blase - Bildung kleiner Deckzellen und Verschwinden der charakteristischen faltigen Struktur - die Expression und Lokalisierung der Uroplakine im Blasenurothel in verschiedenen Alterstadien von postnatal 14 Tagen, drei Monaten und sechs Monaten untersucht. Die Abbildungen

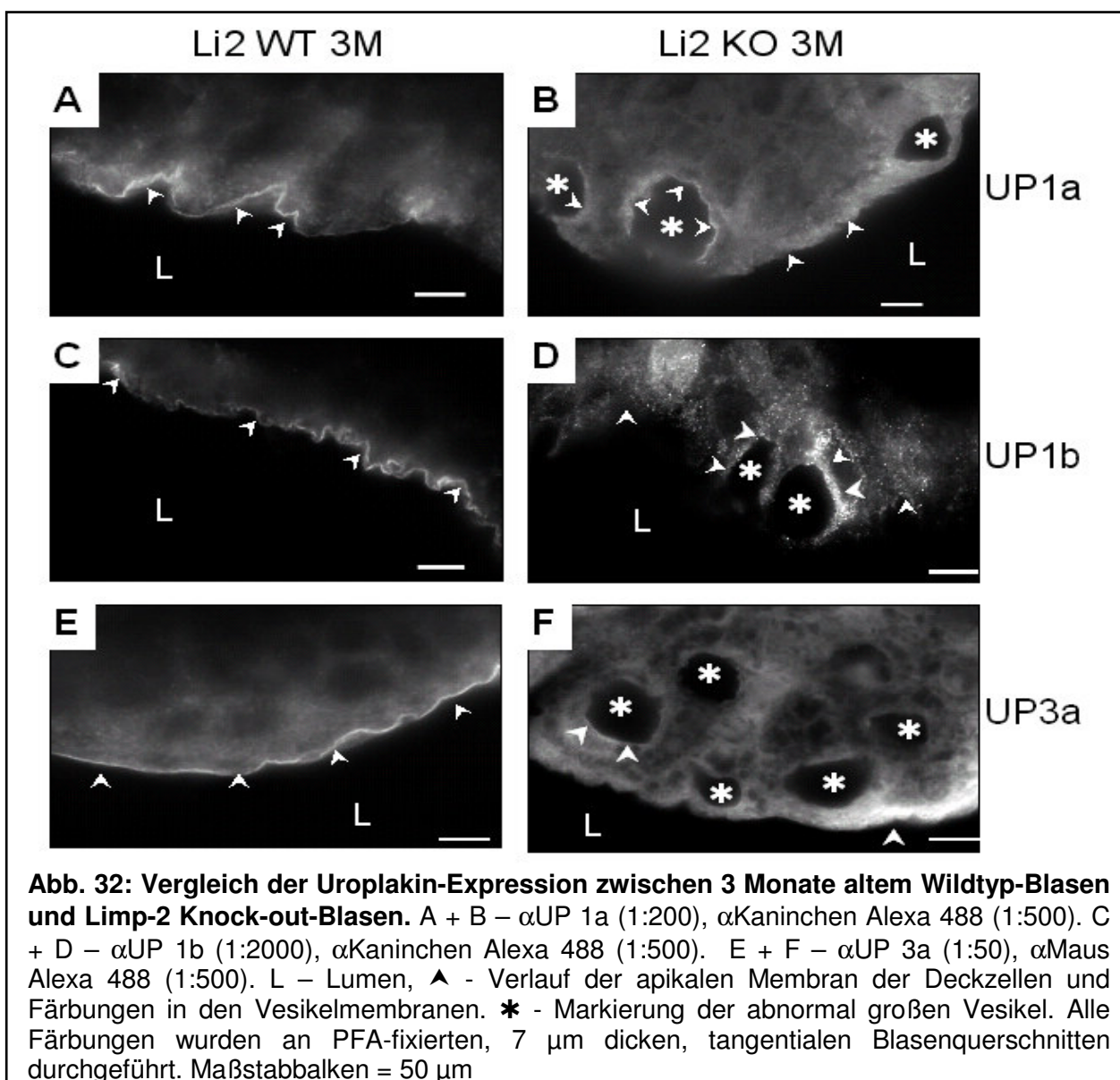
30, 31 und 32 zeigen 7 μm dünne, tangentielle Schnitte durch Blasengewebe von Mäusen unterschiedlichen Alters.

In der Lokalisierung der Uroplakine 1a (Abb. 31 A und B), 1b (Abb. 31 C und D) und 3a (Abb. 31 E und F) zeigten sich keine offensichtlichen Veränderungen in Blasen von 14 Tage alten Wildtyp-Mäusen und Limp-2 Knock-out-Mäusen. Die Uroplakine wurden größtenteils an der apikalen Membran der Deckzellen und im Zytoplasma (Abb. 31 A bis F, Pfeilköpfe) detektiert. Die Uroplakin 1b-Expression, nachgewiesen mit dem Westernblot Verfahren, ist im Alter von 14 Tagen postnatal bei beiden Genotypen etwa gleich (Daten nicht gezeigt).



In den Blasen drei Monate alter Limp-2 defizienter Mäuse sind die abnormen Vakuolen dargestellt, die einen Durchmesser von bis zu 60 μm haben (Abb. 32 B, C und D, Asterixe).

Uroplakin 1a (Abb. 32 A, Pfeilköpfe), 1b (Abb. 32 C, Pfeilköpfe) und 3a (Abb. E, Pfeilköpfe) sind in drei Monate alten Blasen von Wildtyp-Mäusen wie erwartet größtenteils in der apikalen Membran der Deckzellen lokalisiert. In den Limp-2 defizienten Blasen sind außer der apikalen Membran auch die Begrenzungen der großen Vakuolen mit Uroplakin 1a-positiven Strukturen versehen (Abb. 32 B, Pfeile). Uroplakin 1b-positive Strukturen im Urothel der Limp-2 Knock-out-Blasen erscheinen granulär über das gesamte Zytoplasma verteilt (Abb. 32 D, Asterixe und Pfeile) und sind außerdem an der apikalen Membran lokalisiert (Abb. 32 D, Pfeile).



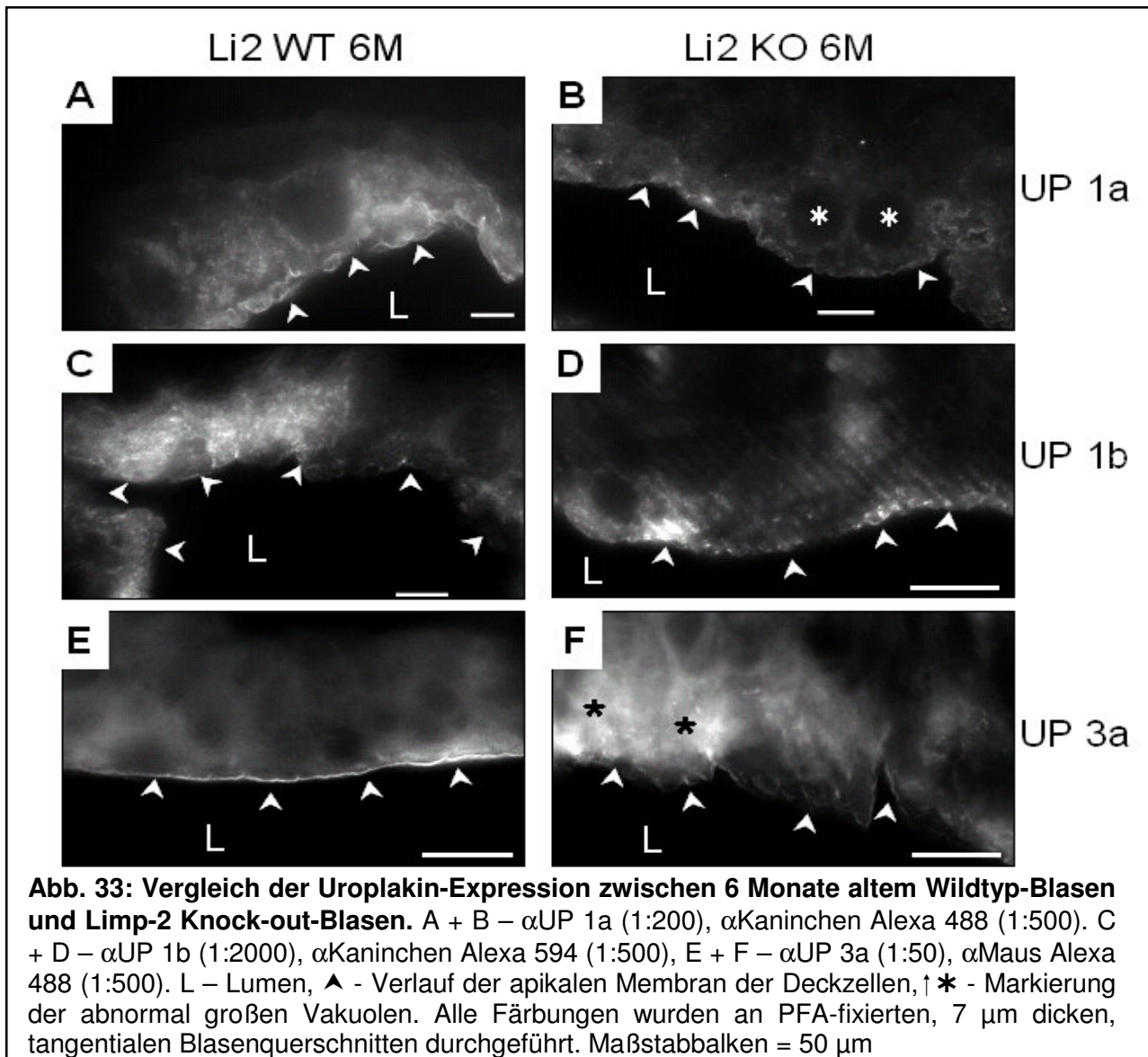
Im Alter von drei Monaten wurden Unterschiede in der Lokalisierung von Uroplakin 3a zwischen Wildtyp-Blase und Limp-2 Knock-out-Blase deutlich (Abb. 32 E und F). In der Limp-2 defizienten Blase wurde eine starke Reduktion der generellen und apikalen Uroplakin 3a-Expression festgestellt (Abb. 32 F, Pfeile). Die abnormen Vakuolen (Abb. 32 F, Asterixe) waren größtenteils frei von Uroplakin 3a, bis auf einige Bereiche der Vakuolenmembran, in denen noch Uroplakin 3a-Färbungen gezeigt werden konnten (Abb. 32 F, Pfeile).

Die großen Vakuolen in dem Blasenurothel sechs Monate alter Limp-2 Knock-out-Mäuse scheinen frei von Uroplakin 1a zu sein (Abb. 33 B, Asterixe). Die Lokalisierung von Uroplakin 1a in der apikalen Membran der Kontroll-Deckzellen und Limp-2 Knock-out-Deckzellen ist vermutlich nicht betroffen (Abb. 33 A und B, Pfeile).

Uroplakin 1b ist in dem Blasenurothel beider Genotypen an der apikalen Membran der Deckzellen lokalisiert (Abb. 31 C und D, Pfeile), konnte allerdings auch nicht in den Membranen der abnormen Vakuolen der Limp-2 defizienten Blasen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

In dem Limp-2 defizienten Blasenurothel erscheint die Expression von Uroplakin 3a in der apikalen Membran der Deckzellen niedriger (Abb. 33 F, Pfeile) als in den Deckzellen der Kontrolltiere (Abb. 33 E, Pfeile). Dagegen werden mehr Uroplakin 3a positive granuläre Strukturen im Zytoplasma des Limp-2 defizienten Urothels detektiert (Abb. 33 F, Asterixe).

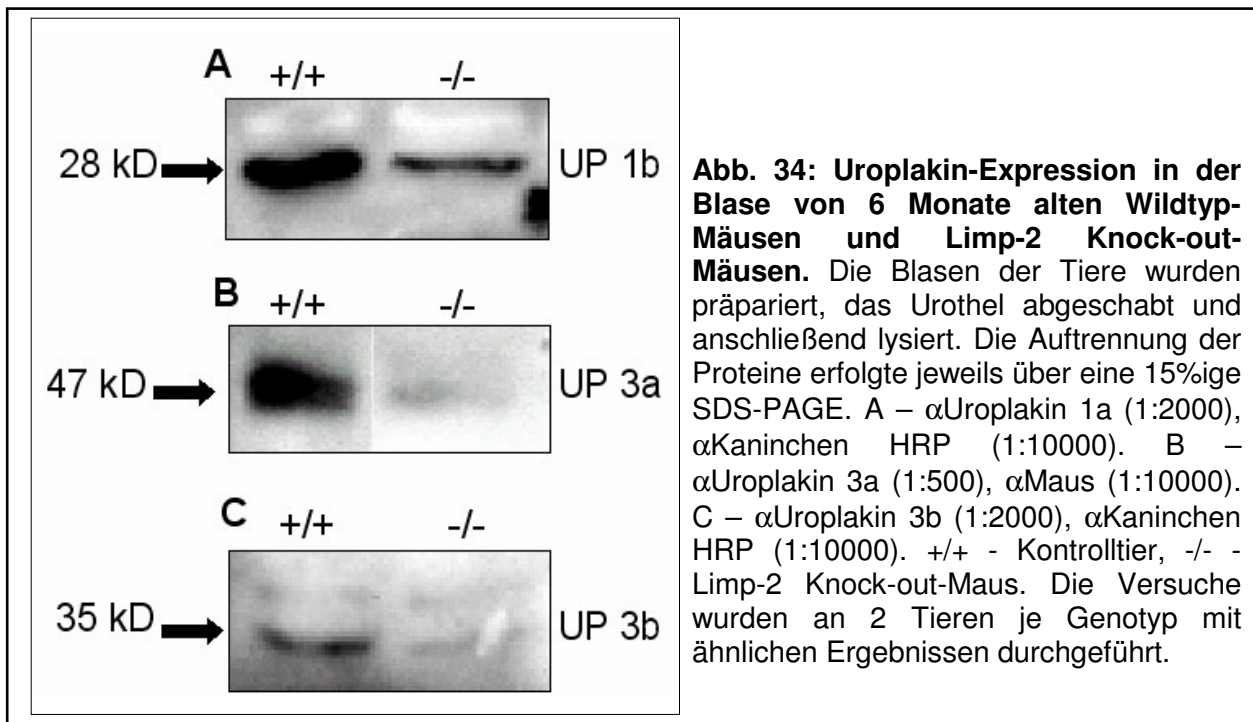
Bei Koloalisierungsstudien der Heterodimerpartner Uroplakin 3a und 1b konnten keine Unterschiede zwischen 14 Tage, drei und sechs Monate alten Blasen aus Kontroll-Mäusen und Limp-2 defizienten Mäusen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).



Mittels Westernblot Analyse wurde die Expression der Heterodimerpartner Uroplakine 3a/1b und 3b/1b in Wildtyp-Blasen und Limp-2 Knock-out-Blasen untersucht (Abb. 34). Die Expressionen der Uroplakine 1b, 1a, 3a und 3b in einem Monat alten Wildtyp-Blasenurothel und Limp-2 Knock-out-Blasenurothel zeigten keine Unterschiede zwischen den Genotypen (Daten nicht gezeigt). Im Alter von sechs Monaten wird eine starke Reduktion in der Expression von Uroplakin 3a und 3b im Blasenurothel Limp-2 defizienter Mäuse im Vergleich mit Wildtyp-Tieren festgestellt (Abb. 34 B und C).

Die Expression von Uroplakin 1b ist ebenfalls im Limp-2 defizienten Blasenurothel reduziert, allerdings nicht so stark wie bei den Uroplakinen 3a und 3b (Abb. 34 A). Zur

Kontrolle der gleichen Proteinmengen je Spur wurden die Membranen nach der Auswertung der jeweiligen Färbung mit Ponceau S gefärbt (Daten nicht gezeigt).



4.7 Limp-2 Defizienz führt zu Schwerhörigkeit mit nachfolgender Taubheit

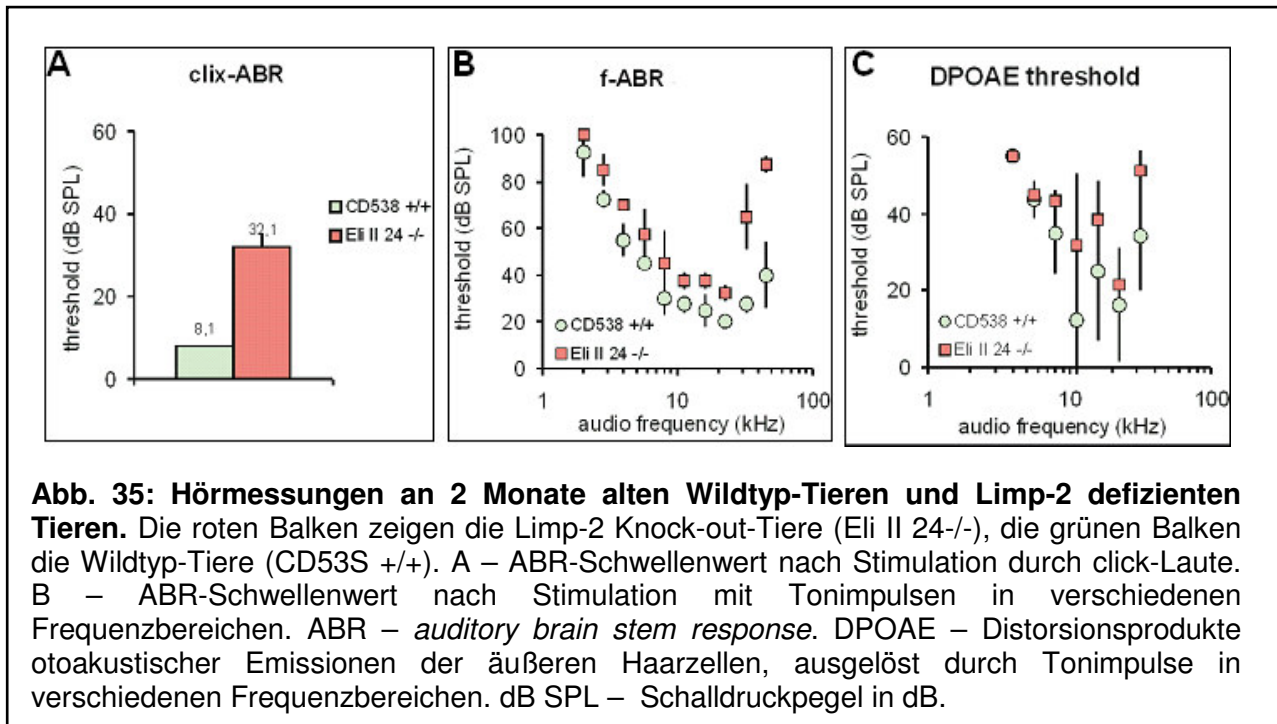
Ein weiteres Merkmal des Phänotyps der Limp-2 defizienten Maus ist die Entwicklung einer kompletten Taubheit in einem Alter von drei bis sieben Monaten (Gamp *et al.*, 2003). Der Hörverlust ist begleitet von der Atrophierung der Stria vascularis beginnend im Alter von zwei Monaten. Die Stria vascularis ist für die Kaliumkonzentration in der Endolymphe und die Ausbildung des endocochlearen Potentials verantwortlich (Wangemann, 1997). In der postnatalen Entwicklung (ca. im siebten Lebensmonat) kommt es zur Reduktion und schließlich zum völligen Verlust der äußeren und inneren Haarzellen. Im Alter von neun Monaten wurde eine Degeneration der Spiralganglien beobachtet (Gamp *et al.*, 2003).

4.7.1 Hörmessungen

Die Diagnostik und die Ermittlung des Hörverlusts wurden über verschiedene physiologische Untersuchungen des Gehörs der Mäuse in Kooperation mit Prof. M. Knipper an dem Hörzentrum der Universität Tübingen durchgeführt.

Abbildung 35 beschreibt die Hörmessungen an zwei Monate alten Wildtyp-Mäusen und Limp-2 defizienten Mäusen. Bei der *clix*- und *f*-ABR Methode (*auditory brainstem response*) wird die allgemeine Funktion des Gehörs durch die Reaktionen von Hirnströmen und Hörnerven getestet, die mit akustischen Signalen in Form von Klick (*clix*) und Tonimpulsen (*f*) provoziert werden (Knipper *et al.*, 2000; Brunner und Nöldeke, 2001; Gwènaëlle *et al.*, 2003). Während die Nerven der Wildtyp-Tiere auf Klick-Signale von 8.1 dB reagieren (Abb. 35 A, grüner Balken), benötigt die Reizleitung in Limp-2 defizienten Tieren bereits im Alter von zwei Monaten eine Stimulation von 32.1 db, das 4-fache des Üblichen (Abb. 35 A, roter Balken). Mittels der Tonimpulse (*f*-ABR) kann bewiesen werden, wie weit die Taubheit fortgeschritten ist und in welchen Bereichen der Cochlea ein Hörschaden vorliegt, da zu Beginn der Hörverlust im Allgemeinen im hoch-frequenten Bereich stattfindet. In dem Fall der zwei Monate alten untersuchten Tiere ist der Beginn des Hörverlustes zu erkennen, da die Limp-2 defizienten Tiere in höher-frequenten Bereichen von 30-50 kHz schlechter hörten und erst bei 50-80 bzw. 80-90 db reagierten (Abb. 35 B, rote Kästen). Die Distorsionsprodukte otoakustischer Emissionen (DPOAE) sind Schallsignale (Echos), die in den äußeren Haarzellen als Reaktion auf akustische Reize entstehen (Gwènaëlle *et al.*, 2003). Ausgelöst werden diese Schallsignale durch unterschiedliche Tonfrequenzen im dB-Bereich, die extern zugegeben werden. Bei Normalhörenden sind diese verzögerten Emissionen zu 98% vorhanden. Ab einem Hörverlust von 25 dB verschwinden diese Emissionen, so dass eine Schwerhörigkeit mit dieser Methode festgestellt werden kann (Brunner und Nöldeke, 2001). Bei den DPOAE-Messungen ab 10 kHz variierten die Werte beider Genotypen sehr stark, was darauf schließen lässt, dass sich die Degenerierung der äußeren Haarzellen erst im Anfangsstadium befindet und nicht bei jedem Limp-2 defizienten Tier gleich weit fortgeschritten ist (Abb. 35 C). Um zu ermitteln in welchem Alter der Hörverlust beginnt, wurden die hier beschriebenen Hörmessungen an einen Monat alten Wildtyp-Tieren und Limp-2 Knock-out-Tieren durchgeführt (n = 6). Es wurde festgestellt, dass sich die Limp-2 Knock-out-Mäuse im Alter von einem Monat in zwei

Gruppen aufteilen. Eine Gruppe zeigt bereits Hörschäden ($n = 3$), die mit den Daten der zwei Monate alten Tiere (Abb. 35) übereinstimmen, während bei der anderen Gruppe ($n = 3$) im Alter von einem Monat normales Hörvermögen festgestellt wurde. Diese Mäuse entwickelten erst im Alter von 2.5 Monaten die charakteristischen Hörschäden, die durch die Limp-2 Defizienz entstehen (Daten nicht gezeigt).



4.7.2 Mikroskopische Untersuchungen der Cochlea

4.7.2.1 Veränderungen im Corti-Organ Limp-2 defizienter Mäuse

Die mikroskopischen Untersuchungen des Corti-Organs wurden teilweise in Kooperation mit R. Lüllmann-Rauch am Anatomischen Institut Kiel durchgeführt. Im Corti-Organ befinden sich die äußeren und inneren Haarzellen. Im Alter von vierzehn Monaten ist das Corti-Organ Limp-2 defizienter Tiere im ursprünglichen Zustand nicht mehr vorhanden (Abb. 36 B). Die äußeren Haarzellen (Abb. 36 A, 1) sind komplett verschwunden (Abb. 36 B, 1 gestrichelter Bereich) und die Deiters-Zellen, auf denen die äußeren Haarzellen sitzen, sind ebenfalls atrophiert (Abb. 36 B). Die innere Haarzelle (Abb. 36 A, 2) fehlt ebenfalls (Abb. 36 B, 2). Die afferenten Nervenfasern, die die inneren Haarzellen innervieren und durch die Habenula perforata (Abb. 36 A und B, 4) zum Spiralganglion ziehen, sind weitgehend

verschwunden. Die Neurone des Spiralganglions (Abb. 36 A und B, 5), die das erste Neuron der Hörbahn darstellen, sind zahlenmäßig stark reduziert (Abb. 36 B, 5).

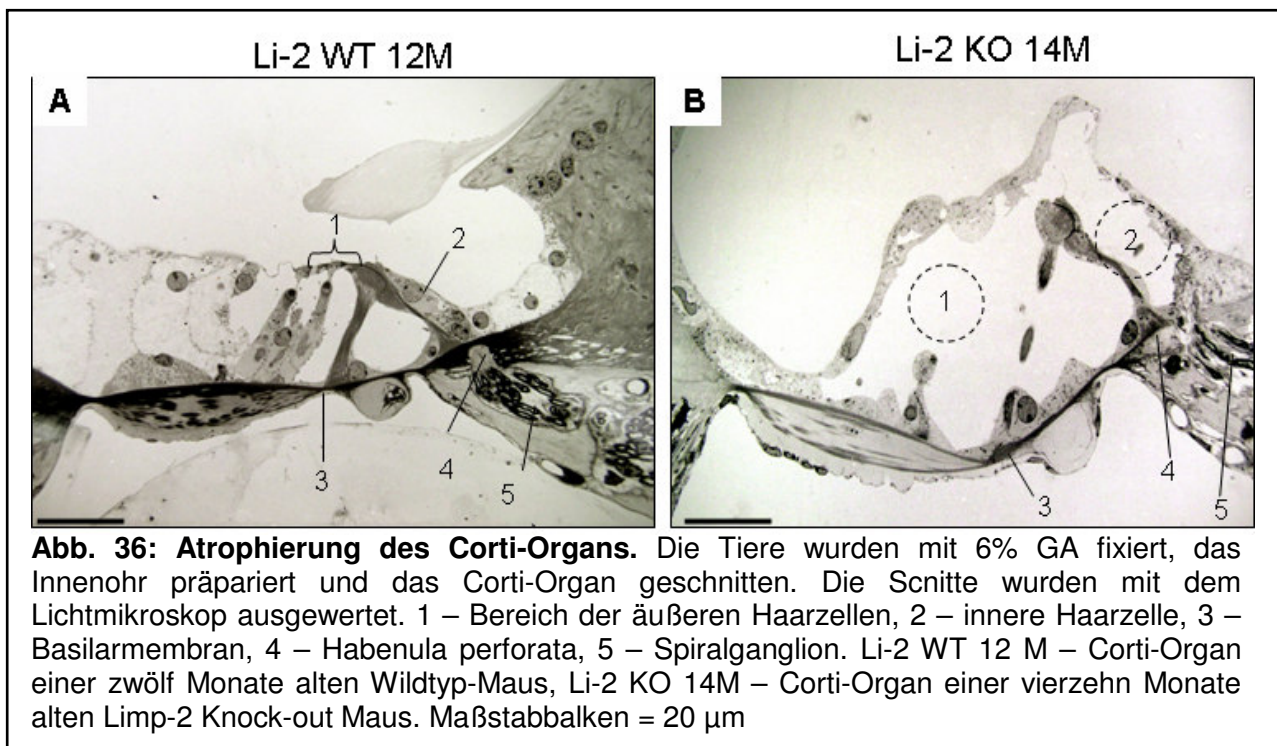


Abb. 36: Atrophierung des Corti-Organs. Die Tiere wurden mit 6% GA fixiert, das Innenohr präpariert und das Corti-Organ geschnitten. Die Schnitte wurden mit dem Lichtmikroskop ausgewertet. 1 – Bereich der äußeren Haarzellen, 2 – innere Haarzelle, 3 – Basilarmembran, 4 – Habenula perforata, 5 – Spiralganglion. Li-2 WT 12 M – Corti-Organ einer zwölf Monate alten Wildtyp-Maus, Li-2 KO 14M – Corti-Organ einer vierzehn Monate alten Limp-2 Knock-out Maus. Maßstab balken = 20 μ m

Aufgrund des stark reduzierten endocochlearen Potentials im Innenohr der Limp-2 defizienten Mäuse (Gamp *et al.*, 2003) wurden die Kaliumkanäle im Corti-Organ teilweise in Kooperation mit M. Knipper untersucht (Abb. 37).

Die Kaliumkanäle KCNQ4 und KCNJ10 (auch Kir 4.1 genannt) gehören zu den Kaliumkanälen, die aktiv am Kreislauf der Kaliumionen in der Cochlea beteiligt sind und dadurch indirekt an der Bildung des endocochlearen Potentials beteiligt sind (Wangemann, 1997).

Der Kalium-sezernierende Kanal KCNQ4 ist ein spezifisches Protein der äußeren Haarzellen (Ikeda *et al.*, 2004), während KCNJ10 neben den äußeren Haarzellen auch in den Intermediärzellen der Stria vascularis exprimiert wird (Takeuchi und Ando, 1999; Wangemann *et al.*, 2004). Bei der Untersuchung der Kaliumkanäle KCNQ4 (Abb. 37 A und B) und KCNJ10 (Abb. 37 D und E) im Corti-Organ von zwei Monate alten Wildtyp-Tieren und Limp-2 defizienten Tieren wurden keine Veränderungen zwischen den Genotypen festgestellt (Abb. 37 C-D, Pfeilköpfe).

Ein weiteres für den Hörvorgang essentielles Protein in dem Corti-Organ ist das Motorprotein Prestin (Zheng *et al.*, 2000; Wangemann *et al.*, 2004), das in den

lateralen Membranen der äußeren Haarzellen lokalisiert ist (Zuo, 2002). Prestin ist für die Elektromotilität der äußeren Haarzellen verantwortlich. Um zu klären, ob der Hörverlust der *Limp-2* Knock-out-Mäuse mit einem Verlust der Prestin-Expression einhergeht und letztendlich zum Verlust der Elektromotilität führt (Gwènaëlle *et al.*, 2003), wurde das Corti-Organ mit einem Antikörper gegen Prestin inkubiert. Dabei zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede zwischen zwei Monate alten Wildtyp-Mäusen und *Limp-2* defizienten Mäusen (Daten nicht gezeigt).

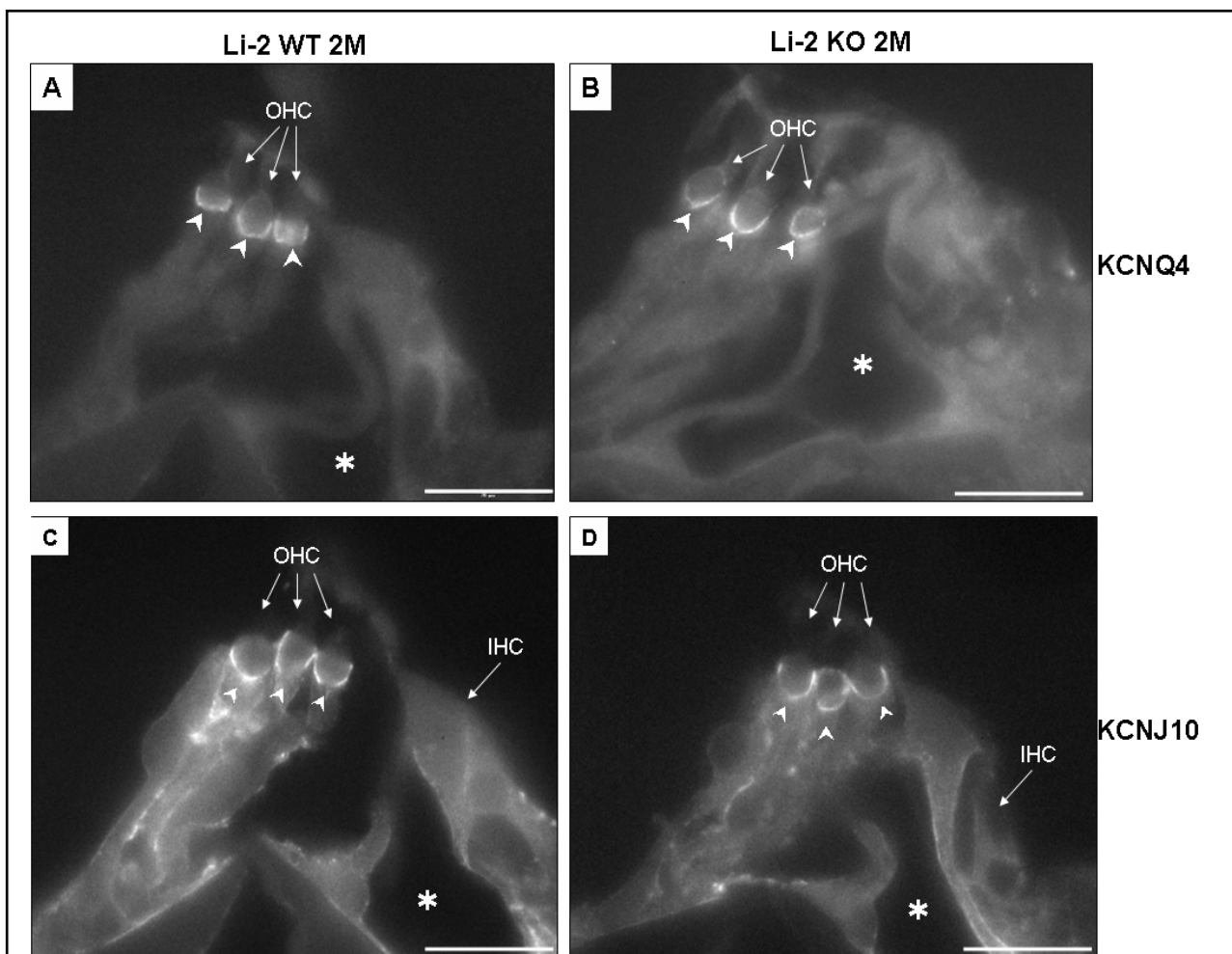


Abb. 37: Nachweis der Kaliumkanäle KCNQ4 und KCNJ10 (Kir 4.1) im Corti-Organ. Zwei Monate alte Tiere wurden mit PFA fixiert und in Paraffin eingebettet. Die daraus hergestellten 7 μ m dicken Schnitte wurden entparaffiniert und mit den Antikörpern gegen KCNQ4 und KCNJ10 inkubiert. Der Erstantikörper wurde mit einem Alexa 594 gekoppelten Zweitantikörper detektiert. OHC – äußere Haarzellen (*outer hair cells*), IHC – innere Haarzelle (*inner hair cell*), \blacktriangleright - Markierung der KCNQ4/KCNJ10-Lokalisierung in den äußeren Haarzellen, * – Corti-Tunnel (innerer Tunnel). Maßstabbalken = 20 μ m, Aufnahmen: M. Knipper

4.7.2.2 **Veränderungen der Stria vascularis Limp-2 defizienter Mäuse**

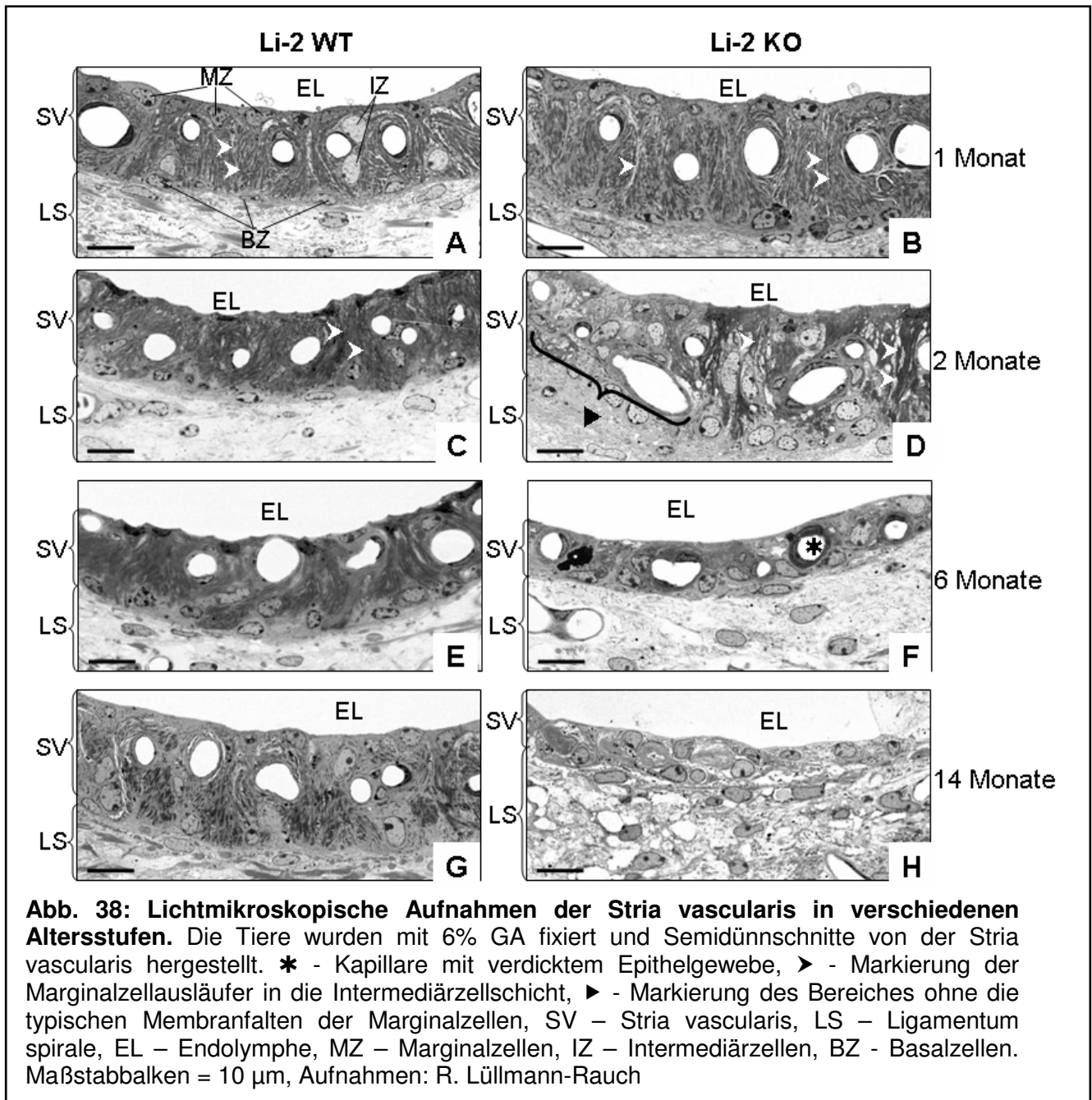
Die Taubheit Limp-2 defizienter Tiere beginnt wahrscheinlich mit dem Verlust Kalium-sezernierender Kanäle in den Marginalzellen der Stria vascularis (Gamp *et al.*, 2003). Die Stria vascularis besteht aus drei Zellschichten und besitzt eine Vielzahl an Kapillaren, auf die sich ihr Name gründet (Wangemann, 1997). Die Zellschicht, die direkt an die Endolymphe grenzt, besteht aus den Marginalzellen, die charakteristische Zellausläufer in das Innere der Stria aufweisen. Abgegrenzt wird die Stria vascularis von dem Ligamentum spirale durch eine Schicht aus Basalzellen. Zwischen Marginal- und Basalzellen liegen die Intermediärzellen, die mit den Basalzellen kooperiert (Wangemann, 1997). Die Stria vascularis hat eine doppelte Funktion, die Sekretion von Kaliumionen in die Endolymphe und die Erzeugung des endocochlearen Potentials. Beide Funktionen sind essentiell für den Hörvorgang (Wangemann, 1997).

Durch lichtmikroskopische Untersuchungen an Semi-Dünnschnitten der Stria vascularis von Wildtyp-Mäusen und Limp-2 Knock-out-Mäusen verschiedener Altersstufen (1-14 Monate) konnte gezeigt werden, dass die Stria vascularis der Limp-2 defizienten Tiere mit zunehmendem Alter ihre charakteristische Struktur verliert (Abb. 38).

In den jüngsten untersuchten Altersstufen von 14 Tagen postnatal (Daten nicht gezeigt) und einen Monat alten Wildtyp-Mäusen und Limp-2 Knock-out-Mäusen sind keine Unterschiede in Höhe und Struktur der Dreischichtigkeit und der Morphologie der Zellen der Stria vascularis zu erkennen (Abb. 38 A und B). Im Alter von zwei Monaten zeigen sich die ersten degenerativen Veränderungen. Die Marginalzellen beginnen die typischen Ausläufer in die Intermediärzellschicht zu verlieren (Abb. 38 D, Pfeilkopf und Abb. 39 A). Andere Bereiche derselben Stria vascularis besitzen noch die Ausläufer der Marginalzellen, die mit den Ausläufern der Intermediärzellen überlappen (Abb. 38 D, Pfeilköpfe und Abb. 39 A). Eine ultrastrukturelle Veränderung der Limp-2 defizienten Stria vascularis ist das Vorkommen von starren, leeren Spalten im Zytoplasma der Marginalzellen (Abb. 39 B, Asterixe). Die Entstehung und Natur dieser Formationen ist unbekannt.

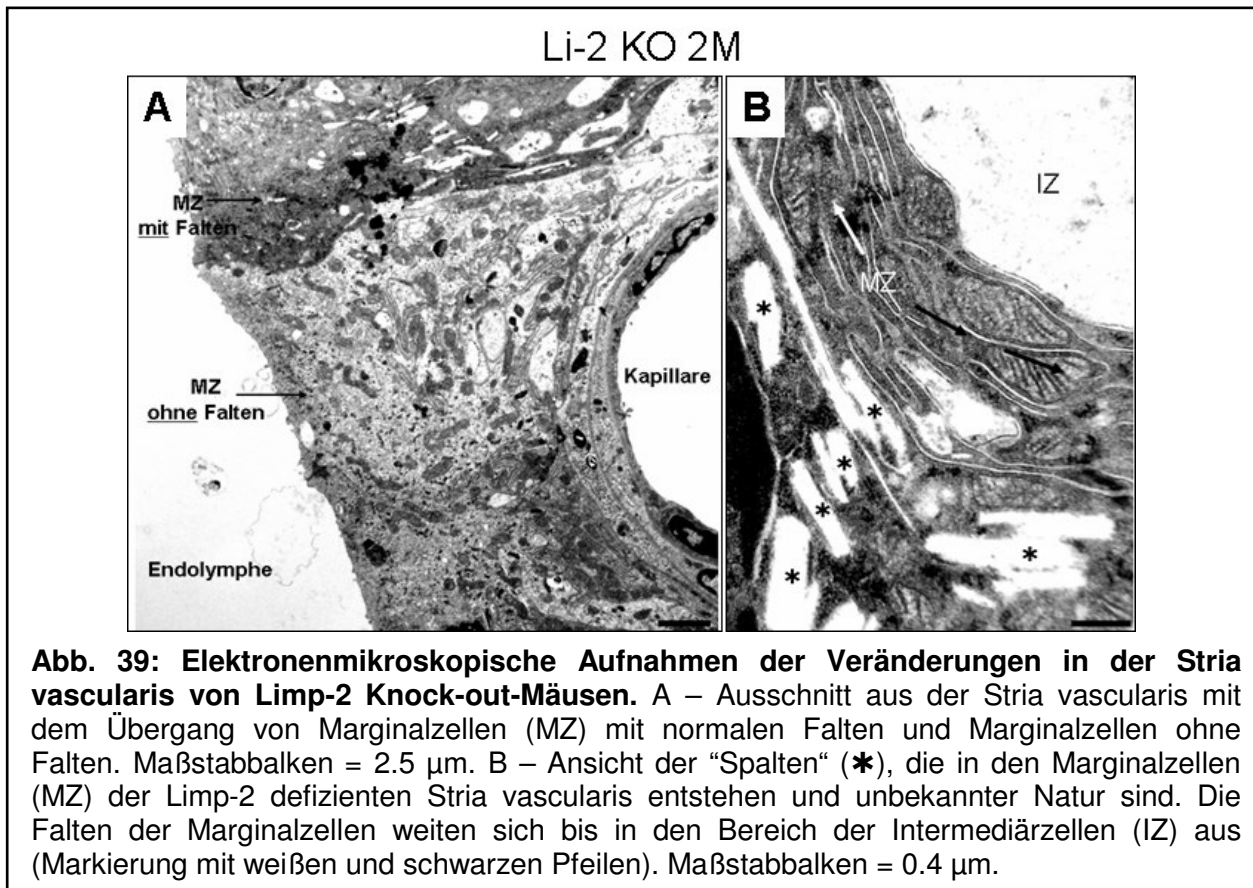
Im Alter von sechs Monaten ist die Degeneration der Stria vascularis Limp-2 defizienter Tiere deutlich erkennbar (Abb. 38 E und F). Die Ausläufer der

Marginalzellen sind kaum noch vorhanden und die Höhe der Stria vascularis ist um etwa die Hälfte reduziert (Abb. 38 F).



Eine weitere Veränderung ist im Bereich der Kapillaren zu sehen. Dort findet man abnorme Ablagerungen von Extrazellulärmatrix um die Kapillaren, wie schon von Gamp et al. (2003) beschrieben (Abb. 38 F, Asterix). Im Alter von vierzehn Monaten (Abb. 38 G und H) ist die Stria vascularis der Limp-2 Knock-out-Maus vollständig degeneriert. Sie besitzt keinerlei Dreischichtigkeit und Kapillaren mehr und

unterscheidet sich wenig von dem darunter liegenden Ligamentum spirale (Abb. 38 H).

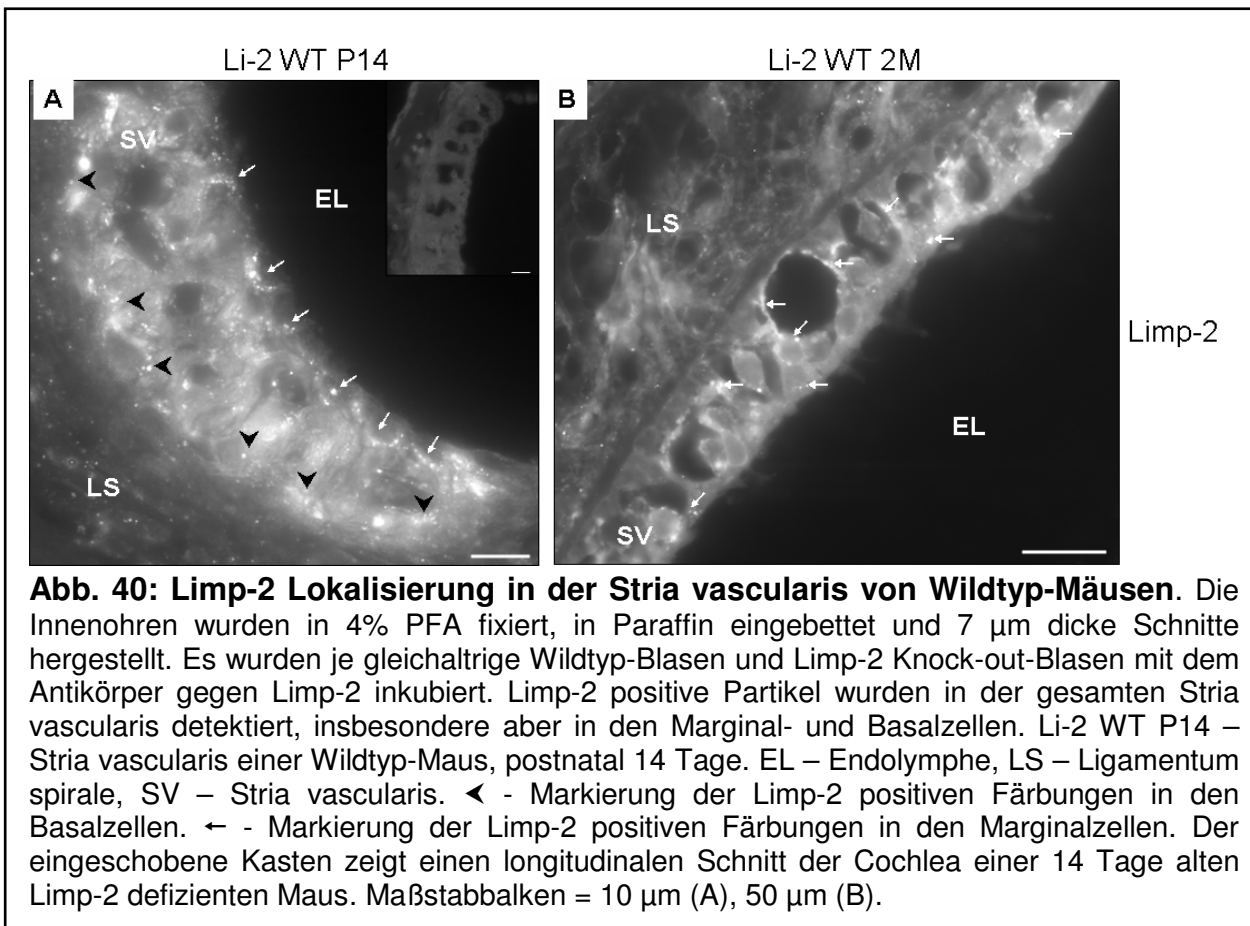


4.7.2.3 *Limp-2* Lokalisierung in der Stria vascularis

Zur präzisen Lokalisierung von *Limp-2* in der Stria vascularis wurden Querschnitte von Wildtyp-Mäusen und *Limp-2* Knock-out-Mäusen mit dem Antikörper gegen *Limp-2* inkubiert (Abb. 40).

Limp-2 positive Partikel werden in der gesamten Stria vascularis aus 14 Tage und zwei Monate alten Wildtyp-Mäusen detektiert (Abb. 40 A und B). In den 14 Tage alten Wildtyp-Tieren befinden sich *Limp-2* positive Partikel perinuklear in den Marginalzellen (Abb. 40 A, Pfeile) und in den Basalzellen (Abb. 40 A, Pfeilköpfe). Bei zwei Monate alten Wildtyp-Mäusen hat sich die *Limp-2* Lokalisierung geändert (Abb. 40 B): im Bereich der Marginalzellen können nur in einigen Zellen *Limp-2* positive Punkte entdeckt werden. Der Großteil von *Limp-2* wird im Bereich der Basal- und Intermediärzellen nachgewiesen (Abb. 40 B, Pfeile). Zur Kontrolle der spezifischen Immunreaktivität wurde die Stria vascularis *Limp-2* defizienter Mäuse mit dem

Antikörper gegen Limp-2 gefärbt. Wie erwartet, kann in dem Innenohr der Limp-2 Knock-out-Maus kein Limp-2 detektiert werden (Abb. 40 A, eingeschobener Kasten).



4.7.2.4 Nachweis verschiedener Proteine in der Stria vascularis

Aufgrund der Reduzierung des endocochlearen Potentials in Limp-2 defizienten Tieren (Gamp *et al.*, 2003) wurden nach den Kaliumkanälen im Corti-Organ auch die Kaliumkanäle in der Stria vascularis untersucht, teilweise in Kooperation mit M. Knipper am Hörzentrum Tübingen. Das Kalium wird von der Stria vascularis über spezifische Kanäle in der apikalen Membran der Marginalzellen sezerniert. Der wichtigste Kanal ist dabei das Heterodimer aus KCNQ1 und KCNE1 (Abb. 41; Vetter *et al.*, 1996).

KCNE1 ist ein kleines glykosyliertes Transmembranprotein, das die Membran einmal durchspannt und eine Untereinheit von KCNQ1 darstellt. KCNQ1 ist ein größeres Transmembranprotein mit sechs Transmembrandomänen (Warth und Barhanin,

2002). Beide Proteine interagieren miteinander und formen einen funktionellen Kaliumkanal (Sanguinetti, 2000).

Zur Untersuchung dieses Kanals in der Stria vascularis von Wildtyp-Tieren und Limp-2 defizienten Tieren wurden die Innenohren von 14 Tage postnatal bis drei Monate alten Tieren mit dem Antikörper gegen KCNQ1 (Abb. 41 A und B) oder KCNE1 inkubiert (Abb. 41 C und D). Bereits im Alter von 14 Tagen postnatal wurde eine unterschiedliche Lokalisierung von KCNQ1 in der apikalen Membran der Marginalzellen festgestellt (Abb. 41 A und B). In den Marginalzellen der Limp-2 defizienten Stria vascularis sind mehrere Bereiche der apikalen Membran frei von KCNQ1-positiven Strukturen (Abb. 41 B, Pfeilköpfe), während bei den Wildtyp-Tieren die apikale Membran durchgehend mit KCNQ1 bedeckt ist (Abb. 41 A, Pfeilköpfe).

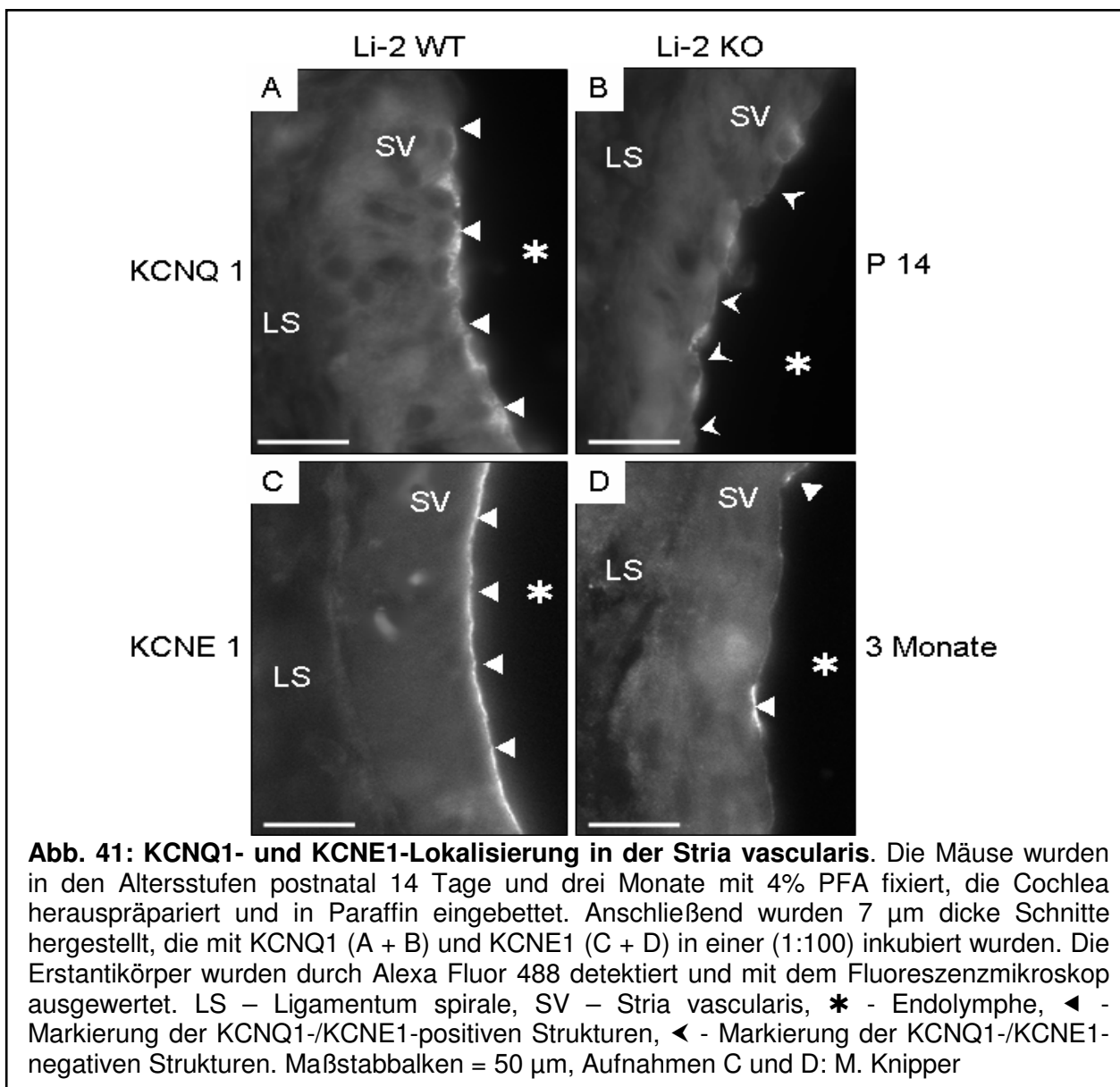


Abb. 41: KCNQ1- und KCNE1-Lokalisierung in der Stria vascularis. Die Mäuse wurden in den Altersstufen postnatal 14 Tage und drei Monate mit 4% PFA fixiert, die Cochlea herauspräpariert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden 7 μ m dicke Schnitte hergestellt, die mit KCNQ1 (A + B) und KCNE1 (C + D) in einer (1:100) inkubiert wurden. Die Erstantikörper wurden durch Alexa Fluor 488 detektiert und mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. LS – Ligamentum spirale, SV – Stria vascularis, * - Endolymphe, \blacktriangle - Markierung der KCNQ1-/KCNE1-positiven Strukturen, \blacktriangleleft - Markierung der KCNQ1-/KCNE1-negativen Strukturen. Maßstabballen = 50 μ m, Aufnahmen C und D: M. Knipper

Die indirekte Immunfluoreszenz von KCNQ1 an der 14 Tage alten Stria vascularis wurde an sechs verschiedenen Limp-2 defizienten Tieren und fünf Wildtyp-Tieren durchgeführt, um eine eventuelle Entwicklungsverzögerung in der Expression von KCNQ1/KCNE1 auszuschließen (Daten nicht gezeigt), da das Gehör von Mäusen erst etwa nach 30 Tagen postnatal ausgewachsen ist (Zuo, 2002). Im Alter von drei Monaten ist nur an einigen Stellen in den Marginalzellen der Limp-2 Knock-out-Maus KCNE1 (Abb. 41 D, offener Pfeilkopf) und KCNQ1 (nicht gezeigt) nachweisbar, während in der Stria vascularis der Wildtyp-Maus die apikale Membran, die an die Endolymphe grenzt, vollständig gefärbt ist (Abb. 41 C, geschlossene Pfeilköpfe). Des Weiteren wurden in Zusammenarbeit mit M. Knipper vom Hörzentrum Tübingen eine niedrigere Expression der Kanäle KCNJ10 und Kv 1.1 in der Stria vascularis von drei Monate alten Limp-2 defizienten Mäusen im Vergleich mit Wildtyp-Tieren nachgewiesen (Abb. 42).

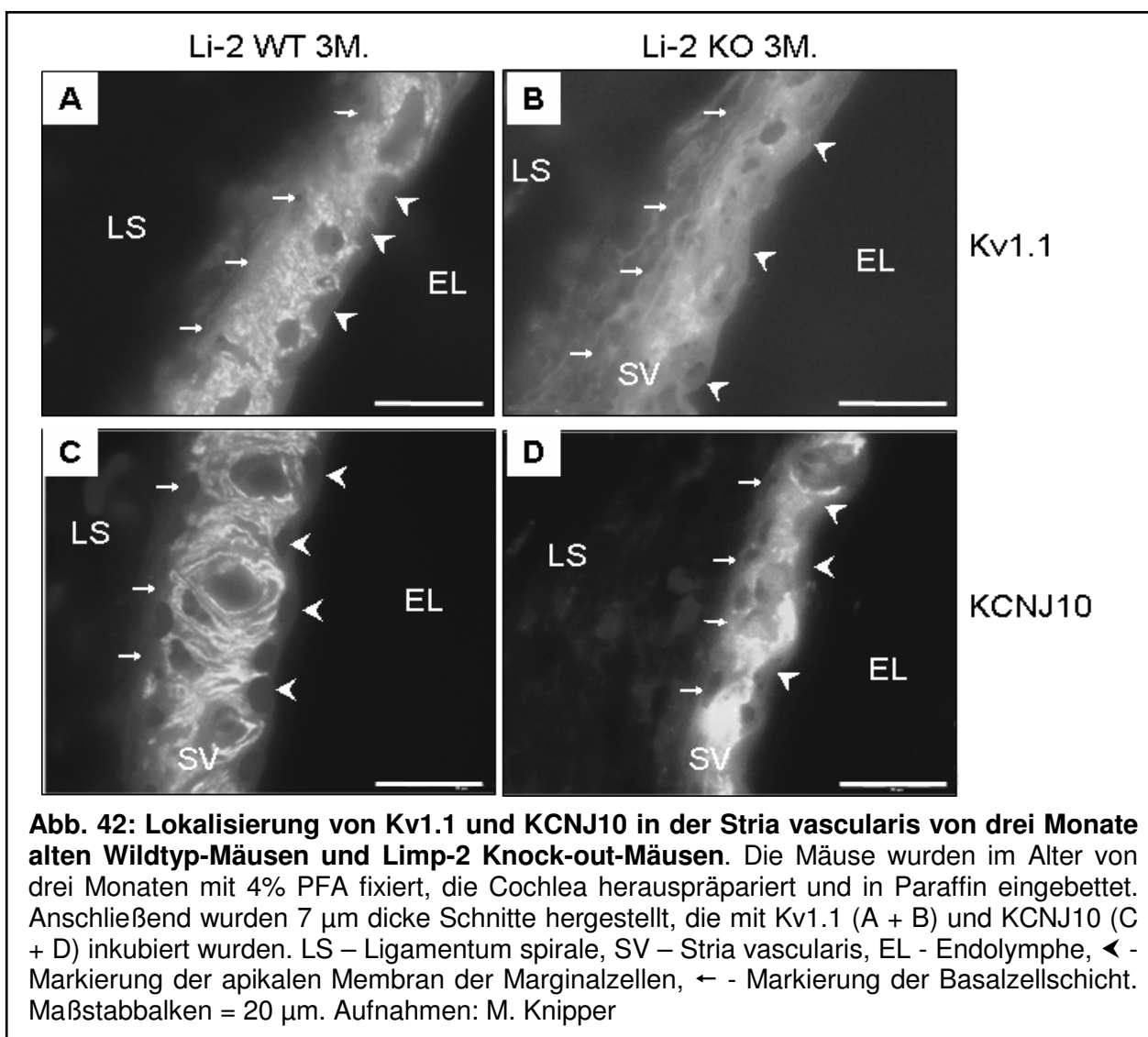


Abb. 42: Lokalisierung von Kv1.1 und KCNJ10 in der Stria vascularis von drei Monate alten Wildtyp-Mäusen und Limp-2 Knock-out-Mäusen. Die Mäuse wurden im Alter von drei Monaten mit 4% PFA fixiert, die Cochlea herauspräpariert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden 7 µm dicke Schnitte hergestellt, die mit Kv1.1 (A + B) und KCNJ10 (C + D) inkubiert wurden. LS – Ligamentum spirale, SV – Stria vascularis, EL - Endolymphe, ◀ - Markierung der apikalen Membran der Marginalzellen, ← - Markierung der Basalzellschicht. Maßstababalken = 20 µm. Aufnahmen: M. Knipper

Kv 1.1 ist ein spannungsabhängiger Kaliumkanal, der im Corti-Organ, in der Stria vascularis und in den Spiralganglien exprimiert wird (Gubitosi-Klug *et al.*, 2005). In der Stria vascularis ist Kv1.1 in den Intermediärzellen und Basalzellen lokalisiert (Abb. 42 A), im Corti-Organ in den äußeren Haarzellen (Daten nicht gezeigt). Kv1.1 ist wie alle anderen Kaliumkanäle in der Cochlea am Kaliumionen-Kreislauf beteiligt (Zuo, 2002). In der Limp-2 defizienten Stria vascularis ist die Expression des KV1.1 Kanals deutlich reduziert (Abb. 42 B).

KCNJ10 ist ein Kaliumkanal, der in den Intermediärzellen der Stria vascularis lokalisiert ist (Abb. 42 C und D) und Kaliumionen von den Intermediärzellen in den intrastrialen Raum sezerniert. Bei dem Verlust dieses Kanals kommt es zu einem Zusammenbruch des endocochlearen Potentials und folgendem Hörverlust (Marcus *et al.*, 2001; Wangemann *et al.*, 2004).

KCNJ10 scheint in den Intermediärzellen der Limp-2 defizienten Stria vascularis etwas reduzierter (Abb. 42 D) als in den Wildtyp-Mäusen (Abb. 42 C). Aufgrund der Strukturveränderungen in der Stria vascularis der Limp-2 Knock-out Mäuse ist eine eindeutige Beurteilung jedoch nicht möglich.

Um zu klären, ob die niedrige Expression der Kaliumkanäle KCNQ1/KCNE1, KCNJ10 und Kv 1.1 in der Stria vascularis Limp-2 defizienter Tiere aufgrund überhöhter Degradierung in Lysosomen zustande kommt, wurden die Proteine des lysosomalen Apparates untersucht. Dazu wurde die Stria vascularis 14 Tage alter Mäuse auf unterschiedliche Expressionen der lysosomalen Proteine Lamp-2, Lamp-1 und Cathepsin D getestet (Abb. 43).

In der Stria vascularis wird Lamp-2 größtenteils in den Basalzellen exprimiert (Abb. 43 A und B, Pfeilköpfe). In den Limp-2 defizienten Mäusen wird Lamp-2 zusätzlich in einigen Ausläufern der Marginalzellen oder Intermediärzellen (Abb. 43 B, Pfeile) detektiert. Cathepsin D ist wie Lamp-2 in den Basalzellen der Stria vascularis lokalisiert (Abb. 43 C und D, Pfeilköpfe). Hohe Cathepsin D-Expression kann perinuklear in den Marginalzellen nachgewiesen werden (Abb. 43 C und D, Pfeile). In der Limp-2 defizienten Stria vascularis wird Cathepsin D wie auch Lamp-2 in den Ausläufern der Marginalzellen detektiert (Abb. 43 D, Pfeile) und erscheint in den Marginalzellkörpern höher exprimiert im Vergleich zum Wildtyp-Tier. Die Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz weisen auf eine erhöhte Lamp-2- und Cathepsin D-Expression in der gesamten Stria vascularis der Limp-2 defizienten Maus hin. In den

übrigen Strukturen der Cochlea (Corti-Organ, Spiralganglien, Reissner'sche Membran) wird Lamp-2 ubiquitär und ohne Unterschiede zwischen den Genotypen exprimiert (Daten nicht gezeigt).

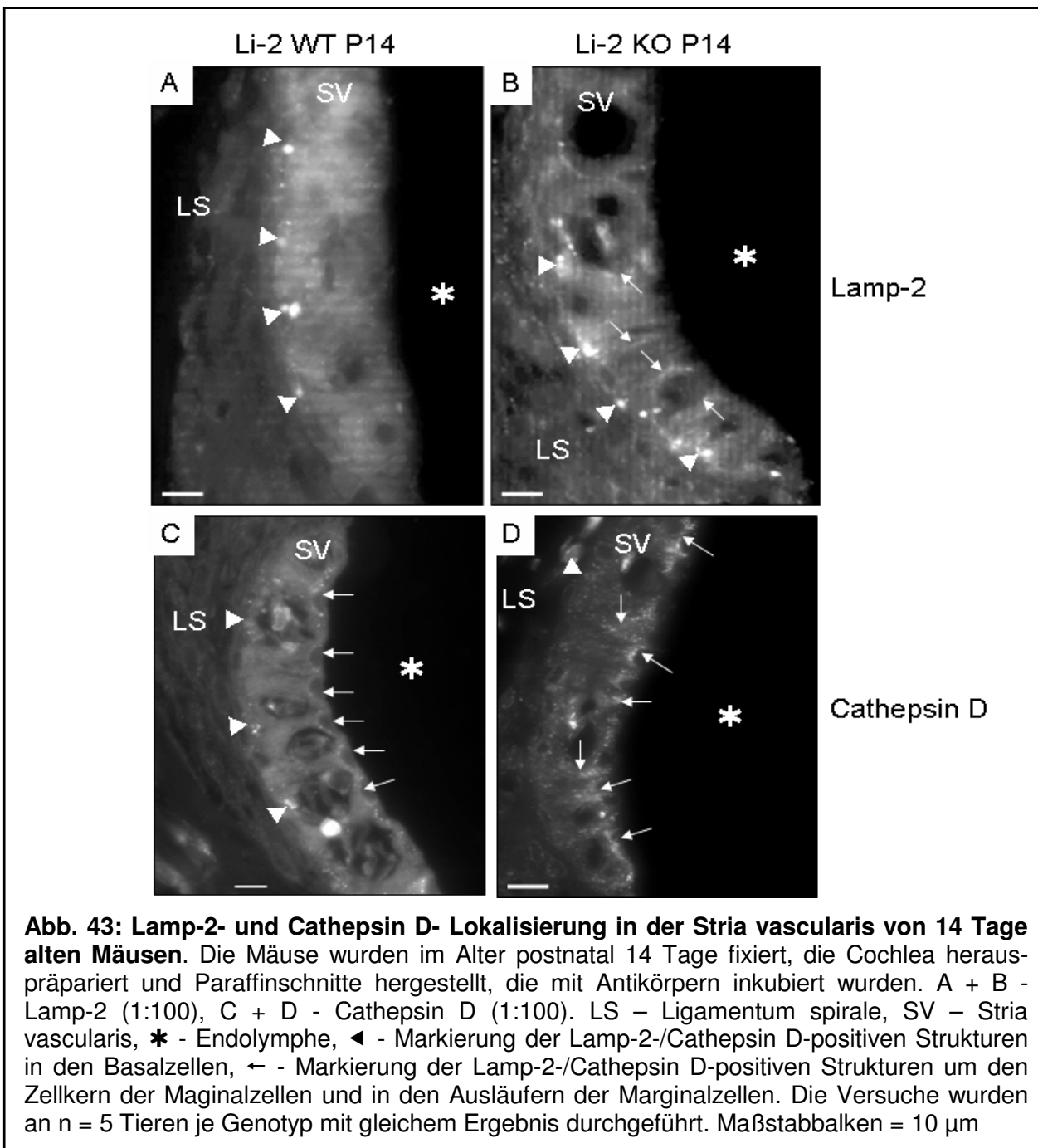


Abb. 43: Lamp-2- und Cathepsin D- Lokalisierung in der Stria vascularis von 14 Tage alten Mäusen. Die Mäuse wurden im Alter postnatal 14 Tage fixiert, die Cochlea herauspräpariert und Paraffinschnitte hergestellt, die mit Antikörpern inkubiert wurden. A + B - Lamp-2 (1:100), C + D - Cathepsin D (1:100). LS – Ligamentum spirale, SV – Stria vascularis, * - Endolymphe, ◄ - Markierung der Lamp-2-/Cathepsin D-positiven Strukturen in den Basalzellen, ← - Markierung der Lamp-2-/Cathepsin D-positiven Strukturen um den Zellkern der Maginalzellen und in den Ausläufern der Marginalzellen. Die Versuche wurden an n = 5 Tieren je Genotyp mit gleichem Ergebnis durchgeführt. Maßstabballen = 10 μ m

Nach den Untersuchungen der lysosomalen Proteine wurden Koloalysierungs-experimente mit dem Kaliumkanal KCNQ1 und Lamp-2 durchgeführt, die keine gemeinsame Lokalisierung in Lamp-2 positiven Vesikeln zeigten (Daten nicht gezeigt). Die niedrige Expression von KCNQ1 ist nicht auf eine Akkumulierung in

Lamp-2 positiven Vesikeln zurückzuführen, allerdings werden Proteine in Lysosomen so schnell degradiert, dass sie möglicherweise keine Immunreaktivität mehr aufweisen.

Ein weiteres Protein, das in der Stria vascularis exprimiert wird, ist der Rezeptor Megalin (Abb. 44). Megalin (früher auch gp330) ist ein Transmembranprotein, das als Endocytose-Rezeptor fungiert und zur Familie der LDL-Rezeptoren gehört (Christensen und Verroust, 2002). Die Lokalisierung dieses Rezeptors wurde in der Stria vascularis beschrieben, über seine Funktion im Innenohr ist jedoch nichts bekannt (Kounnas *et al.*, 1994). In der Niere werden über Megalin Proteine, Vitamine und Nährstoffe reabsorbiert (Christensen und Verroust, 2002). Die Entwicklung von Taubheit wurde in Megalin Knock-out-Mäusen nicht beschrieben (Willnow *et al.*, 1996).

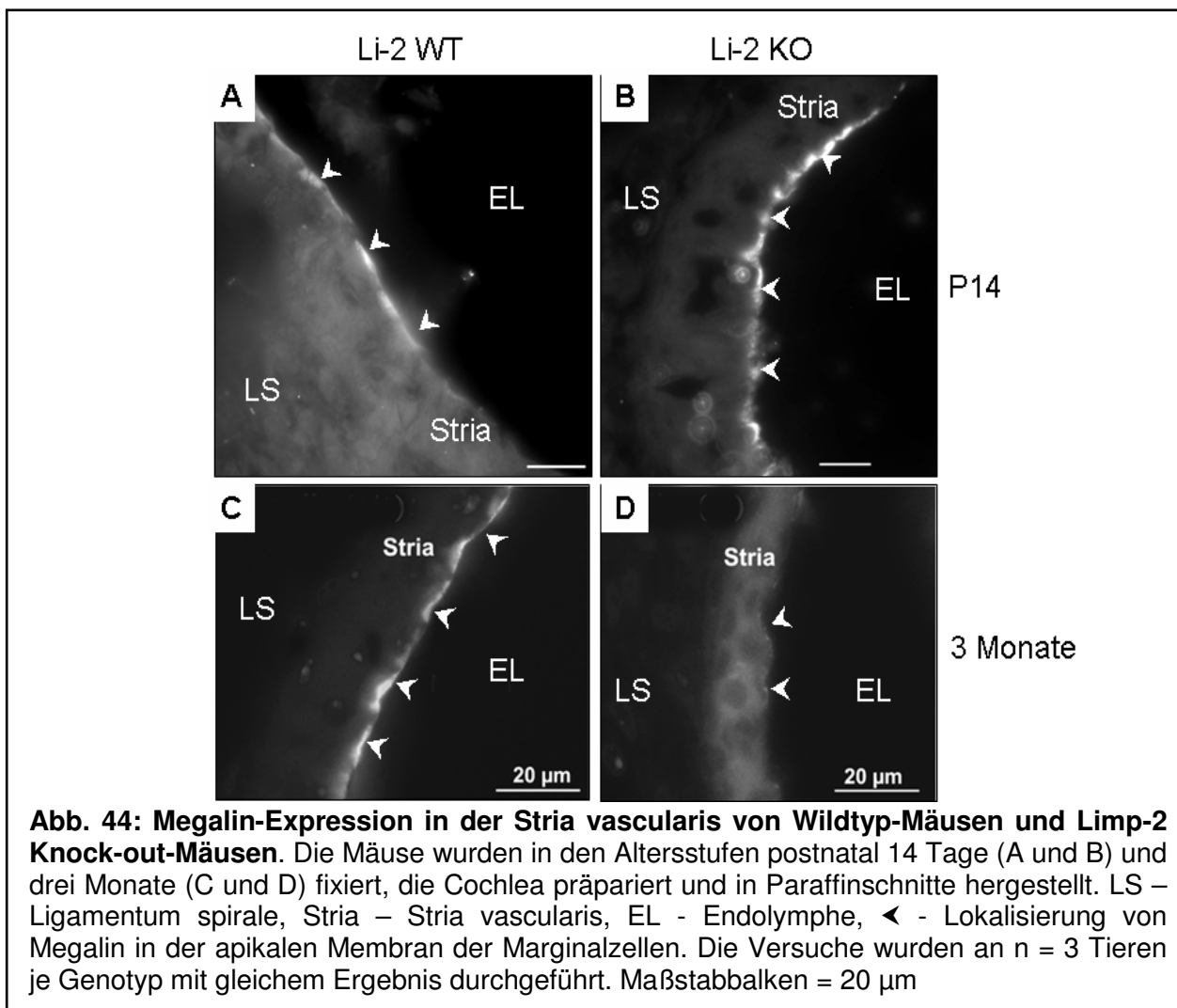


Abb. 44: Megalin-Expression in der Stria vascularis von Wildtyp-Mäusen und Limp-2 Knock-out-Mäusen. Die Mäuse wurden in den Altersstufen postnatal 14 Tage (A und B) und drei Monate (C und D) fixiert, die Cochlea präpariert und in Paraffinschnitte hergestellt. LS – Ligamentum spirale, Stria – Stria vascularis, EL - Endolymphe, ◀ - Lokalisierung von Megalin in der apikalen Membran der Marginalzellen. Die Versuche wurden an n = 3 Tieren je Genotyp mit gleichem Ergebnis durchgeführt. Maßstabballen = 20 µm

Megalin ist in der Stria vascularis der Wildtyp-Mäuse sehr stark in der apikalen Membran der Marginalzellen exprimiert (Abb. 44 A und C, Pfeilköpfe). Während Megalin in der postnatal 14 Tage alten Limp-2 defizienten Stria vascularis in Bezug auf die Wildtyp-Maus noch ungefähr gleich stark exprimiert wird (Abb. 44 B, Pfeilköpfe), sind in der Stria vascularis der drei Monate alten Limp-2 Knock-out-Mäuse nur noch an wenigen Stellen Megalin-positive Abschnitte der apikalen Membran zu sehen (Abb. 44 D, Pfeilköpfe). Bereits im Alter von einem Monat konnte bei festgestelltem Hörschaden eine signifikante Reduktion von Megalin in der Limp-2 defizienten Stria vascularis nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Bei denjenigen einen Monat alten Limp-2 Knock-out-Mäusen, bei denen der Hörschaden noch nicht nachweisbar war, konnten dagegen keine Veränderungen in der Megalin-Expression festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Weitere Veränderungen sind im Vestibularorgan des Innenohrs zu finden (Daten nicht gezeigt). Die Statolithenmembran, die auf dem Sinnesepithel liegt, ist bei den Limp-2 Knock-out-Mäusen drastisch in ihrer Höhe reduziert. Die Otolithen sind nicht mehr vorhanden und durch eine Zellschicht unbekannter Natur ersetzt (Gamp *et al.*, 2003). Des Weiteren ist die charakteristische Zusammensetzung der Proteine in den dunklen Zellen des Vestibularorgans, die nahezu funktionell den Marginalzellen der Stria vascularis entsprechen (Wangemann, 1995), verändert. Ab einem Alter von zwei Monaten kann genau wie in den Marginalzellen kein KCNQ1/KCNE1 detektiert werden (Daten nicht gezeigt), das bei der Wildtyp-Maus in der apikalen Membran lokalisiert ist (Nicolas *et al.*, 2001).

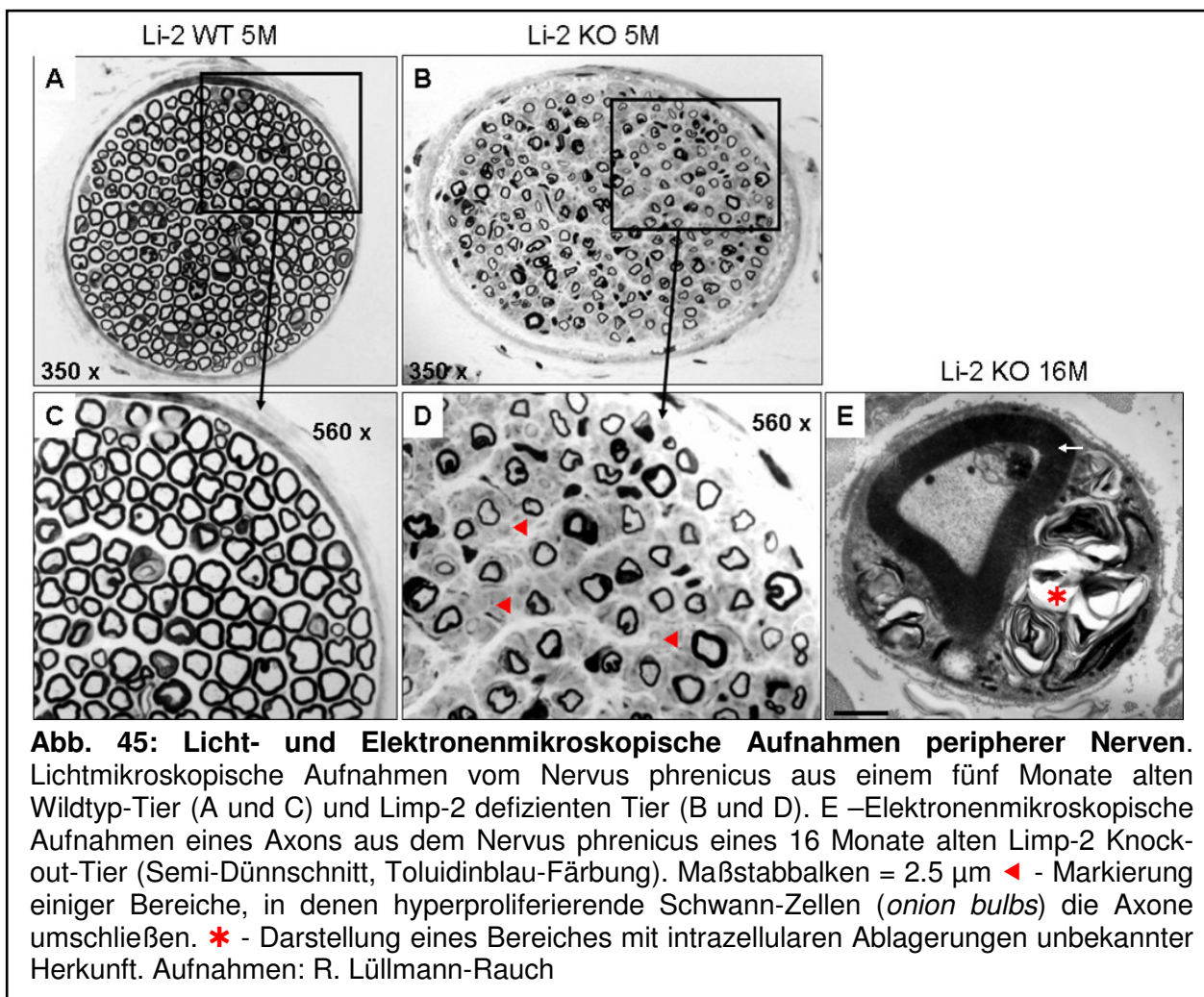
4.8 Limp-2 Defizienz führt zur Entwicklung einer peripheren Neuropathie

4.8.1 Mikroskopische Untersuchungen

In Vorarbeiten zur vorliegenden Untersuchung wurde ein Myelinisierungsdefekt in den peripheren Nerven der Limp-2 Knock-out-Mäuse ermittelt (Gamp *et al.*, 2003). Die Entwicklung der demyelinisierenden peripheren Neuropathie bei Limp-2 defizienten Mäusen entsteht vermutlich durch einen beschleunigten Abbau der

Myelinproteine, die durch homo- und heterophile Interaktionen für die Festigkeit und den Erhalt der Myelinscheide verantwortlich sind (siehe Einleitung). Bereits im Alter von drei Monaten ist eine teilweise Demyelinisierung der *Limp-2* defizienten Nervenfasern in den peripheren Nerven offensichtlich. Diese Demyelinisierung ist mit zunehmendem Alter stärker ausgeprägt. Von der Demyelinisierung sind alle bisher untersuchten Nerven des PNS betroffen.

In Kooperation mit R. Lüllmann-Rauch vom Anatomischen Institut Kiel wurden die peripheren Nerven beider Genotypen licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. Wildtyp-Mäuse besitzen Nervenfasern, z. B. Nervus ischiadicus und Nervus phrenicus, die dicht mit myelinisierten Axonen gepackt sind. Die Myelinringe, die von Schwann-Zellen gebildet werden, sind im Wildtyp als dicke schwarze Ringe sichtbar (Abb. 45 A und C).



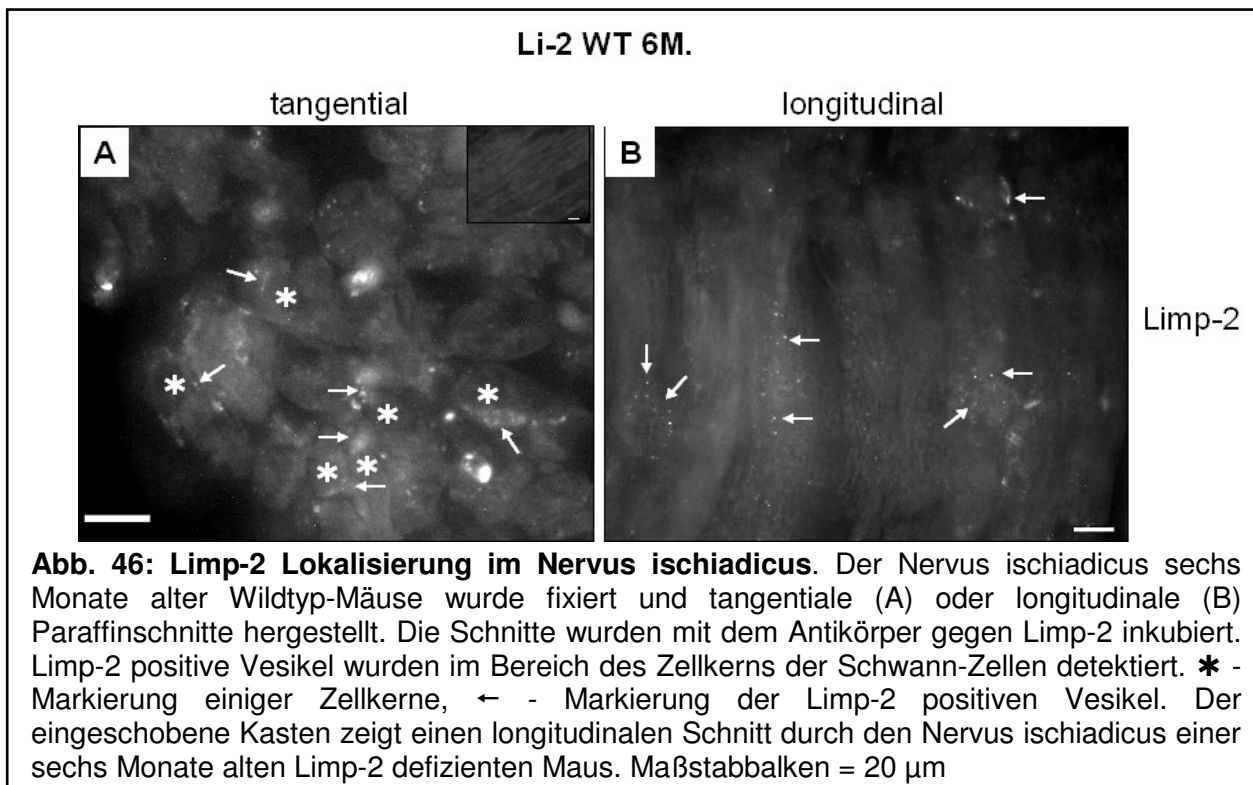
In den peripheren Nerven der *Limp-2* defizienten Tiere sind wesentlich weniger myelinisierte Axone zu erkennen (Abb. 45 B und D) und die Myelinschicht um die Axone ist dünner und unregelmäßiger ausgeprägt (Abb. 45 D). Zwischen den

Nervenfasern befinden sich Ansammlungen von hyperproliferierenden Schwann-Zellen (*onion bulbs*) (Abb. 45 D, Pfeilköpfe). Diese *onion bulbs* entstehen bei wiederholter De- und Remyelinisierung der Axone (Young und Suter, 2003). Die Ultrastruktur des noch vorhandenen kompakten Myelins in den *Limp-2* defizienten Mäusen wurde mit dem Elektronenmikroskop untersucht und zeigt keine Unterschiede zu Wildtyp-Mäusen (Abb. 45 E, Pfeil). In einigen Schwann-Zellen der *Limp-2* defizienten Nerven wurden lamellare Einschlüsse gefunden, deren Herkunft nicht geklärt ist (Abb. 45 E, Asterix).

Es wurde festgestellt, dass die internodalen Abstände der Ranvierschen Schnürringe in den *Limp-2* Knock-out-Mäusen etwa um das 2- bis 3-fache gegenüber den Wildtyp-Mäusen vergrößert sind (Daten nicht gezeigt). In den Bereichen der Ranvierschen Schnürringe ist die Myelinisierung unterbrochen, da sich dort zwei Schwann-Zellen treffen. Physiologisch findet an den Ranvierschen Schnürringen die saltatorische Reizleitung statt. Sind diese Bereiche vergrößert, kommt es zu einer Verlangsamung der elektrischen Impulse und somit langsameren Bewegungsabläufen (Kahle und Frotscher, 2002).

4.8.1.2 *Limp-2* Lokalisierung im Nervus ischiadicus

Zur präzisen Lokalisierung von *Limp-2* im Nervus ischiadicus wurden Quer- und Längsschnitte des Nervus ischiadicus von sechs Monate alten Wildtyp-Mäusen mit dem Antikörper gegen *Limp-2* inkubiert. *Limp-2* positive Partikel waren im tangentialen (Abb. 46 A, Pfeile) und im longitudinalen Schnitt (Abb. 46 B, Pfeile) perinuklear der Schwann-Zelle (Abb. 46 A, Asterixe) zu sehen. Da sich die Schwann-Zellen sehr eng um das Axon wickeln, sind die Zellorganellen überwiegend im Bereich des Zellkerns und des Zellkörpers angeordnet (Kahle und Frotscher, 2002). Dieses deckt sich mit den Ergebnissen der *Limp-2* Lokalisierung im Nervus ischiadicus. Zur Kontrolle der spezifischen Immunoreaktivität wurde der Nervus ischiadicus *Limp-2* defizienter Mäuse mit dem Antikörper gegen *Limp-2* gefärbt. Wie erwartet, konnte in dem peripheren Nerv der *Limp-2* Knock-out-Maus kein *Limp-2* detektiert werden (Abb. 45 A, eingeschobener Kasten).

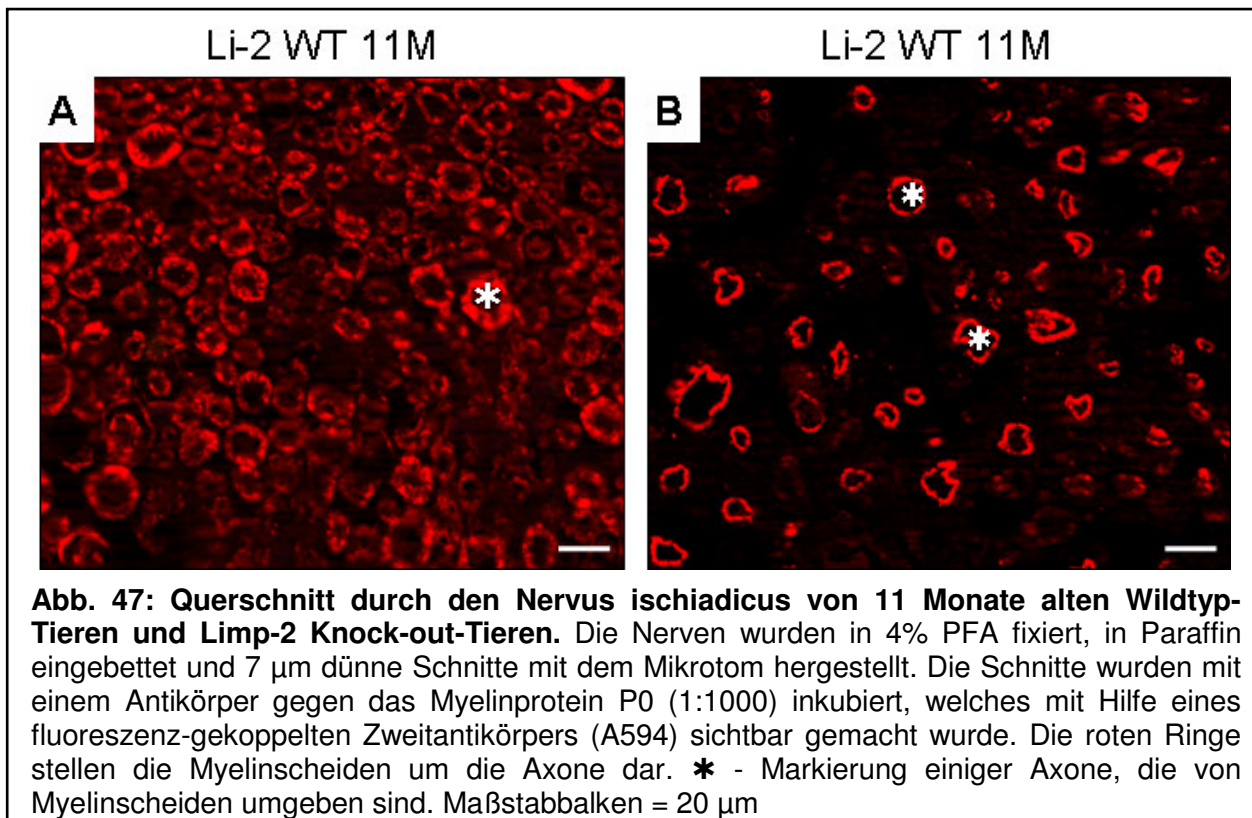


4.8.1.3 Lokalisierung der Myelinproteine im Nervus ischiadicus

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz wurden die peripheren Nerven von elf Monate alten Kontroll- und Limp-2 defizienten Mäusen auf die Expression des Myelinproteins P0 der Schwann-Zellen untersucht. P0 ist das Hauptprotein des PNS-Myelins mit einem Anteil von mehr als 50% am Gesamtprotein (Lemke und Axel, 1985). Die Aufgabe von P0 liegt in der Stabilisierung der Intermediärlinie des kompakten Myelins, indem es die Zellmembran der myelinisierenden Schwann-Zelle quer durchzieht und an extrazelluläre Bereiche oder auch angrenzende Membranlagen bindet (Morell und Quarles, 1999; Garbay *et al.*, 2000). Krankheitsbilder, die durch Mutationen im P0-Protein entstehen, sind je nach Mutation sehr heterogen und können das Krankheitsbild Charcot-Marie-Tooth 1B bewirken (Young und Suter, 2003).

Der Nervus ischiadicus von Wildtyp-Mäusen ist ausgefüllt mit myelinisierten Axonen (Abb. 47 A, Asterix). In dem Limp-2 defizienten Nervus ischiadicus wurden sehr wenig myelinisierende Schwann-Zellen um Axone detektiert, die P0 exprimieren (Abb. 47 B, Asterixe). In großen Bereichen des Nervus ischiadicus konnte in den

Schwann-Zellen kein P0 detektiert werden (Abb. 47 B), was sich mit den Beobachtungen an Semidünnschnitten deckt (Abb. 45). In den Teilen des *Limp-2* defizienten Nervus ischiadicus, die frei von P0 waren, befanden sich keine Nervenfasern, sondern hyperproliferierende Schwann-Zellen und Kollagenfibrillen. Das gleiche Experiment wurde mit neun Monate alten Nerven mit dem gleichen Ergebnis wiederholt (Daten nicht gezeigt).



4.8.2 Expression peripherer Myelinproteine

Nach den Ergebnissen der Elektronenmikroskopie und der Immunfluoreszenz wurde untersucht, wie sich die Expression der verschiedenen Myelinproteine MBP, P0 und PMP22 in den *Limp-2* defizienten Nerven im Laufe der postnatalen Entwicklung verändert. Das Myelin basische Protein (MBP) ist ein zytoplasmatisches, membranassoziertes Protein, das in mindestens fünf Spleißvarianten vorkommt. Das Molekulargewicht der verschiedenen Isoformen liegt zwischen 14 und 21 kD und der Anteil an der Gesamtheit aller Myelinproteine beträgt etwa 35%. Es wird vermutet, dass es an der Kompaktierung der dunklen Myelinringe (siehe Einleitung) beteiligt ist (Brunner *et al.*, 1989). Die P0-cDNA kodiert für ein Glykoprotein mit einem

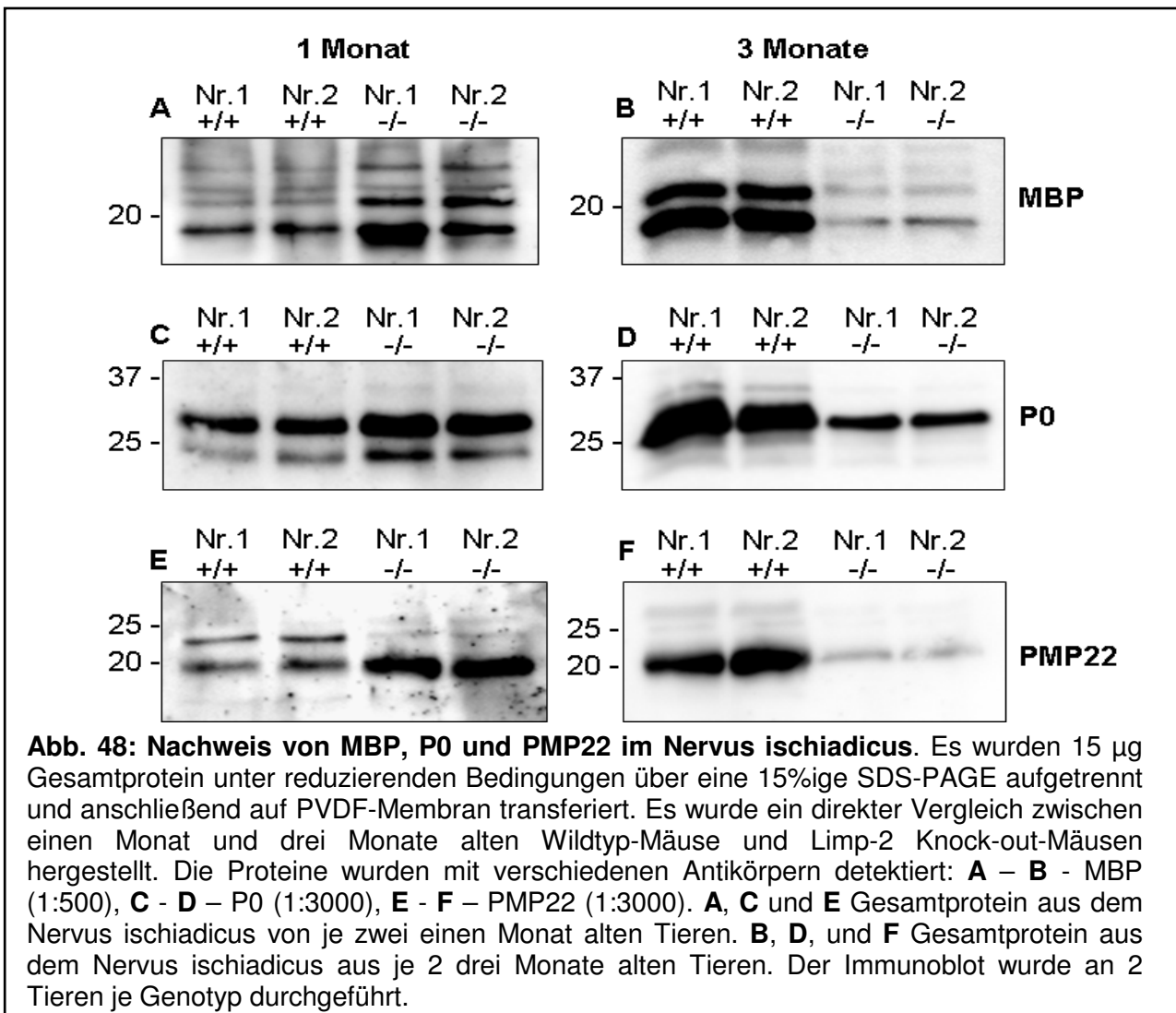
Molekulargewicht von 28 kD. Die Bindung eines Zuckerrestes an die extrazelluläre N-Glykosylierungsstelle erhöht das Molekulargewicht des P0-Proteins auf 30 kD (Voshol *et al.*, 1996). Das Periphere Myelinprotein (PMP22) ist ein Glykoprotein mit einer Größe von 18 kD. Durch die Bindung eines weiteren Zuckerrestes an die extrazelluläre N-Glykosylierungsstelle erhöht sich das Molekulargewicht des PMP22-Proteins auf 22 kD (Pareek *et al.*, 1993). PMP22 nimmt einen Anteil von 2-5% aller Myelinproteine ein. PMP22 fungiert in der Festigkeit und Stabilität des Myelins (Pareek *et al.*, 1997) und spielt vermutlich auch eine Rolle in der Regulation von anderen zellulären Funktionen, einschließlich Apoptose, Proliferation, Zellform und Zellausdehnung (Bosse *et al.*, 1994; Brancolini *et al.*, 2000).

Zur Westernblot-Analyse wurden Mäuse in den Altersstufen von einem und drei Monaten ausgewählt und jeweils die peripheren Nerven aus zwei Mäusen je Genotyp präpariert. Die Unterschiede in der Expression der Myelinproteine wurden mittels Westernblot untersucht (Abb. 48). Aus den Untersuchungen ging hervor, dass die Expression der Myelinproteine im Laufe der postnatalen Entwicklung reduziert ist. MBP, P0 und PMP22 werden im Limp-2 defizienten Nervus ischiadicus einen Monat alter Mäuse stärker exprimiert als in den Wildtyp-Nerven (Abb. 48 A, C und E). Besonders die leichteren Formen der Myelinproteine, die 18.5 kD schwere Form von MBP (Abb. 48 A) und die 18 kD große Form von PMP22 (Abb. 48 E) werden im Vergleich stärker exprimiert in Limp-2 Knock-out-Mäusen.

In drei Monate alten Nerven (Abb. 48 B, D und F) werden alle Myelinproteine in den Limp-2 defizienten Nerven stark reduziert exprimiert, besonders MBP (Abb. 48 B) und PMP22 (Abb. 48 F), die in den Limp-2 defizienten Nerven kaum noch mit den jeweiligen Antikörpern detektiert werden.

Zur Verifizierung der Daten der niedrigen Expression der Myelinproteine in älteren Limp-2 Knock-out-Mäusen wurden sechs Monate alte periphere Nerven beider Genotypen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Expression der Myelinproteine MBP, P0 und PMP22 keine großen Unterschiede mehr aufwies (Daten nicht gezeigt), da vermutlich das produzierte Myelin in der Schwann-Zelle in sogenannten Myelin Ovoiden gespeichert wird.

Zur Kontrolle der gleichen Proteinladung der verglichenen Proben wurden die jeweiligen Membranen nach dem Immunoblot mit Ponceau S gefärbt (Daten nicht gezeigt).



4.8.3 Expression lysosomaler Proteine in peripheren Nerven

Aufgrund der reduzierten Expression der Myelinproteine in den Limp-2 defizienten Nerven und der daraus resultierenden peripheren Neuropathie kam der Verdacht auf, dass eine erhöhte lysosomale Degradierung der Myelinproteine vorliegen könnte. Ein Hinweis auf diese Theorie könnte eine stärkere Expression lysosomaler Proteine in den Limp-2 Knock-out-Nerven sein. Aus diesem Grund wurde der lysosomale Apparat im Nervus ischiadicus beider Genotypen untersucht.

Zur Untersuchung des spät endosomalen/lysosomalen Kompartiments wurde die Expression des Membranproteins Lamp-2 dargestellt (Abb. 49 B) und zur Untersuchung der Lysosomen wurde die Hydrolase Cathepsin D nachgewiesen (Abb. 49 C). Es wurden mehrere Altersstufen auf unterschiedliche Expression untersucht, um Veränderungen in der postnatalen Entwicklung zu beobachten.

Weiterhin wurde die Defizienz von Limp-2 in den Nerven der Knock-out-Mäuse kontrolliert und gleichzeitig der Expressionslevel von Limp-2 in den Nerven der Wildtyp-Mäusen nachgewiesen (Abb. 49 A). Lamp-2 ist in dem Nervus ischiadicus der einen Monat alten Limp-2 defizienten Mäuse etwas niedriger exprimiert im Vergleich zu den Nerven der Wildtyp-Mäuse (Abb. 49 B). In den Altersstufen von drei bis sechs Monaten ändert sich dies und die Expression von Lamp-2 in den Limp-2 defizienten Nerven ist gegenüber den Wildtyp-Mäusen etwas erhöht (Daten nicht gezeigt). Die Expression von Cathepsin D zeigt keine Unterschiede zwischen den einen und drei Monate alten Nerven in den Intermediaten bei 47 kD und den reifen Formen der Hydrolase bei 14 und 31 kD (Daten nicht gezeigt). Nach sechs Monaten wird eine erhöhte Expression aller drei Cathepsin D-Formen, besonders der murenen Formen (14 und 31 kD) in den Limp-2 defizienten Nerven sichtbar (Abb. 49 C).

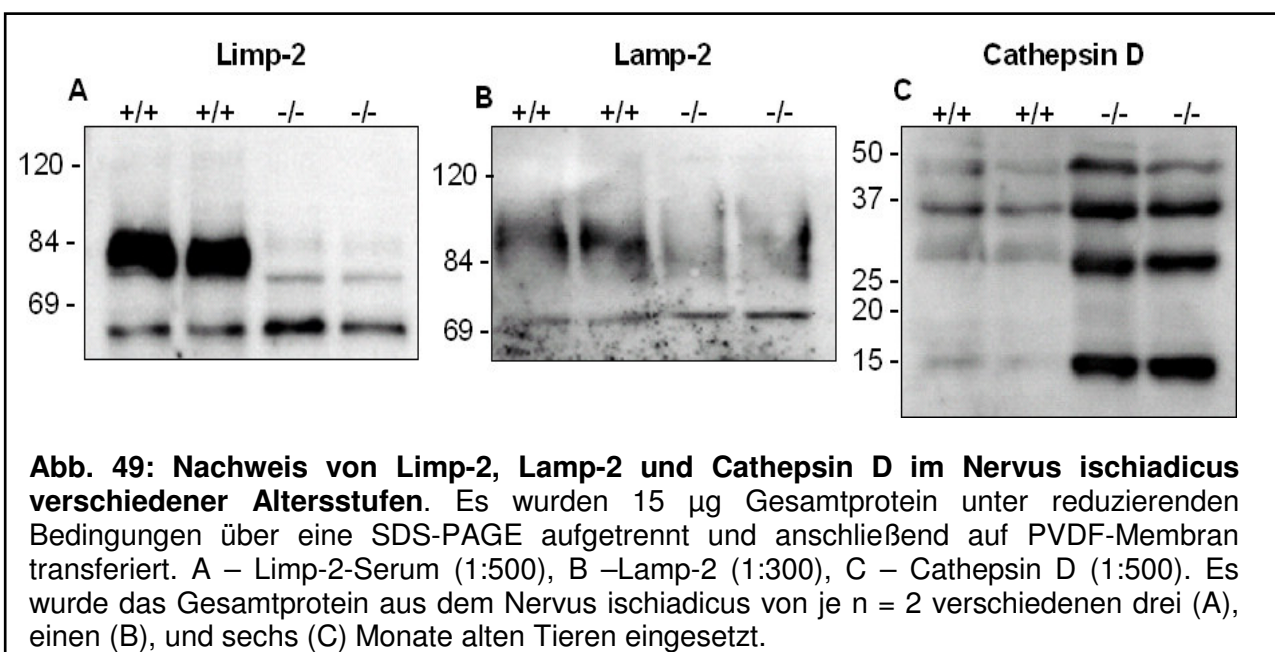
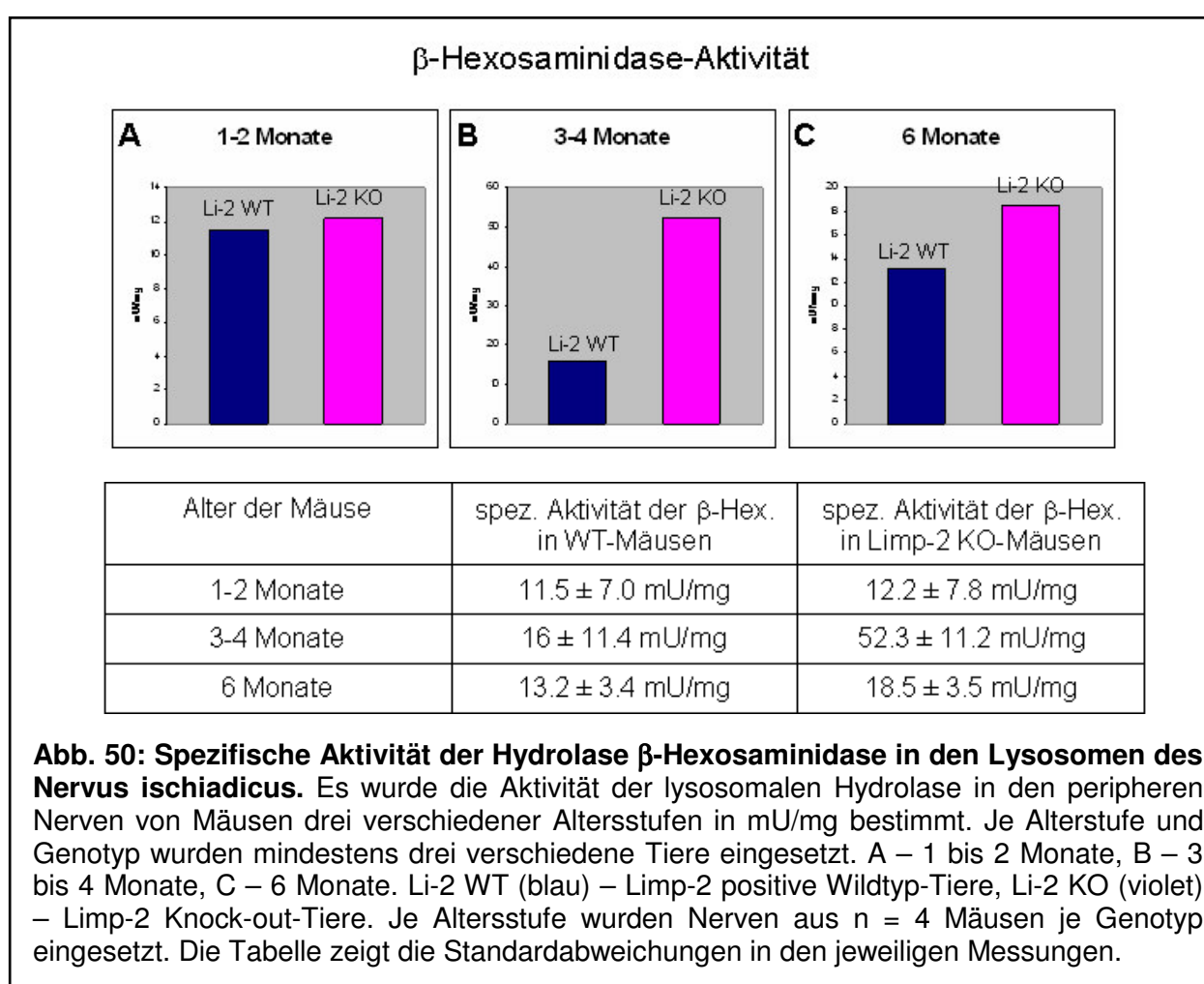


Abb. 49: Nachweis von Limp-2, Lamp-2 und Cathepsin D im Nervus ischiadicus verschiedener Altersstufen. Es wurden 15 µg Gesamtprotein unter reduzierenden Bedingungen über eine SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf PVDF-Membran transferiert. A – Limp-2-Serum (1:500), B – Lamp-2 (1:300), C – Cathepsin D (1:500). Es wurde das Gesamtprotein aus dem Nervus ischiadicus von je n = 2 verschiedenen drei (A), einen (B), und sechs (C) Monate alten Tieren eingesetzt.

4.8.4 Enzymaktivität in peripheren Nerven

Neben den Immunoblot-Analysen am Nervus ischiadicus verschiedener Altersstufen, in denen Cathepsin D in sechs Monate alten Limp-2 defizienten Tieren höher exprimiert war als bei den Wildtyp-Tieren (Abb. 49 C), wurde die Aktivität der löslichen lysosomalen Hydrolase β -Hexosaminidase bestimmt. Dazu wurde der Nervus ischiadicus von je drei verschiedenen Wildtyp-Mäusen und Limp-2 Knock-out-Mäusen in den Altersstufen einen bis zwei, drei bis vier und sechs Monaten

präpariert und lysiert. Der β -Hexosaminidase-Test wurde wie unter 3.2.2.7 beschrieben durchgeführt. Es zeigten sich nur geringe Unterschiede in der spezifischen gemittelten Enzymaktivität der Hydrolase von 0.7 mU/mg zwischen den Mäusen beider Genotypen im Alter von einem bis zwei Monaten (Abb. 50 A). Im Alter von drei bis vier Monaten kam es in den peripheren Nerven der Limp-2 Knock-out-Tiere zu einem Anstieg der spezifischen β -Hexosaminidase-Aktivität um das ~ 3.2 -fache der Aktivität in den gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen (Abb. 50 B). Bei den verglichenen sechs Monate alten Mäusen war die spezifische Aktivität der Hydrolase in den Limp-2 defizienten Mäusen um das ~ 1.5 -fache erhöht (Abb. 50 C).



4.8.5 Versuch der Kultivierung reiner Schwann-Zellkulturen aus dem Nervus ischiadicus der Maus

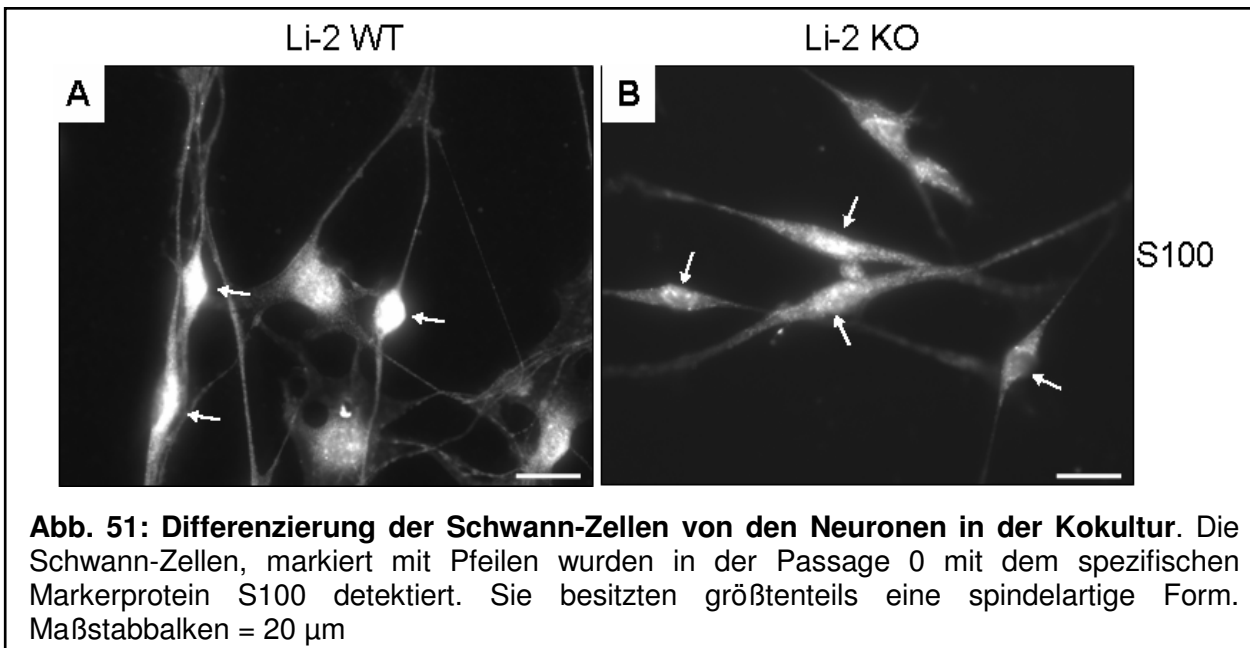
Aufgrund der demyelinisierenden peripheren Neuropathie und der teilweise reduzierten Expression der Myelinproteine in dem Nervus ischiadicus der Limp-2 defizienten Mäuse wurde versucht, die Schwann-Zellen für biochemische und immunhistochemische Experimente zu kultivieren. Die Kultivierung reiner Schwann-Zellkulturen aus Mäusen wurde nach mehreren Veröffentlichungen, die für Schwann-Zellkulturen aus Ratte beschrieben wurden, modifiziert (Chandross *et al.*, 1999; Schneider *et al.*, 2001; Tofaris *et al.*, 2002). Der Nervus ischiadicus wurde von je zwei Wildtyp-Mäusen und Limp-2 Knock-out-Mäusen präpariert und enzymatisch dissoziiert. Die Kultivierung der Schwann-Zellen wurde auf verschiedenen beschichteten Plastikschaalen und mit verschiedenen Wachstumsfaktoren versucht. Es zeigte sich, dass die Kultivierung von reinen Schwann-zellkulturen aus der Maus nicht für biochemische und immunhistochemische Untersuchungen ausreichte, da die Zellen nicht auswuchsen und nur wenige Zellen in Kultur überlebten.

4.8.6 Analyse der Kokultur aus dorsalen Wurzelganglien (DRGs) und Schwann-Zellen

Da die Kultivierung reiner Schwann-Zellen aus dem Nervus ischiadicus der Maus keine biochemischen und immunhistochemischen Untersuchungen zuließ, wurde eine Kokultur der Schwann-Zellen aus dem Nervus ischiadicus mit DRGs hergestellt (s.3.2.1.3). Anhand dieser Kokultur sollte die Expression und Lokalisierung der Myelinproteine von Wildtyp- und Limp-2 defizienten Schwann-Zellen untersucht werden.

Wie schon bei den Anomalien in den ableitenden Harnwegen und im Innenohr der Limp-2 Knock-out-Maus vermutet, wird auch angenommen, dass in den Schwann-Zellen, die Limp-2 Defizienz zu einer Fehlsortierung und Degradierung der Myelinproteine in den Lysosomen führt. Aus diesem Grund wurde der lysosomale Apparat der Schwann-Zellen in Kultur untersucht.

Zur Differenzierung der Schwann-Zellen von den Neuronen in der Kokultur wurden die Zellen mit Antikörpern gegen S100 inkubiert (Abb. 51 A und B). S100 ist ein spezifisches Markerprotein für Schwann-Zellen (Hunt *et al.*, 2004). Schwann-Zellen sind von Neuronen auch morphologisch gut unterscheidbar, da Schwann-Zellen eine spindelartige Form aufweisen, während sich Neuronen durch sehr lange Zellausläufer auszeichnen (Frade, 2005).



Bei der indirekten Immunfluoreszenz gegen Cathepsin D (Abb. 52 A und B) und Lamp-2 (Abb. 52 C und D) waren die Ergebnisse sehr variabel zwischen einzelnen Zellen der gleichen und unterschiedlichen Zelllinien. Der Vergleich von Wildtypzellen und Limp-2 defizienten Zellen ergab geringe Unterschiede in der Expression und Lokalisierung der lysosomalen Proteine Lamp-2 und Cathepsin D. Diese Proteine scheinen in 80% der ausgewerteten Limp-2 defizienten Schwann-Zellen etwas stärker exprimiert (Abb. 52 A und B, Abb. 53 A und B). Erwartungsgemäß ließ sich in den Limp-2 Knock-out-Schwann-Zellen kein Limp-2 nachweisen (Abb. 52 F). Alle lysosomalen Proteine sind in vesikulären Strukturen angeordnet, die späte Endosomen und Lysosomen darstellen.

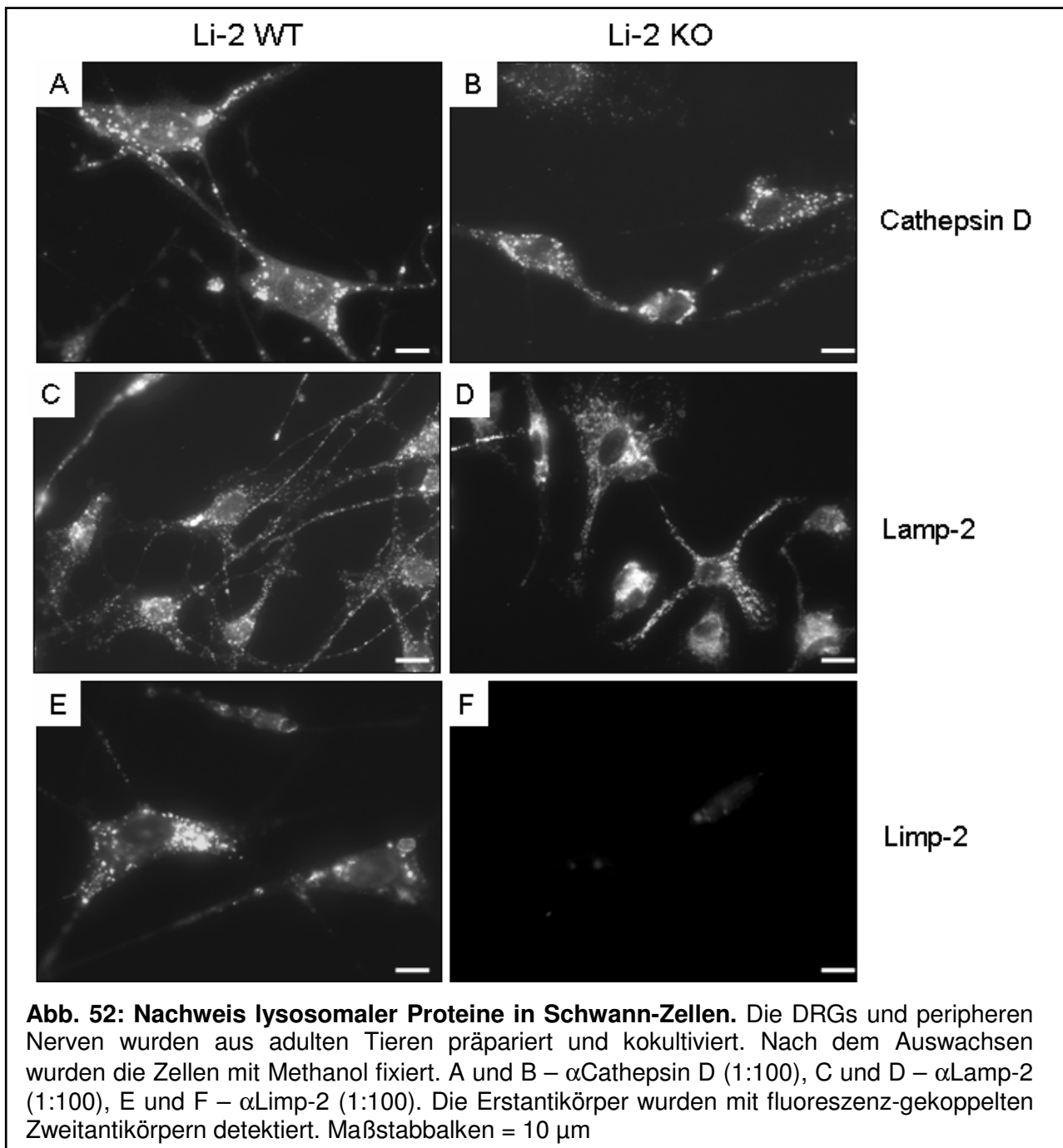
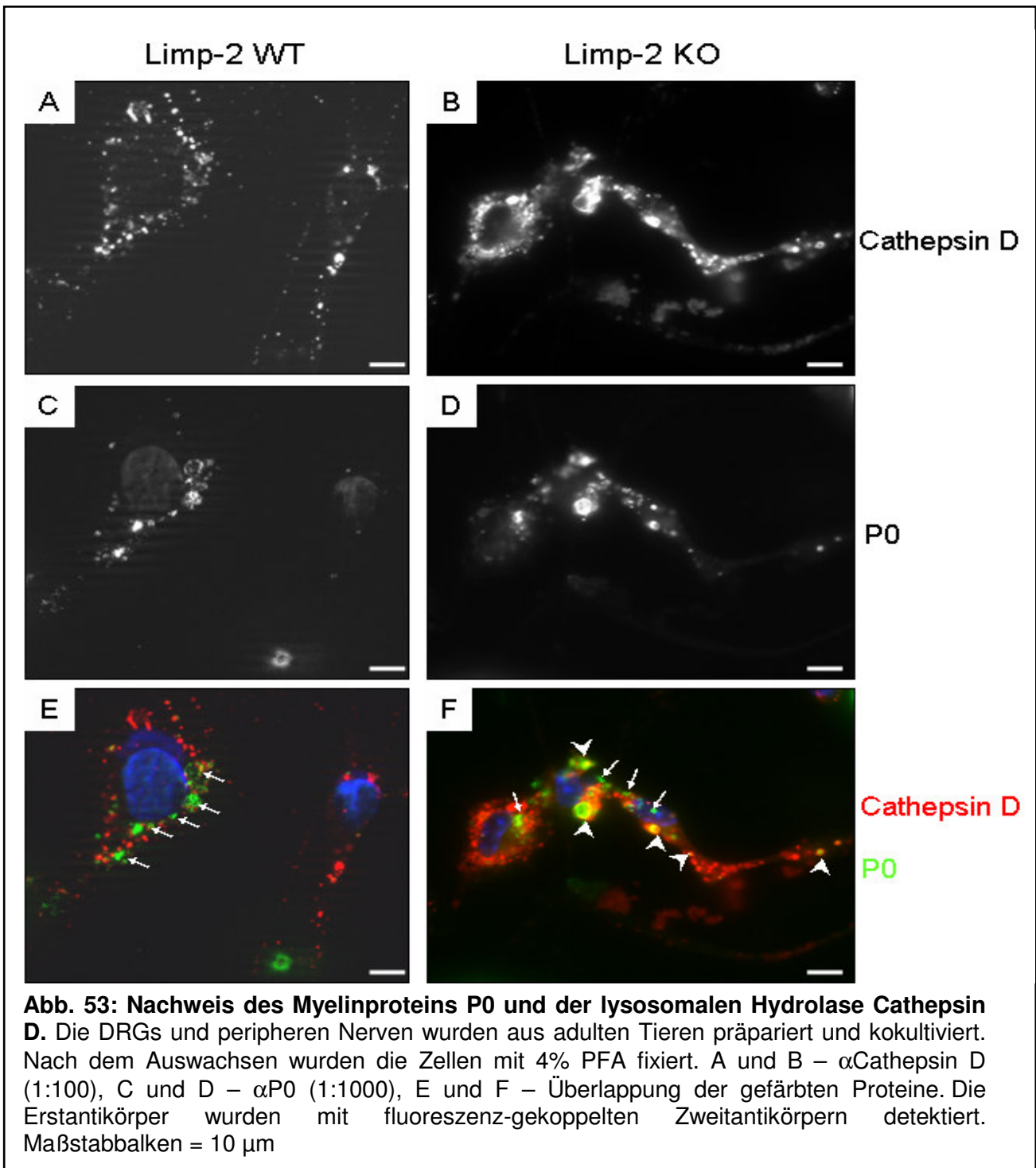


Abb. 52: Nachweis lysosomaler Proteine in Schwann-Zellen. Die DRGs und peripheren Nerven wurden aus adulten Tieren präpariert und kokultiviert. Nach dem Auswachsen wurden die Zellen mit Methanol fixiert. A und B – α Cathepsin D (1:100), C und D – α Lamp-2 (1:100), E und F – α Limp-2 (1:100). Die Erstantikörper wurden mit fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörpern detektiert. Maßstab Balken = 10 μ m

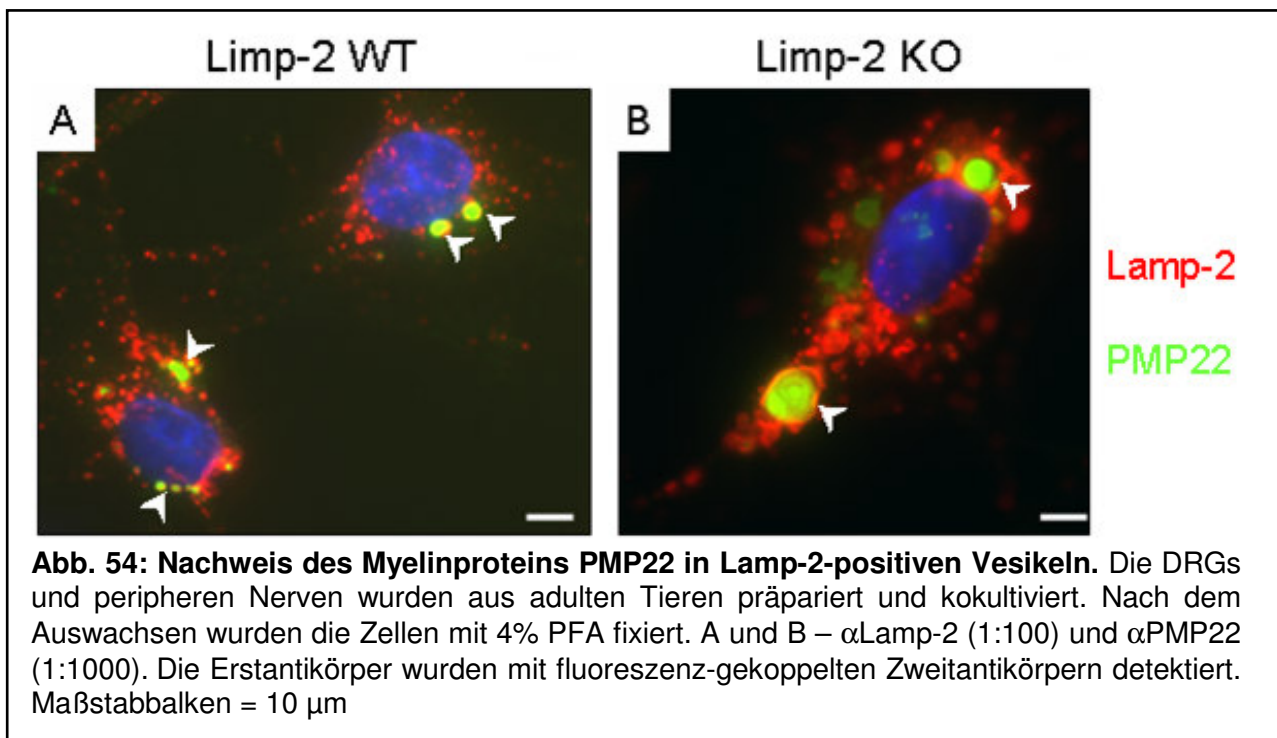
Aufgrund des Myelinisierungsdefekts in den Schwann-Zellen der Limp-2 defizienten peripheren Nerven und der niedrigen Expression der Myelinproteine PMP22 und P0 in den Limp-2 defizienten Nerven wurden die Myelinproteine mittels der indirekten Immunfluoreszenz an PFA fixierten Zellen der Kokultur nachgewiesen. Um festzustellen, ob durch die Limp-2 Defizienz eine mögliche Fehlsortierung der Myelinproteine in Lysosomen stattfindet, wurden Kolokalisierungen von Myelinproteinen mit lysosomalen Proteinen durchgeführt (Abb. 53).



Bei den Doppelfärbungen stellte sich heraus, dass sich P0 in der Limp-2 defizienten Kokultur größtenteils in Cathepsin D-positiven Vesikeln befindet (Abb. 53 F, offene Pfeilköpfe). P0 wurde auch in Vesikeln detektiert, die nicht Cathepsin D-positiv waren (Abb. 53 F, Pfeile). Bei der Wildtyp-Kontrolle konnte keine Lokalisierung in Cathepsin D-positiven Lysosomen nachgewiesen werden (Abb. 53 E, Pfeile).

Im Gegensatz zu den Unterschieden in der Lokalisierung von P0 in Wildtyp-Schwann-Zellen und Limp-2 defizienten Schwann-Zellen scheint sich PMP22 bei beiden Genotypen ausschließlich in Lamp-2 positiven Vesikeln zu befinden, die entweder späte Endosomen oder Lysosomen darstellen (Abb. 54 A und B).

Vermutlich ist die Lokalisierung der Myelinproteine in späten Endosomen/Lysosomen mit der Kultivierung der Schwann-Zellen *in vitro* zu erklären. Das vorhandene P0/PMP22 wird vermutlich abgebaut und dadurch in den späten Endosomen/Lysosomen detektiert. Neue Myelinproteine werden nur bei axonalem Kontakt und Myelinisierung synthetisiert und in nachweisbaren Mengen zur Plasmamembran transportiert. Diese nötigen Induktoren der Myelinsynthese fehlen in der *in vitro* Kultur von Schwann-Zellen (Pareek *et al.*, 1997, Podratz *et al.*, 2004).



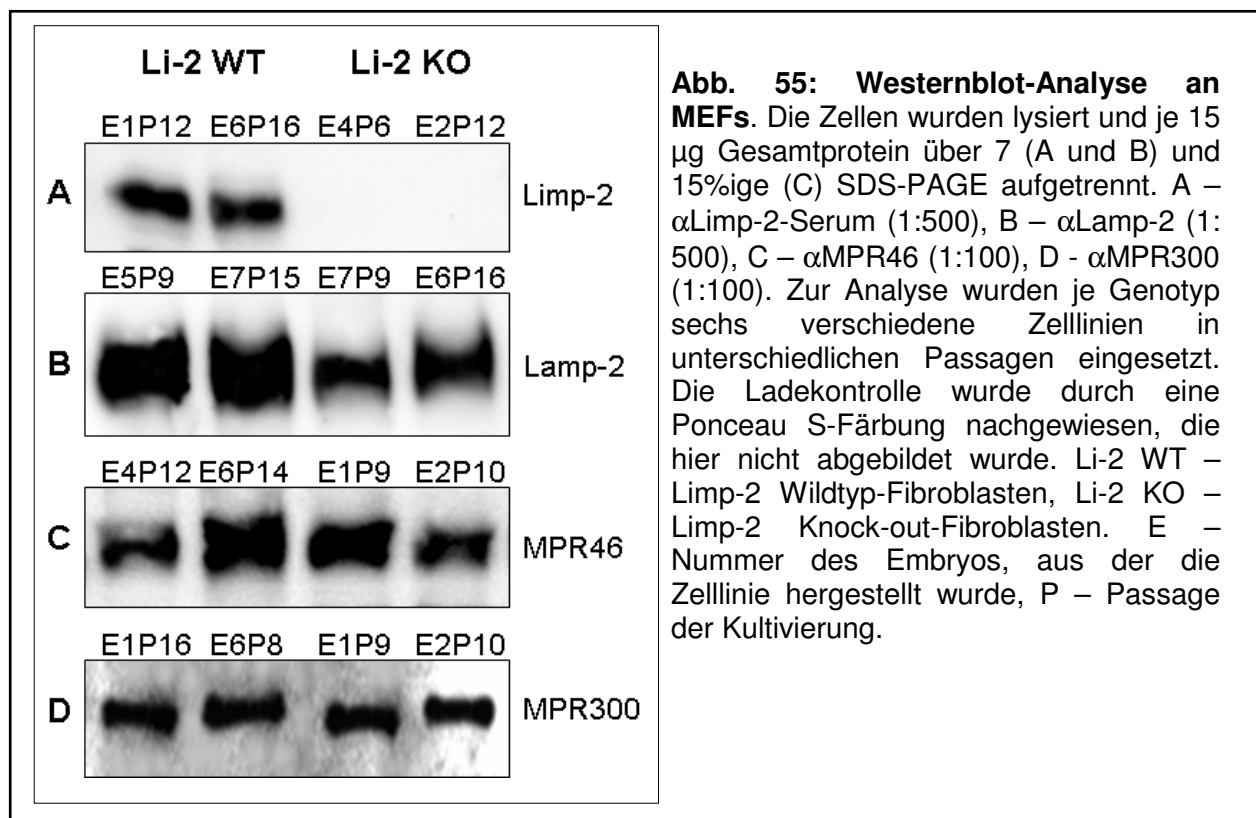
4.9 Untersuchungen an embryonalen und adulten Fibroblasten

Zur systematischen Analyse der Proteinexpression und -lokalisierung des Stofftransports in der Zelle und der Suche nach Interaktionspartnern von Limp-2 mittels Quervernetzung wurden mehrere Zelllinien aus adulten und embryonalen Fibroblasten von Wildtyp-Mäusen und Limp-2 defizienten Mäusen kultiviert und näher untersucht.

4.9.1 Westernblot-Analysen an embryonalen Fibroblasten

Um unterschiedliche Expressionen von lysosomalen Proteinen und Rezeptorproteinen in primären embryonalen Fibroblasten (MEF) festzustellen, wurden MEFs in vergleichbaren Passagen beider Genotypen für Untersuchungen eingesetzt.

Zur Untersuchung des lysosomalen Apparates wurden die Membranproteine Lamp-2, Lamp-1 (Daten nicht gezeigt) und Limp-2 in primären Fibroblasten beider Genotypen mittels spezifischer Antikörper detektiert (Abb. 55 A und B).



Die Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren 46kD (MPR46) und 300kD (MPR300), die zwischen dem TGN und den Endosomen zirkulieren und dabei unter anderem lysosomale Proteine transportieren, wurden ebenfalls mit Antikörpern nachgewiesen. Dabei zeigte sich, dass die lysosomalen Membranproteine Lamp-2 (Abb. 55 B) und Lamp-1 (Daten nicht gezeigt) in Limp-2 defizienten Fibroblasten etwa 2- bis 3-fach niedriger exprimiert werden im Vergleich zu Kontroll-Fibroblasten (Abb. 55 B). Erwartungsgemäß wird Limp-2 in den Kontroll-Fibroblasten (Abb. 55 A) exprimiert, während in den Limp-2 defizienten Fibroblasten kein Limp-2 exprimiert wird (Abb. 55

A). Keine Unterschiede gab es in der Expression der Rezeptoren MPR46 (Abb. 55 C) und MPR300 (Abb. 55 D).

4.9.2 Immunfluoreszenz an embryonalen Fibroblasten

Die embryonalen Fibroblasten wurden auf Deckgläsern fixiert und mit den Antikörpern gegen Lamp-1, Lamp-2, Cathepsin D, MPR46 und MPR300 inkubiert (s. 3.1.10). In der Lokalisierung der spät endosomalen/lysosomalen Membranproteine und der Hydrolase Cathepsin D zeigten sich keine Unterschiede in der perinuklearen und vesikularen Verteilung zwischen embryonalen Kontroll-Fibroblasten und Limp-2 Knock-out-Fibroblasten (Abb. 56).

Lamp-1 (Abb. 56 A und B) und Lamp-2 (Abb. 56 C und D) werden in punkt- und vesikelförmigen Strukturen detektiert, die vermutlich späte Endosomen und Lysosomen darstellen. Cathepsin D, eine Hydrolase der Lysosomen und des Hybridorganells (siehe Einleitung), zeigt ebenfalls keine Unterschiede in der Expression und Lokalisierung der embryonalen Fibroblasten beider Genotypen (Abb. 56 E und F). Späte Endosomen und Lysosomen sind in den Limp-2 defizienten Zellen nicht vergrößert. Die Markierung der Rezeptoren MPR46 (Abb. 56 G und H) und MPR300 (Abb. 56 I und J) sowie die Kolo-kalisierung dieser Rezeptoren mit dem TGN-Marker γ -Adaptin und der Nachweis von frühen Endosomen mit EEA1 (*early endosomal autoantigen 1*) an Kontroll-Fibroblasten und Limp-2 Knock-out-Fibroblasten wiesen keine klaren Unterschiede auf (Daten nicht gezeigt). Um die Funktionalität und Spezifität der eingesetzten Erst- und Zweitantikörper zu überprüfen, wurde je Färbung eine Kontrolle ohne den ersten Antikörper und nur mit dem Zweitantikörper mitgeführt (Daten nicht gezeigt).

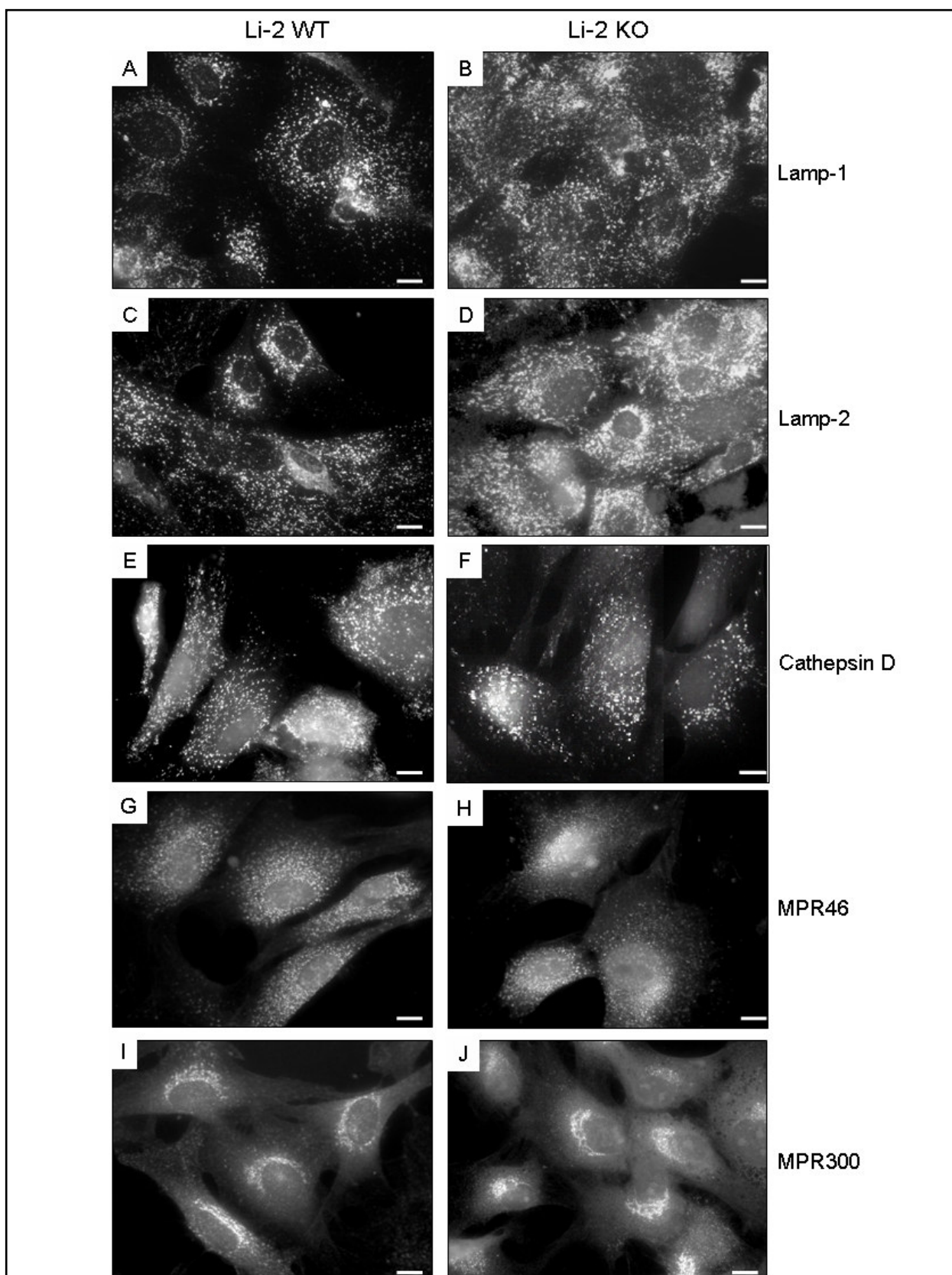


Abb. 56: Indirekte Immunfluoreszenz an Wildtyp-MEFs und Limp-2 Knock-out-MEFs. Die MEFs wurden in den Passagen 7 bis 9 mit Methanol fixiert und für eine Stunde mit den jeweiligen Erstantikörpern gefärbt. A und B – α Lamp-1 (1:50), C und D – α Lamp-2 (1:50), E und F – α Cathepsin D (1:100), G und H - α MPR46 (1:50), I und J - α MPR300 (1:100). Die Erstantikörper wurden mit fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörpern detektiert. Maßstabbalken = 10 μ m

4.9.3 Immunfluoreszenz an adulten Fibroblasten

Der lysosomale Apparat von adulten Fibroblasten wurde mittels der Antikörper gegen Lamp-2 und Lamp-1 untersucht. Des Weiteren wurden die Expression und die Lokalisierung der Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren MPR46 und MPR300 untersucht. Die Detektion lysosomaler Proteine und Rezeptorproteine wurde an adulten Fibroblasten aus dem Schwanz (Abb. 57), der Cornea (Abb. 58) und dem Tendus calcaneus (Daten nicht gezeigt) durchgeführt.

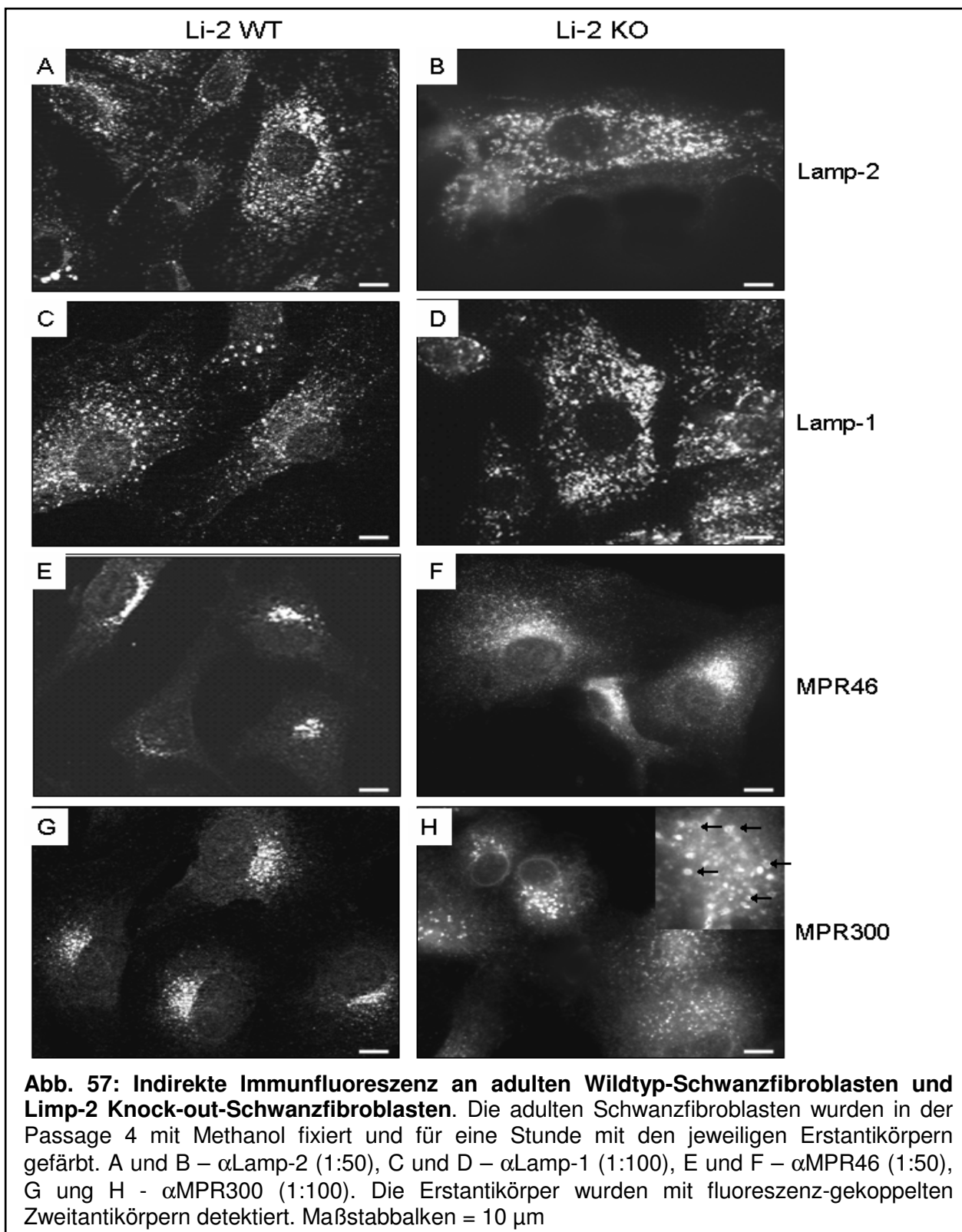
Bei dem Vergleich adulter Schwanzfibroblasten aus Kontroll-Mäusen und Limp-2 defizienten Mäusen zeigten sich keine klaren Unterschiede in der Expression und Lokalisierung der spät endosomalen/lysosomalen Membranproteine Lamp-2 (Abb. 57 A und B) und Lamp-1 (Abb. 57 C und D). In den adulten Schwanzfibroblasten beider Genotypen wurden teilweise Zellen detektiert, die große späte Endosomen/Lysosomen enthielten. Größtenteils waren die späten Endosomen/Lysosomen jedoch nicht vergrößert.

Die perinukleare Lokalisierung von MPR46 in den Schwanzfibroblasten zeigt keine Unterschiede zwischen Kontrollmäusen (Abb. 57 E) und Limp-2 defizienten Schwanzfibroblasten (Abb. 57 F). Die Verteilung des MPR46 ist abhängig von dem jeweiligen Zustand der Zelle während der Fixierung. Die Rezeptoren wurden teilweise auch im gesamten Zytoplasma der adulten Fibroblasten beider Genotypen gefunden (Daten nicht gezeigt), die vermutlich in Clathrin-bedeckten Vesikeln oder Endosomen lokalisiert waren, in die MPR46 Proteine vom TGN liefert (Lemansky *et al.*, 1987; von Figura *et al.*, 1987).

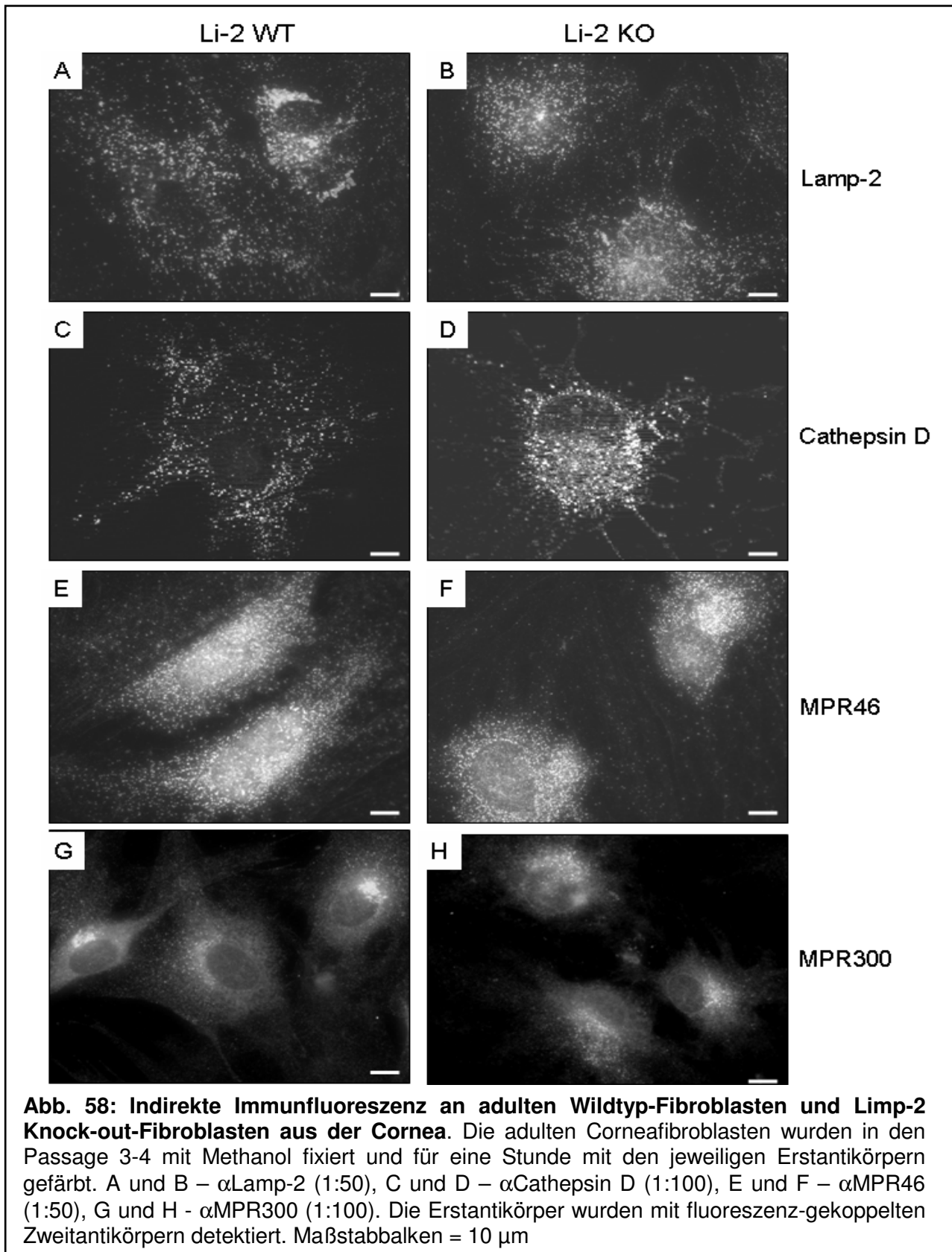
Unterschiede werden zwischen den Genotypen in der Lokalisierung des Rezeptors MPR300 offensichtlich (Abb. 57 G und H). In beiden Genotypen ist MPR300 größtenteils in Vesikeln perinuklear im Bereich des TGN lokalisiert. In den Limp-2 Knock-out-Fibroblasten aus dem Schwanz ist teilweise auch eine Lokalisierung in Vesikeln im gesamten Zytoplasma (Abb. 56 H) und in ringartigen Strukturen zu beobachten (Abb. 50 H Ausschnitt, Pfeile).

Die Verteilung der späten Endosomen und Lysosomen, nachgewiesen mit Lamp-2 (Abb. 58 A und B) und Lamp-1 (Daten nicht gezeigt), scheint nicht zwischen Kontroll-Fibroblasten und Limp-2 defizienten Fibroblasten aus der Cornea zu differieren. Wie bei den adulten Schwanzfibroblasten wurden auch in den adulten Corneafibroblasten

einige Zellen mit größeren Endosomen/Lysosomen entdeckt, die die Zellen fast ausfüllten (Daten nicht gezeigt).



Auch in der Expression und Lokalisierung der lysosomalen Hydrolase Cathepsin D konnten keine klaren Unterschiede festgestellt werden (Abb. 58 C und D).



In den adulten Corneafibroblasten aus Kontroll-Mäusen und Limp-2 Knock-out-Mäusen waren keine Unterschiede in der Expression und Lokalisierung der Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren ersichtlich (Abb. 58 E und F, G und H). Während MPR46 in beiden Genotypen im gesamten Zytoplasma der Zellen verteilt ist (Abb. 58 E und F), ist MPR300 größtenteils perinuklear im Bereich des TGN lokalisiert (Abb. 58 G und H).

In den adulten Fibroblasten aus der Achillessehne (*Tendus calcaneus*) von Kontroll-Mäusen und Limp-2 Knock-out-Mäusen zeigten sich keine Unterschiede in der Expression der spät endosomalen/lysosomalen Membranproteine Lamp-2 und Lamp-1 (Daten nicht gezeigt).

4.9.4 Internalisierungs-Experimente an embryonalen Fibroblasten

Zur Analyse der Endozytose und der eventuellen Veränderungen beim Abbau und Transport von endozytiertem Material in Lysosomen wurden Internalisierungs-Experimente an embryonalen Fibroblasten durchgeführt. Dextran ist ein β -Glucan (s. 3.2.1.11 a), das über die Pinozytose von Zellen aufgenommen und anschließend über die Endosomen in Lysosomen transportiert wird.

Lebende embryonale Kontroll-Fibroblasten und Limp-2 Knock-out-Fibroblasten wurden für 30 Minuten in Dextran inkubiert und danach für 3 Stunden in Medium ohne Dextran kultiviert. In dieser *Chase*-Periode wird das endozytierte Dextran über frühe Endosomen zu späten Endosomen und anschließend zu Lysosomen weitertransportiert. Je nach Länge der Chase-Periode können endozytierte Substanzen in den verschiedenen Reifestadien der Vesikeln in der Zelle detektiert werden. Da das internalisierte Dextran mit dem Fluoreszenzfarbstoff A594 gekoppelt war (Abb. 59 A und B), wurden die Lysosomen mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz an Cathepsin D mit dem Fluoreszenzfarbstoff A488 sichtbar gemacht (Abb. 59 C und D).

Bei der Überlagerung der beiden Farbstoffe (Abb. 59 E und F) zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen. Das internalisierte Dextran wurde fast vollständig in Cathepsin-positiven Vesikeln detektiert (Abb. 59 E und F, offene Peilköpfe).

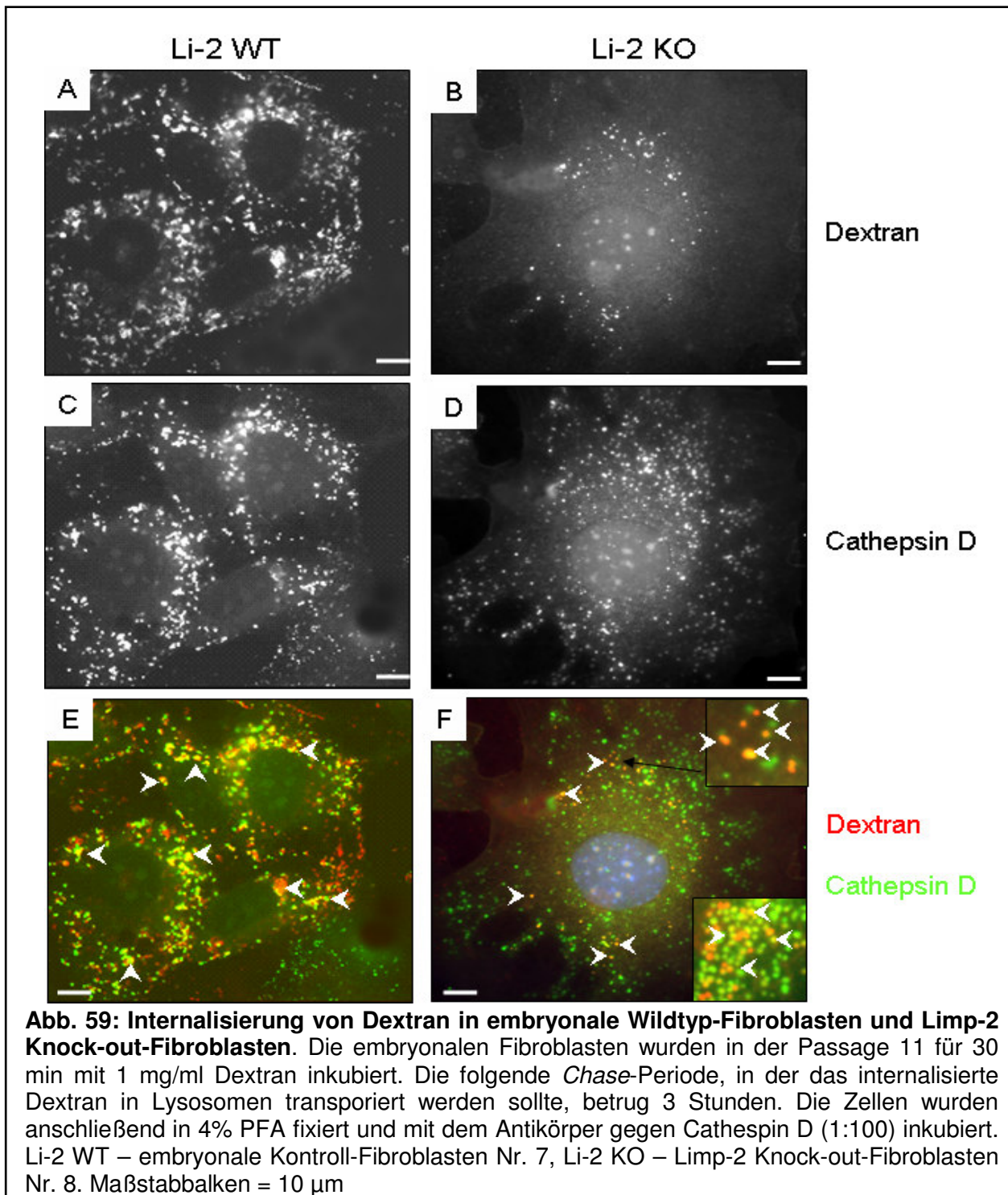


Abb. 59: Internalisierung von Dextran in embryonale Wildtyp-Fibroblasten und Limp-2 Knock-out-Fibroblasten. Die embryonalen Fibroblasten wurden in der Passage 11 für 30 min mit 1 mg/ml Dextran inkubiert. Die folgende *Chase*-Periode, in der das internalisierte Dextran in Lysosomen transportiert werden sollte, betrug 3 Stunden. Die Zellen wurden anschließend in 4% PFA fixiert und mit dem Antikörper gegen Cathepsin D (1:100) inkubiert. Li-2 WT – embryonale Kontroll-Fibroblasten Nr. 7, Li-2 KO – Limp-2 Knock-out-Fibroblasten Nr. 8. Maßstabbalken = 10 μ m

Das monomere Glycoprotein Transferrin ist das wichtigste Transportprotein für Eisen im Serum, da es allen Zellen Eisen zur Verfügung stellt. Transferrin bindet am Transferrin-Rezeptor und wird über Rezeptor-gekoppelte Endozytose in die Zelle aufgenommen. Das gebundene Transferrin wird normalerweise in den frühen Endosomen vom Rezeptor getrennt, der anschließend zur Plasmamembran

rezykliert. Embryonale Kontroll-Fibroblasten und Limp-2 Knock-out-Fibroblasten wurden für 30 Minuten in Serum-freien Medium kultiviert und anschließend für weitere 30 Minuten mit fluoreszenz-gekoppeltem Transferrin inkubiert (Abb. 60 A und B). Die Zellen wurden fixiert und mit einem Antikörper gegen Cathepsin D behandelt (Abb. 60 C und D). In den Kontroll- und Limp-2 defizienten MEFs gab es wie erwartet keine Lokalisierung von Transferrin in Cathepsin D-positiven Vesikeln (Abb. 60 E und F, Pfeile). Das Transferrin ist größtenteils in ringartigen Strukturen lokalisiert, die vermutlich frühe Endosomen darstellen.

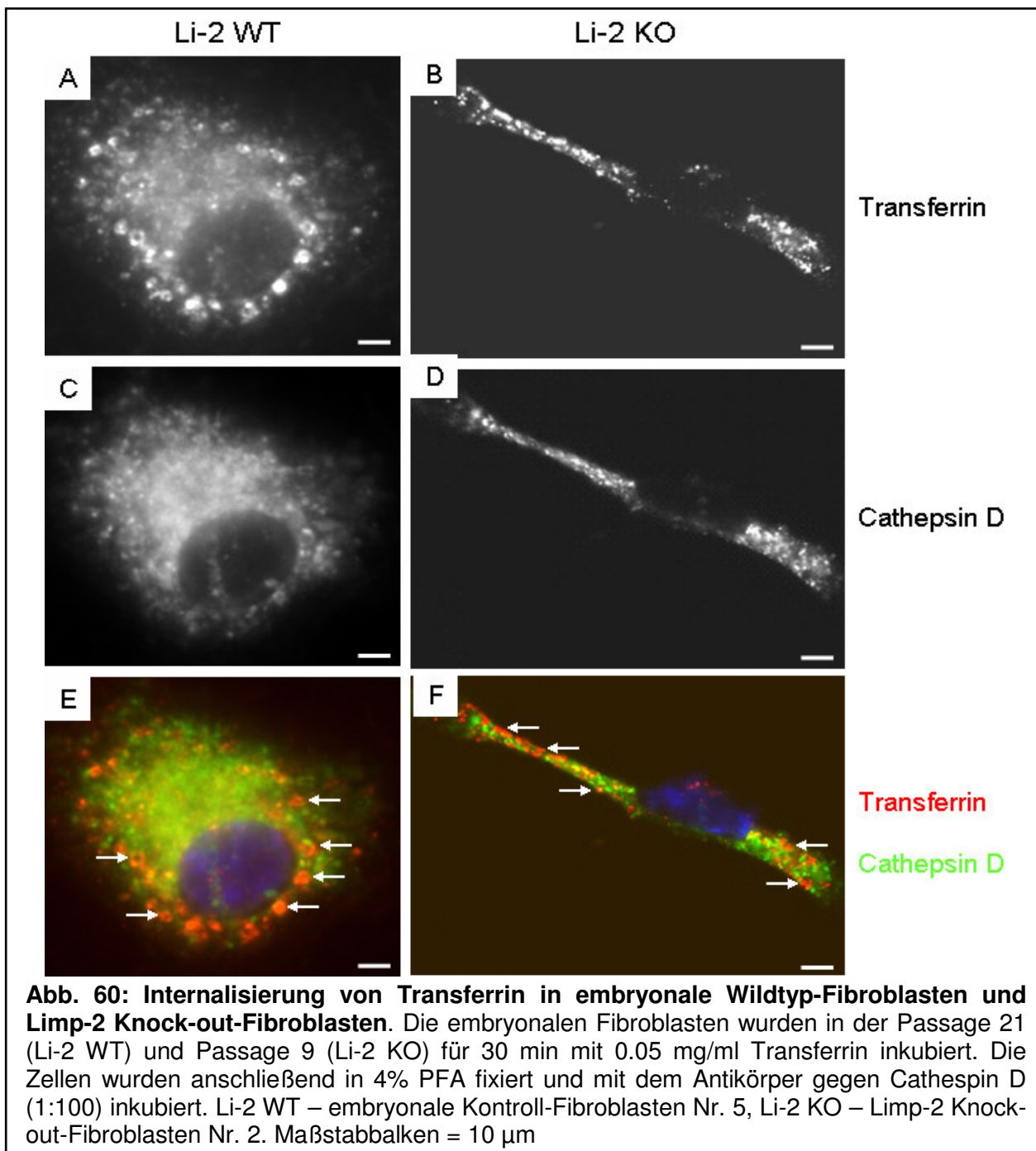
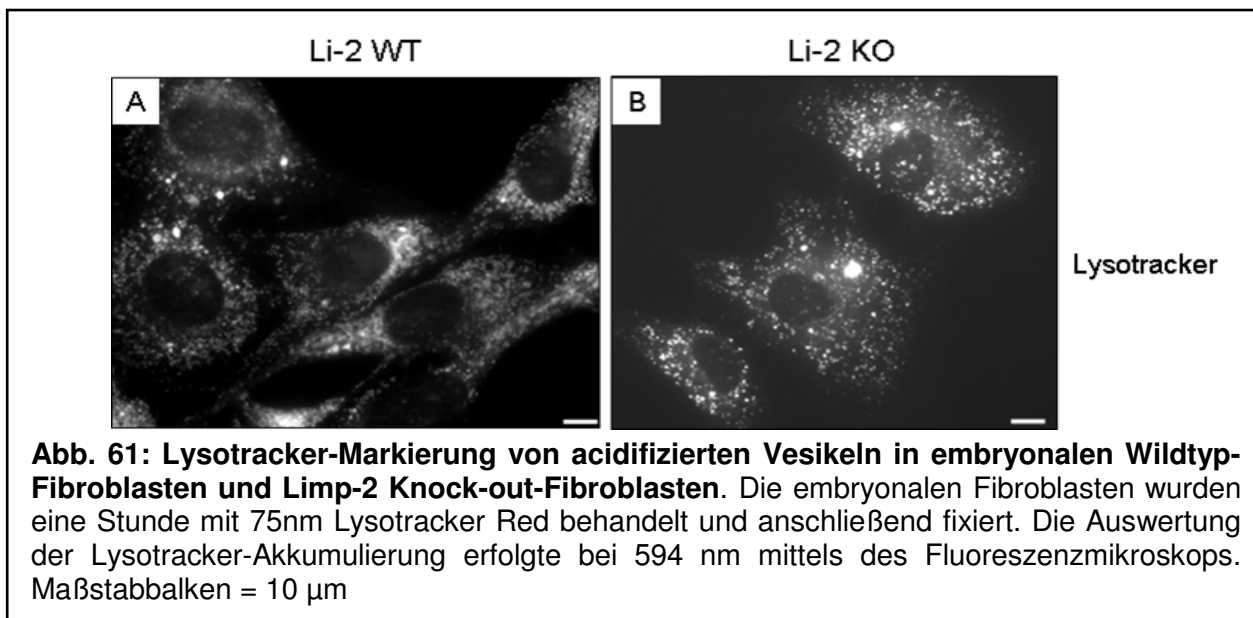


Abb. 60: Internalisierung von Transferrin in embryonale Wildtyp-Fibroblasten und Limp-2 Knock-out-Fibroblasten. Die embryonalen Fibroblasten wurden in der Passage 21 (Li-2 WT) und Passage 9 (Li-2 KO) für 30 min mit 0.05 mg/ml Transferrin inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in 4% PFA fixiert und mit dem Antikörper gegen Cathepsin D (1:100) inkubiert. Li-2 WT – embryonale Kontroll-Fibroblasten Nr. 5, Li-2 KO – Limp-2 Knock-out-Fibroblasten Nr. 2. Maßstabballen = 10 μ m

Um festzustellen, ob Limp-2 für den Aufbau oder den Erhalt des sauren pH-Wertes in den Lysosomen verantwortlich ist, wurden die Lysosomen mit dem *Lysotracker-Red* behandelt. Lysotracker sind leicht basische Amine, die in Vesikeln mit internem sauren pH-Wert vermutlich aufgrund von Protonierung akkumulieren. Mit Hilfe dieses Farbstoffes lassen sich Lysosomen detektieren, die einen normalen sauren pH-Wert aufweisen. Die Wildtyp-Fibroblasten und Limp-2 defizienten Fibroblasten wurden für eine Stunde mit 75 nM Lysotracker-Red inkubiert (Abb. 61 A und B). Es zeigten sich keine ersichtlichen Unterschiede zwischen Wildtyp-Fibroblasten und Limp-2 Knock-out-Fibroblasten in Größe und Verteilung der Lysosomen. Des Weiteren wurde durch die erfolgreiche Akkumulation des *Lysotracker-Red* in Lysosomen gezeigt, dass die Defizienz von Limp-2 den intralysosomalen pH-Wert nicht entscheidend beeinflusst.



4.9.5 Versuche zur Ermittlung von Interaktionspartnern mittels Quervernetzung

Aufgrund der Anomalien in der Limp-2 Knock-out-Maus wurde eine Fehlsortierung und/oder erhöhte lysosomale Degradierung der jeweils betroffenen Proteine in den ableitenden Harnwegen, dem Innenohr und den peripheren Nerven angenommen. Zur Klärung der Funktionen von Limp-2 im Sortierungs- und/oder Degradierungsprozess wurde Studien initiiert, Interaktionspartner zu ermitteln. Die Suche von Limp-2 Interaktionspartnern an lebenden Zellen erfolgte über die crosslinker DSS und DSP (s. 3.2.1.12). Diese Art des Experiments wurde gewählt,

da die Quervernetzung eine einfache Methode ist, Hinweise auf mögliche Interaktionen zu erhalten.

Die lipophilen Substanzen können die Plasmamembran passieren. Im Zytoplasma interagieren die Succimidester an beiden Seiten des *crosslinkers* (s. Material und Methoden, Abb. 14) mit freien Aminogruppen und binden durch den kurzen Arm zwischen den Enden des *crosslinkers* Proteine, die sich in räumlicher Nähe zueinander befinden (Abb. 62).

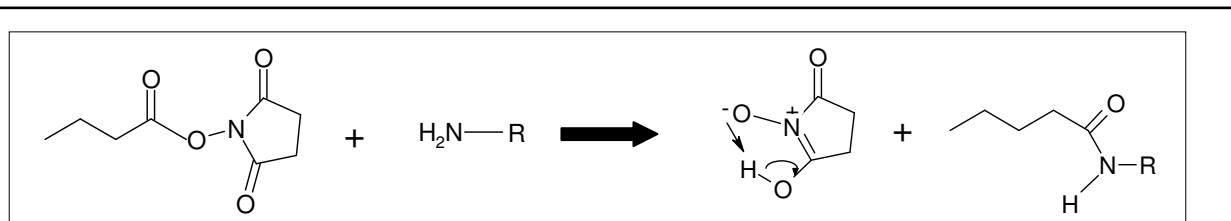
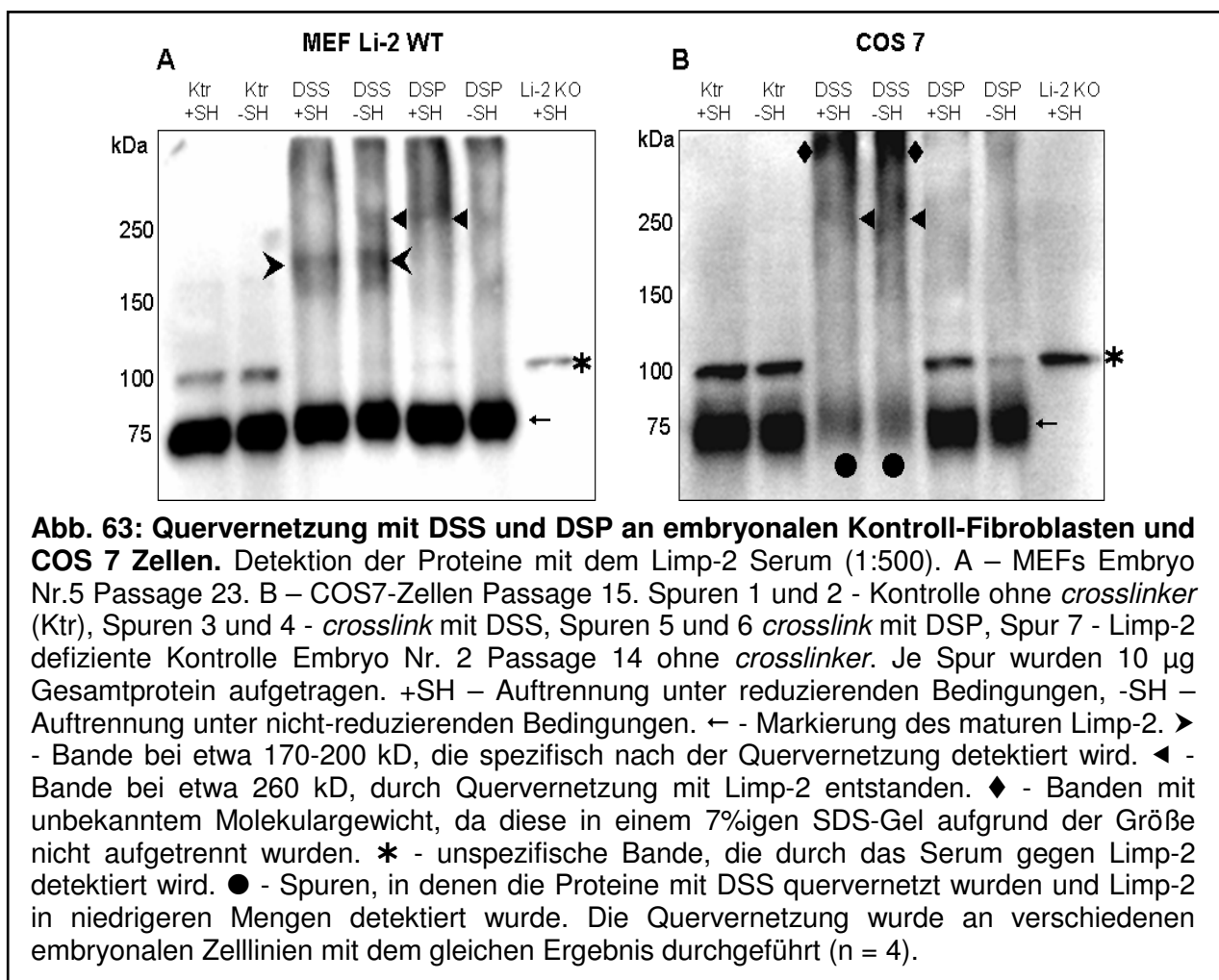


Abb. 62: Struktur des chemischen Vorgangs bei der Quervernetzung von Proteinen. Die Succimide an beiden Enden der *crosslinker* werden durch Proteine ersetzt. Als Produkte entstehen zwei Succimide und der *spacerarm*, der an beiden Seiten Proteine gebunden hat.

Die Inkubation mit dem *crosslinker* erfolgte für 30 Minuten bei 37°C und 5% CO₂. Die Quervernetzung wurde mittels der Immunoblot-Methode gegen Limp-2 ausgewertet. Bei den Quervernetzungs-Experimenten wurde je eine Kontrolle ohne *crosslinker* (Abb. 63 A und B, Ktr) eingeschlossen. Zur weiteren Kontrolle wurden Limp-2 defiziente, embryonale Fibroblasten mittels der Immunoblot-Analyse behandelt (Abb. 63 A und B, Li-2 KO), um unspezifische Bindungen des Limp-2 Serums (Abb. 63 A und B, Asterix) von spezifischen Bindungen zu unterscheiden. Die Proben wurden sowohl unter reduzierenden Bedingungen (+SH) als auch unter nicht-reduzierenden (-SH) Bedingungen aufgetrennt. Da die Substanz DSS über keine Schwefelbrücke verfügt (Abb. 14) und dadurch nicht mittels Reduktion gespalten werden kann, gab es nur geringe Unterschiede zwischen den Quervernetzungsexperimenten mit DSS, die unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt wurden (Abb. 63 A und B, DSS). In den embryonalen Kontroll-Fibroblasten werden nach der Quervernetzung mit DSS, zusätzlich zu dem maturen Limp-2 (Abb. 63 A und B, Pfeil), Proteinkomplexe bei etwa 170-200 kD (Abb. 63 A, offener Pfeilkopf) und etwa 260 kD (Abb. 63 A, geschlossener Pfeilkopf) erkannt, die eventuell außer Limp-2 noch ein oder mehrere Proteine unbekannter Natur beinhalten. Der Proteinkomplex mit einer vermuteten Größe von 260 kD entsteht ebenfalls durch die Quervernetzung

mit DSP (Abb. 63 A, geschlossener Pfeilkopf), dem spaltbaren *crosslinker*. Eventuell hat in diesem Experiment die Spaltung des *crosslinkers* mit β -Mercapto-Ethanol (+SH) nicht vollständig funktioniert, da sonst nur das mature Limp-2 (wie in den Kontrollen ohne *crosslinker*) hätte nachgewiesen werden können. Bei dem Quervernetzungsversuch mit DSS an COS7-Zellen (Abb. 63 B, DSS) wurde nicht der Proteinkomplex zwischen 170-200 kD, wohl aber der Proteinkomplex bei 260 kD von dem Limp-2 Serum detektiert (Abb. 63 B, geschlossener Pfeilkopf). Prägnant war bei dieser Quervernetzung die Markierung eines sehr großen Proteinkomplexes, dessen Molekulargewicht nicht bestimmt werden konnte (Abb. 63 B, Rhombus). Nach neuen Erkenntnissen kann durch den crosslink die DNA-Proteinkinase_{CS} erkannt werden (persönliche Mitteilung Y.Tanaka, Kyushu Universität, Japan), wobei die Funktion und Spezifität dieser Interaktion noch nicht geklärt ist. Die DNA-Proteinkinase_{CS} ist die katalytische Untereinheit der DNA-Proteinkinase und in der Reparatur nicht-homologer DNA-Enden involviert. Des Weiteren schützt die DNA-Proteinkinase_{CS} die Enden der Chromosomen vor Fusionsprozessen (Pastwa und Błasiak, 2003).



Auffällig ist bei der Quervernetzung mit DSS weiterhin, dass das Limp-2 Protein bei etwa 75 kD deutlich weniger durch das Limp-2 Serum detektiert wird (Abb. 63 B, Kreise). Möglicherweise wird nicht nur ein Limp-2 Protein mit dem/den Interaktionspartner(n) vernetzt, sondern eventuell mehrere Limp-2 Proteine. Bei der Quervernetzung der Proteine in COS7-Zellen mit DSP wurden außer Limp-2 keine weiteren Banden detektiert (Abb. 63 B, DSP). Vermutlich liegt die Ursache darin, dass die Quervernetzung mit dem spaltbaren *crosslinker* DSP nicht so stabil zu sein scheint wie die Quervernetzung mit DSS.

Zur Verstärkung der Signale von Limp-2 wurden die MEFs nach der Quervernetzung mit DSS und DSP mit dem Serum gegen Limp-2 immunpräzipitiert. Die Proben wurden zweimal unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und das Gel in der Mitte auseinander geschnitten. Eine Hälfte wurde auf eine PVDF-Membran transferiert, die über Nacht mit dem Serum gegen Limp-2 inkubiert wurde (Abb. 64 A), die andere Hälfte des SDS-Gels wurde für 2 Stunden mit Coomassie gefärbt und über Nacht entfärbt (Abb. 64 B).

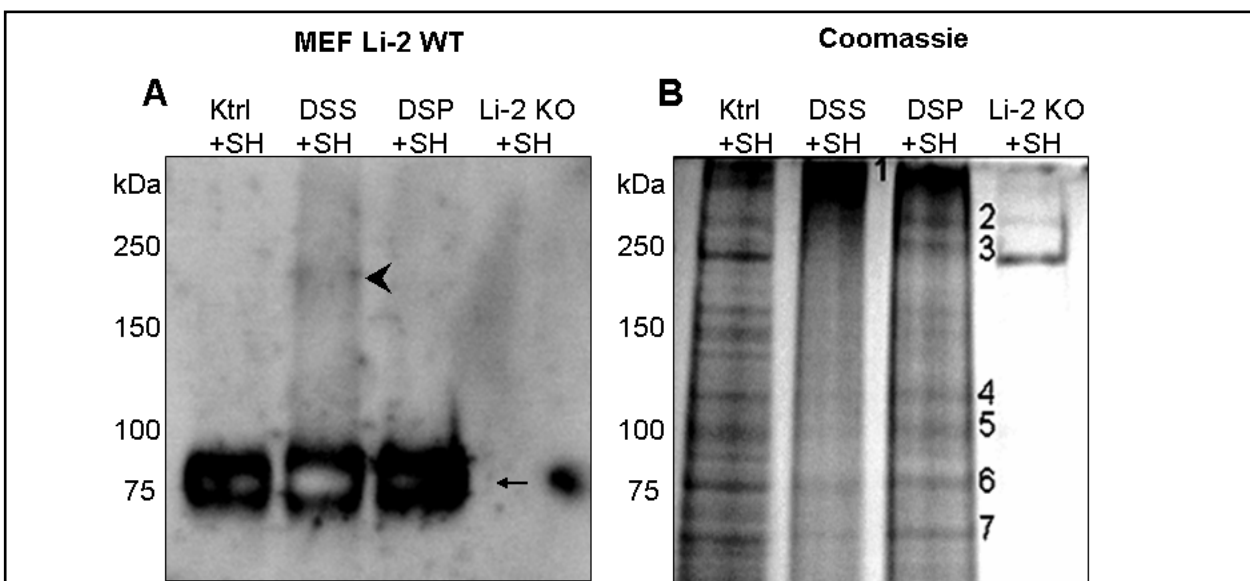


Abb. 64: Quervernetzung von Kontroll-MEFs und Immunpräzipitierung. Die embryonalen Fibroblasten wurden in der Passage 25 mit DSS und DSP quervernetzt und gegen Limp-2 immunpräzipitiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert Immunpräzipitat über eine 7%ige SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Das SDS-Gel wurde in der Mitte getrennt, eine Hälfte auf PVDF-Membran transferiert, die andere Hälfte mit Coomassie gefärbt und anschließend entfärbt. Der Nachweis von Limp-2 erfolgte mit dem Serum gegen den Vollängenklon. Ktrl – transfizierte Wildtyp-MEFs Passage 25, nicht quervernetzt. ← – Limp-2, ◄ – nach der Quervernetzung mit DSS detektierte Bande zwischen 170 und 200 kD. Li-2 KO – untransfizierte Limp-2 Knock-out-MEFs, quervernetzt und mit Limp-2 immunpräzipitiert. +SH – Auftrennung im SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen. 1-7 – Markierung der ausgeschnittenen Banden für die massenspektroskopische Analyse. Die Quervernetzung und folgende Immunpräzipitierung wurde an je vier verschiedenen embryonalen Zelllinien mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt.

Als Kontrollen wurden eine Kulturschale mit Wildtyp-MEFs und eine Limp-2 defiziente Zelllinie nicht mit dem *crosslinker* behandelt, aber ebenfalls mit dem Serum gegen Limp-2 immunpräzipitiert (Abb. 63 A und B, Ktrl und Li-2 KO). Durch die Immunpräzipitierung mit dem Serum gegen Limp-2 wurde das Signal, das nach der Quervernetzung zusätzlich durch das Serum gegen Limp-2 zwischen 170 und 200 kD detektiert wird, nicht verstärkt (Abb. 63 A, DSS offener Pfeilkopf). Es konnte lediglich ein leichter Anstieg in der Menge des Limp-2 Proteins durch die Immunpräzipitierung gemessen werden (Abb. 63 A Pfeil). Der Westernblot wurde anschließend mit der anderen Coomassie-gefärbten Hälfte des SDS-Gels verglichen. Dabei konnte der durch Limp-2 detektierte Proteinkomplex bei 170 bis 200 kD nicht im Coomassie-gefärbten SDS-Gel nachgewiesen werden (Abb. 63 B Coomassie). Da die im Immunoblot detektierten Banden im Coomassie-Gel nicht detektiert werden konnten, wurden mehrere Proteinbanden ausgeschnitten (Abb. 63 B, 1-7), die sich ausschließlich in den Wildtyp-Fibroblasten befanden. Diese Coomassie-gefärbten Proteinbanden wurden in Kollaboration mit Dr. Bernhard Schmidt an der Universität Göttingen massenspektroskopisch untersucht. In den analysierten Proteinbanden 1 bis 4 konnte kein Protein identifiziert werden. Die analysierten Proteinbanden aus der Quervernetzung mit DSP, die nur in den Wildtyp-MEFs gegen Limp-2 immunpräzipitierten, ergaben sowohl Ripk5 (*Receptor interacting protein kinase 5*) mit einer Größe von etwa 100 kD (Abb. 63 B, 5 und 6), das bei Überexpression Apoptose induziert (Zha *et al.*, 2004), als auch das Glukose-regulierte Hitzeschockprotein 5 bei 70 kD (Abb. 63 B, 7).

Aus weiteren Quervernetzungsexperimenten (Daten nicht gezeigt) wurden *Myosin heavy chain 9* mit einer Größe von 250 kD, *Caldesmon 1* bei 65 kD und γ - und β -*Actin* und das Propeptid von gamma-1-Actin (LAMB2) mittels der Massenspektroskopie identifiziert. Alle diese Proteine sind am Zytoskelett und der Motilität der Zelle beteiligt. Caldesmon kann an Actin und Myosin binden und die Kontraktibilität der Zelle beeinflussen (Foster *et al.*, 2004; Gusev, 2001). Das Actin-Zytoskelett, bestehend aus mehreren Actin-Isoformen (unter anderem γ und β) und ist ein Regulator in der Polarisierung und Motilität der Zelle (Nabi, 1999). Interessanterweise ist *Myosin heavy chain 9* eines der Proteine, die Taubheit hervorrufen können, wenn sie mutiert sind (Redowics, 2002).

5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die systematische Untersuchung des Phänotyps der Limp-2 Knock-out-Maus und die Erforschung eines Zusammenhangs zwischen Limp-2 und den entstehenden Krankheitsbildern bei der Defizienz des Proteins. Des Weiteren wurde dabei versucht, die Funktionen des Limp-2 Proteins näher zu analysieren und mögliche Interaktionspartner zu finden.

Der Phänotyp, der durch die Limp-2 Defizienz entsteht (Gamp *et al.*, 2003), zeichnet sich insbesondere aus durch die Entwicklung von

1. Ureterabgangsstenosen mit folgenden Hydronephrosen und Veränderungen im Blasen- und Ureterurothel,
2. Taubheit durch den Verlust des endocochlearen Potentials und Degenerierung der Stria vascularis,
3. peripherer Neuropathie, bedingt durch Defekte in der Myelinisierung.

Während der Phänotyp der Limp-2 Knock-out-Maus stark ausgeprägt ist, sind die Veränderungen bei der Lamp-1 Knock-out-Mäusen mild (Andrejewski *et al.*, 1999). Die Defizienz dieses ebenfalls abundanten lysosomalen Membranproteins wird in den meisten Geweben durch eine zum Teil erhöhte Expression von Lamp-2 ausgeglichen (Andrejewski *et al.*, 1999; Eskelinen *et al.*, 2003). Die Limp-2 Defizienz kann vermutlich nicht durch die erhöhte Expression anderer lysosomaler Membranproteine ausgeglichen werden, was den stark ausgeprägten Phänotyp erklärt.

Das lysosomale integrale Membranprotein Typ 2 (Limp-2) ist größtenteils in Lysosomen lokalisiert. Im Lebergewebe aus der Ratte wurde für Limp-2 ein Anteil von etwa 4% des Gesamtproteingehalts der lysosomalen Membran ermittelt (Akasaki *et al.*, 1992). Limp-2 gehört zur Familie der CD36-Proteine, auch *Scavenger* Rezeptor-Proteine genannt (Vega *et al.*, 1991a; Crombie und Silverstein, 1998). Mitglieder dieser Familie haben vielfältige Funktionen (siehe Einleitung). CD36, das Protein, nachdem die Familie benannt ist, ist hochglykosyliert und kann acetyliertes und oxidiertes LDL (Acton *et al.*, 1994), Fettsäuren, anionische Phospholipide und Collagen binden und/oder transportieren (Endemann *et al.*, 1993; Febbraio *et al.*, 1999). CD36 hat dadurch eine wichtige Funktion in der Regulierung des Lipoprotein-

und Fettsäurestoffwechsels. Dies wurde durch die Bindung von CD36 an Fettsäuren nachgewiesen (Febbraio *et al.*, 1999; Drover *et al.*, 2005). Da CD36 ein breites Spektrum verschiedener Liganden binden kann, werden für dieses Protein unter anderem Funktionen als Adhensionsmolekül durch die Bindung von Collagen angenommen (Acton *et al.*, 1994). Im Zusammenhang mit der Defizienz von CD36 wird im Menschen eine hypertrophische Kardiomyopathie beschrieben, die vermutlich durch die gestörte Aufnahme von langkettigen Fettsäuren im Myokardium verursacht wird (Febbraio *et al.*, 1999).

Ein weiteres Mitglied der CD36-Familie ist der *Scavenger Receptor class B type I* (SR-BI), welcher durch die Formierung eines Lipoprotein/Rezeptor-Komplexes für die Endozytose von HDL verantwortlich ist (Trigatti *et al.*, 2003). Die gestörte Endozytose von modifiziertem LDL und HDL spielt eine Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose (Brown und Goldstein, 1983; Trigatti *et al.*, 2003).

Die vermutete Funktion von Limp-2 in der Zelle liegt in der Biogenese von späten Endosomen/Lysosomen und in der Erhaltung des Gleichgewichts zwischen Vesikel-Aufnahme und –Abschnürung von endosomalen Membranen (Kuronita *et al.*, 2002). Die Überexpression von Limp-2 in verschiedenen Zellen (siehe Einleitung) führte zu einer Akkumulation von großen geschwollenen Vesikeln in der Zelle. Diese Vesikel wiesen Charakteristika von Endosomen und Lysosomen auf. Des Weiteren blockierte die Überexpression von Limp-2 den Weitertransport von endozytierten Proteinen und Molekülen über die großen Vesikel hinaus, was auch durch die Speicherung von Cholesterol gezeigt wurde (Kuronita *et al.*, 2002). Aufgrund dieser Überexpressionsversuche gehen die Autoren davon aus, dass der Ursprung der großen Vesikel entweder in gesteigerten Fusionsprozessen von endozytierten Vesikeln und/oder Endosomen liegt oder an einer gestörten Aufnahme von Vesikeln an der Plasmamembran.

5.1 Allgemeines über die Limp-2 Knock-out-Maus

Die Limp-2 Knock-out-Maus ist fertil. Die Weibchen dieser Zucht können im Schnitt etwa drei bis vier Würfe produzieren, während Limp-2 heterozygote Weibchen bis zu dreizehn Würfe mit normaler Wurfgröße austragen können. Die Anzahl des Limp-2

defizienten Nachwuchses von zwei bis acht Tieren je Wurf ist etwa um das 1.5-fache geringer als bei Kontrolltieren mit demselben genetischen Hintergrund (Daten nicht gezeigt). Ein Grund für die Anzahl von nur drei bis vier Würfen mit geringer Wurfzahl der Limp-2 defizienten Weibchen kann in der Entwicklung von massiven Hydronephrosen, die bei etwa 50% der Limp-2 Knock-out-Mäuse beobachtet wurde, und einer erhöhten Mortalität liegen (s. 4.5).

Die Limp-2 Defizienten Männchen sind noch im Alter von 14 Monaten fertil. Dies wurde bei Verpaarungen mit Limp-2 heterozygoten Weibchen festgestellt. Bei den Verpaarungen von heterozygoten Weibchen mit Limp-2 Knock-out-Männchen wurde Nachwuchs gemäß den Mendelschen Regeln geboren (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche embryonale Letalität ist daher auszuschließen.

Bei 5% der Limp-2 defizienten Mäuse wurden Darmvorfälle beobachtet, die mit einem Ausstülpfen des Anus begannen und teilweise mit dem Ausstülpfen des Rektums endeten (Rektum-Prolaps). Mögliche Ursachen dieses Krankheitsbildes sind die Lockerung der Aufhängung des Dickdarms im Bereich des Kreuzbeins und häufig eine Schwächung der Beckenboden-Muskulatur. Das vorgefallene Rektum erscheint als angeschwollener, leicht blutender Knoten außerhalb des Afters (Abb. 21 b, A und D). Die genaue Ursache des Rektum-Prolaps im Zusammenhang mit der Limp-2 Defizienz konnte bis jetzt nicht geklärt werden.

Ein weiteres makroskopisch sichtbares Phänomen der Limp-2 Knock-out-Mäuse ist bei 40% der Tiere in Form von kahlen Hautstellen sichtbar (Abb. 21 b, C und D). Vermutlich kommt es zu einer Verhaltensstörung der Tiere, die sich öfter selbst und gegenseitig putzen. Es muss jedoch noch untersucht werden, ob möglicherweise das Fehlen von Limp-2 Störungen im Haarzyklus zur Folge hat. Das gleiche Phänomen wurde bei der Cathepsin L Knock-out-Maus beobachtet. Durch das Fehlen der lysosomalen Proteinase kommt es zu Veränderungen in der Morphogenese der Haarfollikel und zu Störungen des periodischen Wechsels zwischen Ausfall und Wachsen der Haare im Haarzyklus (Roth *et al.*, 2000).

5.2 Schädigungen der ableitenden Harnwege der Limp-2 Knock-out-Maus

5.2.1 Hydronephrosen

Wie bereits in der beschreibenden Arbeit über die Limp-2 Knock-out-Maus von Gamp *et al.* (2003) erwähnt, entwickeln etwa 30% der Limp-2 defizienten Mäuse bereits ab einem Alter von drei Monaten Hydronephrosen, die entweder uni- oder bilateral ausgeprägt waren. In den meisten Fällen der bilateralen Hydronephrosen war eine Niere mehr als die andere vergrößert. Im Endstadium des Krankheitsbildes waren die Tiere in der Bewegung sehr eingeschränkt, da die Hydronephrosen aufgrund ihrer Größe alle inneren Organe beiseite drückten und oft Blutungen innerhalb der geweiteten Niere beobachtet wurden. Die Ursache der Entwicklung von Hydronephrosen in den Limp-2 Knock-out-Mäusen ist mit großer Wahrscheinlichkeit eine Stauung des Harns im Ureter, bedingt durch eine Ureterabgangsstenose im proximalen Bereich nahe des Nierenbeckens. Die Zellen der Mukosa im Bereich des Übergangs zwischen Nierenbecken und Ureter werden metaplasisch und die Zellen hyperproliferieren, wobei der Grund dieser Veränderungen nicht geklärt ist (Gamp *et al.*, 2003). Eventuell ist, bedingt durch den Verlust der Uroplakine, die Permeabilitätsbarriere der Deckzellen gegen den Urin und die darunter liegenden Zellschichten nicht mehr vorhanden (Hu *et al.*, 2002). Aus diesem Grund könnten EGF-verwandte Mitogene, die sich in hoher Konzentration im Urin befinden (Parries *et al.*, 1995), in die Zellen der Mukosa eindringen und die Zellproliferation stimulieren (Rebel *et al.*, 1994). Alternativ sollte diskutiert werden, ob die urothelialen Plaques in der Signalkaskade von Wachstumsinhibitoren eine Rolle spielen und ob durch die Defizienz der Plaques diese Wachstumsinhibitoren nicht stimuliert werden können, was zur Hyperplasie führen könnte (Kong *et al.*, 2004). Eine weitere mögliche Ursache der Hyperplasie könnte eine kompensatorische Proliferation der Zellen der Mukosa sein, um den Funktionsverlust des Urothels auszugleichen. Das durch die Hyperplasie zusätzlich gebildete Zellmaterial wird vermutlich in den Ureter hineingefaltet und verengt das Lumen des Ureters zu einem kleinen Spalt (Gamp *et al.*, 2003).

5.2.2 Mögliche Zusammenhänge zwischen einer gestörten Uroplakin-Expression und der Limp-2 Defizienz in den ableitenden Harnwegen

Die Deckzellen des Urothels haben eine sehr lange Lebensdauer von bis zu 200 Tagen. Begünstigt wird die Lebensdauer vermutlich durch die stetige Erneuerung der apikalen Membran (Born *et al.*, 2003). Uroplakin-enthaltende diskoidale/fusiforme Vesikel werden während des Füllens der Blase an die apikale Membran exozytiert, wobei Rab27b mit diesen diskoidalen/fusiformen Vesikeln assoziiert ist und vermutlich bei der Regulation des Transports zur apikalen Membran beteiligt ist (Chen *et al.*, 2003). Gleichzeitig werden Uroplakin-Plaques von der apikalen Membran endozytiert und zu Endosomen und Lysosomen geliefert (Truschel *et al.*, 2002) sowie neue Vesikel mit Uroplakinen am TGN gebildet (Apodaca, 2004).

Eine alternative Theorie zur Erneuerung der apikalen Membran von Deckzellen geht davon aus, dass Membranausstülpungen mit apikalen Plaques über SNARE-vermittelte Exozytose abgeschnürt, über den Urin ausgeschieden und die abgeschnürten Bereiche durch neue Uroplakin-Plaques ersetzt werden (Born *et al.*, 2003). Der Kontakt von Uroplakinen mit Limp-2 könnte also nach der Endozytose von Uroplakin-Plaques und dem anschließenden Transport über Endosomen zu Lysosomen entstehen. Darüber hinaus könnte dieser Kontakt auch bei der Neu-Synthese von Uroplakinen und durch den möglicherweise teilweisen gemeinsamen Transport von Uroplakinen und Limp-2 vom TGN zur apikalen Membran zustande kommen.

Die Besonderheit bei der Neu-Synthese von Uroplakinen liegt darin, dass Uroplakin 1b, wenn es in humanen Nierenzellen exprimiert wird, das endoplasmatische Retikulum auch ohne seine Heterodimer-Partner UP3a und 3b verlassen kann und zur apikalen Membran transportiert wird (Deng *et al.*, 2002). Da UP1b das einzige Uroplakin ist, das außer im Urothel auch in der Cornea und in der Plazenta exprimiert wird und dort vermutlich der Stabilisierung und dem Schutz vor Bakterien dient (Adachi *et al.*, 2002), ist es sehr wahrscheinlich, dass der Transport von UP1b vom TGN zur apikalen Membran unabhängig ist von anderen Uroplakinen. Alle anderen Uroplakine sind auf die Co-Expression ihres Heterodimer-Partners angewiesen, um das ER verlassen zu können (Deng *et al.*, 2002; Tu *et al.*, 2002). Es wurde gezeigt, dass die Expression der Uroplakine 3a, 3b und 1b, die Heterodimere bilden (s. 1.8.1) im Laufe der postnatalen Entwicklung im Limp-2 defizienten Urothel gestört ist.

Besonders niedrig erscheint dabei die Expression von UP3a und UP3b (Abb. 32). Es ist eher unwahrscheinlich, dass Limp-2 eine entscheidende Rolle bei der Neusynthese aller Uroplakine spielt, da die Expression und Verteilung der Uroplakine 1a und 2 durch die Limp-2 Defizienz nicht gestört zu sein scheint (s. 4.6.1.2 und 4.6.2.1). Des Weiteren wurden trotz der Lokalisierungsveränderungen und der reduzierten Expression der Uroplakine in dem Urothel der Limp-2 Knock-out-Maus noch apikal lokalisierte Uroplakin-Plaques detektiert (Abb. 24, 25 und Abb. 29-31). Aufgrund dessen können die Bildung der urothelialen Plaques im ER (Apodaca, 2004) und die Sortierung der Uroplakin-Plaques in Vesikel am TGN (Hicks, 1966) nur bedingt abhängig sein von Limp-2. Eine Beteiligung von Limp-2 bei dem Transport der Uroplakin 3a/3b-positiven Vesikel vom TGN zur apikalen Membran kann nicht ausgeschlossen werden, da in einigen Fällen eine ungewöhnliche Lokalisierung von Uroplakin 3a-positiven Plaques in basolateralen Bereichen der Limp-2 defizienten Deckzellen beobachtet wurde (Abb. 25 E). Die Uroplakin-enthaltenden diskoiden Vesikel in den Deckzellen des Urothels bilden vermutlich durch homotype Fusion, kontrolliert von Rab27b, fusiforme Vesikel, die sich von diskoiden Vesikeln durch ihre Form unterscheiden (Chen *et al.*, 2003). Auch bei diesen Fusionsprozessen kann eine Beteiligung von Limp-2 angenommen werden, da eine Funktion von Limp-2 in der homotypen Fusion von Endosomen nach Überexpression in verschiedenen Zellen (siehe Einleitung) bereits beschrieben wurde (Kuronita *et al.*, 2003).

Uroplakin 3a- und Uroplakin 2-Knock-out-Mäuse zeigten die Folgen der Defizienz von Uroplakinen auf (Hu *et al.*, 2002 und 2004; Kong *et al.*, 2004). Bei der UP3a und UP2 Knock-out-Maus entstehen im Alter von zwei bis drei Monaten Hydronephrosen, bedingt durch einen vesikoureteralen Reflux (VUR) von Urin (UP3a Knock-out-Maus) oder durch eine Ureterabgangsstenose und VUR (UP2 Knock-out-Maus). In der UP3a defizienten Maus kommt es zu einer Reduzierung der apikalen urothelialen Plaques in Expression und Größe, da vermutlich das dem UP3a struktur-ähnliche Uroplakin 3b die Defizienz nicht komplett ausgleichen kann (Chen *et al.*, 2003). Diese These wird dadurch unterstützt, dass in der UP2 defizienten Maus keine urothelialen Plaques detektierbar sind. Für Uroplakin 2 existiert kein Struktur analogon (Kong *et al.*, 2004). Es kommt es in den UP2 und UP3a Knock-out-Mäusen zu einem Verlust von Uroplakinen in den diskoiden/fusiformen Vesikeln, die dadurch genau wie in den Limp-2 Knock-out-Mäusen rund erscheinen und zu einer

veränderten Lokalisierung der jeweiligen Heterodimer-Partner in den Deckzellen beitragen können.

In dem Blasenurothel der Limp-2 Knock-out-Maus kommt es zu Veränderungen in der Zellgröße. Das Urothel von Wildtyp-Mäusen ist mit Zellen bedeckt, die einen Durchmesser von etwa 150 µm haben (Koss, 1969). Die großen Deckzellen minimieren, bedingt durch ihre Größe, den interzellularen Raum und erfüllen dadurch eine Funktion in der Permeabilitätsbarriere gegen den Urin (Apodaca, 2004). Der Mechanismus, der verantwortlich ist für die Bildung der meist tetra- oder oktaploiden Zellen (Farsund, 1975), konnte noch nicht geklärt werden. Wie auch schon für die Limp-2 Knock-out-Maus beschrieben, entstehen im Blasenurothel der Uroplakin 2- und 3a-Knock-out-Mäuse extrem kleine Deckzellen und große, teilweise Uroplakin-haltige, abnormal große intrazelluläre Vesikel. Aufgrund der Störungen in der Entwicklung der großen Deckzellen in Uroplakin 2 Knock-out-Mäusen und 3a Knock-out-Mäusen (Hu *et al.*, 2000; Kong *et al.*, 2004) kann angenommen werden, dass die urothelialen Plaques eine Rolle bei der Formierung und Größendetermination dieser Zellen spielen.

Alle Veränderungen im Urogenitaltrakt der UP3a Knock-out-Maus entsprechen denen, die durch die Defizienz von Limp-2 entstehen, mit der Ausnahme der Ureterabgangsstenose, die bei UP3a Knock-out-Mäusen nicht beschrieben wurde. Eine direkte Beteiligung von Limp-2 an der Ausbildung der Anomalien in den ableitenden Harnwegen erscheint aufgrund der UP3a Knock-out-Maus weniger wahrscheinlich. Die primäre Ursache dieser Veränderungen in der Limp-2 Knock-out-Mäuse liegt vermutlich viel mehr in der, durch das Fehlen von Limp-2 gestörten Expression von Uroplakin 3a und 3b oder in der Heterodimer-Bildung von Uroplakin 3a und 3b mit Uroplakin 1b. Eine Funktion von Limp-2 bei der Lokalisierung und der Expression von Uroplakin 1b wird nicht angenommen, da keine Schäden in der Plazenta und den Augen der Limp-2 defizienten Tiere auftreten, in denen ebenfalls Uroplakin 1b exprimiert wird (Adachi *et al.*, 2002).

5.3 Taubheit der Limp-2 Knock-out-Maus

Die Entwicklung der Taubheit in Limp-2 defizienten Mäusen beginnt bei 50% der Tiere ab einem Alter von einem Monat. Der Verlauf des Hörverlustes ist progressiv

und endet mit kompletter Taubheit im Alter zwischen drei bis sieben Monaten (Gamp *et al.*, 2003). Die Veränderungen in der Cochlea der Limp-2 defizienten Mäuse beginnen mit der sichtbaren Atrophierung der Stria vascularis in einem Alter von zwei Monaten. Die Kompartimentierung der Stria vascularis ist verantwortlich für den Aufbau und Erhalt des endocochlearen Potentials (Kikuchi *et al.*, 1995; Marcus *et al.*, 2002; Takeuchi und Ando, 2005), welches essentiell für die Transduktion von mechanischen Reizen in elektrische Signale ist (Wangemann, 1997). Vermutlich degenerieren in den Limp-2 defizienten Mäusen die äußeren Haarzellen sekundär, bedingt durch den Verlust bzw. die Reduktion des endocochlearen Potentials (Takeuchi *et al.*, 2000). Die Atrophierung der äußeren Haarzellen wurde ab einem Alter von etwa sechs Monaten beobachtet (Gamp *et al.*, 2003). In Limp-2 Knock-out-Mäusen, die älter als neun Monate waren, wurde eine signifikante Reduktion der Neuronen im Spiralganglion beschrieben (Gamp *et al.*, 2003). Die Reduktion der Neuronenanzahl ist wahrscheinlich ebenfalls ein sekundärer Effekt, der auf den Verlust des endocochlearen Potentials und die Atrophierung der äußeren Haarzellen zurückzuführen ist.

5.3.1 Veränderungen in der Stria vascularis der Limp-2 Knock-out-Maus

Anomalien in der apikalen Membran der Marginalzellen der Limp-2 defizienten Stria vascularis konnten insbesondere für die Expression und Lokalisierung der Kaliumkanäle gezeigt werden. Die Kaliumkanäle sind für die Sekretion von Kalium in die Endolympe verantwortlich. Der dadurch aufgebaute Kaliumionengradient ist indirekt am Aufbau des endocochlearen Potentials beteiligt (Wangemann, 1997). Bei Knock-out-Mäusen, denen die Kaliumkanäle KCNQ1 und KCNE1 fehlen, ist der endolymphatische Raum in der Cochlea und im Vestibularorgan vollständig kollabiert (Vetter *et al.*, 1996; Wangemann *et al.*, 1996; Casimiro *et al.*, 2000; Rivas und Francis, 2005). Ebenfalls wurde die Entwicklung einer Taubheit, einhergehend mit dem Verlust des endocochlearen Potentials für KCNJ10 Knock-out-Mäuse beschrieben (Marcus *et al.*, 2002; Wangemann *et al.*, 2004). Allerdings wurde bis jetzt nur für die KCNQ1 Knock-out-Maus eine Atrophierung der Stria vascularis mit dem Verlust der Dreischichtigkeit beschrieben (Rivas und Francis, 2005), wie sie durch die Defizienz von Limp-2 entsteht. Ein weiterer Ionenkanal, der in der

basolateralen Membran der Marginalzellen der Stria vascularis lokalisiert ist, ist der Na/K/Cl-Kotransporter. Erwartungsgemäß sind diese Knock-out-Mäuse durch den Zusammenbruch des endocochlearen Potentials taub und in dieser Knock-out-Maus wird eine abnormale Position der Stria vascularis durch die Kollabierung der Endolymphe beschrieben, die allerdings nicht, wie bei der Limp-2 Knock-out-Maus atrophiert (Dixon *et al.*, 1999).

Limp-2 spielt vermutlich eine Rolle in der Sortierung der Kaliumkanäle in die apikale Membran der Marginalzellen der Stria vascularis und der dunklen Zellen des Vestibularorgans. Eine weitere Beteiligung von Limp-2 bei der frühen Heterodimerbildung von KCNQ1 und KCNE1 im ER kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

Die Dreischichtigkeit der Stria vascularis basiert insbesondere auf Claudinen. Claudine sind Zelladhäsionsproteine, die sehr enge Verbindungen zwischen Zellen (*tight junctions*) herstellen und Barrieren zwischen einzelnen flüssigkeitsgefüllten Kompartimenten bilden (Florian, *et al.*, 2003; Kitajiri *et al.*, 2004a). Bisher wurden alleine in den Marginalzellen der Stria vascularis neun verschiedene Claudine identifiziert, die durch ihre Expression die Stria vascularis von der kaliumreichen Endolymphe trennen (Kitajiri *et al.*, 2004b). Claudin-14 führt, wenn es mutiert oder deletiert wurde, zu früher Taubheit durch die Degenerierung der Haarzellen im Corti-Organ, ohne das endocochleare Potential zu verändern (Ben-Yosef *et al.*, 2003). Das einzige Claudin, welches in den Basalzellen der Stria vascularis bisher identifiziert wurde, ist das Claudin-11, welches die Basalzellschicht von der darunterliegenden natriumreichen Perilymphe trennt. Die Funktion von Claudin-11 wurde über die Generierung einer Claudin-11 Knock-out-Maus gezeigt, in der die Basalzellen der Stria vascularis keine Barriere gegen die Perilymphe mehr bilden können und dadurch das endocochleare Potential nicht mehr aufrechterhalten werden kann (Kitajiri *et al.*, 2004a).

Die Expression und Lokalisierung der Claudine in der Cochlea der Limp-2 Knock-out-Mäuse wurde bis jetzt noch nicht überprüft. Aufgrund der Atrophierung der Stria vascularis kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Defizienz von Limp-2 zu Störungen in der Claudin-Verteilung und/oder zu Fehlsortierungen dieser Proteine in den Marginalzellen führt und dadurch eventuell die Barriere zwischen der kaliumreichen Endolymphe und der natriumreichen intrastriären Flüssigkeit gestört wird (Florian *et al.*, 2003).

Eine weitere Störung in der Stria vascularis der Limp-2 defizienten Mäuse ist die gestörte Lokalisierung und/oder die Expression von Megalin. Megalin ist ein Rezeptor, der wie auch die Kaliumkanäle KCNQ1 und KCNE1 in der apikalen Membran der Marginalzellen lokalisiert ist. Welche Liganden Megalin aus der Endolymphe binden und endozytierten, ist noch unklar. Die Funktion von Megalin in der Niere und im Gastrointestinaltrakt ist besser untersucht. In der Niere und im Darm liegt Megalin im Heterodimer mit Cubilin vor und reabsorbiert über den Urin und den Kot unter anderem Vitamin D (Verroust und Christensen, 2002), Calcium (Christensen *et al.*, 1992) und die Lipoproteine HDL und LDL (Hammad *et al.*, 1999). Über mögliche Substrate von Megalin im Innenohr kann nur spekuliert werden. Über die Zusammensetzung der Endolymphe ist mit Ausnahme von Kalium-, Natrium- und Calciumionen nicht viel bekannt (Krasnikova, 1976). Megalin könnte demnach wie in der Niere und im Darm Calcium in der Endolymphe und vermutlich von Marginalzellen exozytierte Proteine binden. Megalin scheint für den Hörvorgang nicht essentiell zu sein, da bisher für Megalin Knock-out-Mäuse keine Taubheit oder Hörschäden beschrieben wurden (Willnow *et al.*, 1996). Die gestörte Lokalisierung von Megalin in der Limp-2 defizienten Maus durch eventuelle Fehlsortierung und/oder die anschließende Degradierung in Lysosomen in den Marginalzellen könnte direkt von Limp-2 abhängig sein. Dagegen spricht, dass die Expression von Megalin in den proximalen Tubuli der Limp-2 Knock-out-Nieren im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen nicht gestört ist (eigene Daten). Allerdings kann die Sortierung von Megalin an die apikale Membran in verschiedenen Geweben der Maus von unterschiedlichen Faktoren abhängig sein. Dafür spricht zum ersten, dass Megalin drei mögliche Tyrosin-Sortierungsmotive enthält (Caplan, 2003). Zum Zweiten kann die Sortierung von neu-synthetisierten Membranproteinen in polarisierten Zellen gewebeabhängig verschiedene Wege gehen. Neu-synthetisierte Proteine können direkt zur Plasmamembran sortiert werden oder in sekretorischen Vesikeln zu ihrem Bestimmungsort transportiert werden (Griffiths und Simons, 1986; Le Gall *et al.*, 1995).

5.4 Periphere Neuropathie der LIMP-2 Knock-out-Maus

LIMP-2 defiziente Mäuse entwickeln eine demyelinisierende Neuropathie, die nur das PNS und nicht das ZNS betrifft. Im Laufe der postnatalen Entwicklung verdicken sich die Nerven um das 1.5-fache der Wildtyp-Mäuse und es kommt zu einem Verlust von etwa 20% der Axone (Gamp *et al.*, 2003). Für die Myelinisierung der Axone in den peripheren Nerven sind in erster Linie die Schwann-Zellen verantwortlich. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der Myelinproteine in den myelinisierenden Schwann-Zellen der LIMP-2 Knock-out-Mäuse reduziert ist.

An der Myelinisierung und Funktion der Schwann-Zellen und folglich auch indirekt an der Reizleitung in den Nerven sind viele verschiedene Proteine beteiligt, die mutiert alle periphere Neuropathien mit unterschiedlichen Schweregraden auslösen (Suter und Scherer, 2003). Eines der abundantesten Proteine im Myelin mit einem Anteil von etwa 50% ist das P0 (Brown und Lemke, 1997; Ekici *et al.*, 2002), ein Typ I Transmembranprotein, das zur Immunoglobulin Superfamilie gehört (Suter und Scherer, 2003). P0 ist für die Adhäsion und die Kompaktheit des Myelins von großer Bedeutung, da die P0-Homotetramere zwischen den einzelnen myelinisierten Schwann-Zellwindungen um das Axon miteinander interagieren. Bei der Defizienz von P0 in Mäusen (Giese *et al.*, 1992) oder bei Mutationen in diesem Protein kann kein kompaktes Myelin gebildet werden und die Reizleitung in den Nerven ist stark verlangsamt (Ekici *et al.*, 2002). Menschliche Krankheitsbilder, die mit Mutationen im Myelinprotein P0 zusammenhängen, sind *Charcot-Marie-Tooth* (CMT) Form 1B und *Dejerine-Sottas-Syndrom* (DSS), die je nach Ort der Mutation verschiedene Schweregrade ausbilden (Brown und Lemke, 1997; Kochanski, 2004).

Es konnte gezeigt werden, dass das Myelinprotein P0 in den peripheren Nerven der LIMP-2 defizienten Mäuse niedriger exprimiert wird als bei Wildtyp-Mäusen. Aufgrund gestörter P0-Expressionen verliert das Myelin teilweise seine kompakte Struktur. Dieser Fakt könnte die Re- und Demyelinisierung der LIMP-2 Knock-out-Schwann-Zellen erklären, die zum charakteristischen Krankheitsbild bei verminderter P0-Expression gehört.

Ein weiteres sehr gut untersuchtes Myelinprotein ist das PMP22, das zur Tetraspaninfamilie gehört und Homodimere und -multimere bildet (Rous *et al.*, 2005). PMP22 spielt eine Rolle in der Entwicklung und der Struktur des kompakten Myelins (Tobler *et al.*, 1999; Suter und Scherer, 2003). PMP22-Mutationen sind

verantwortlich für die menschlichen Krankheitsbilder HNPP (*hereditary neuropathy with liability to pressure palsies*) und die CMT-Formen 1A, 1B und DSS (Muller *et al.*, 1997; Suter und Scherer, 2003). Einige PMP22-Mutationen führen zu Transportstörungen. Das mutierte PMP22 wird in dem ER zurückgehalten und verhindert durch direkte Interaktion den Transport nicht mutierter PMP22-Proteine (Naef und Suter, 1999; Tobler *et al.*, 1999).

Auch für das Myelinprotein PMP22 konnte in den peripheren Nerven der Limp-2 Knock-out-Maus im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine niedrigere Expression nachgewiesen werden. Genau wie P0 ist auch PMP22 verantwortlich für die Stabilität und Festigkeit der konzentrischen Myelinringe und verursacht bei verminderter Expression Defekte in der Myelinisierung der Schwann-Zellen (Sereda *et al.*, 1996), vergleichbar mit denen in der Limp-2 Knock-out-Maus.

Eine Interaktion zwischen P0 und PMP22 wird immer noch diskutiert (D'Urso *et al.*, 1999; Tobler *et al.*, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass eine reduzierte Expression von P0 und PMP22 zu der peripheren Neuropathie HNPP führen kann (Young und Suter, 2003).

Zusammenhänge von Myelinproteinen mit Endosomen und Lysosomen wurden in der *Trembler-J*-Maus beschrieben, einem Mausmodell der CMT-Krankheit, das eine Mutation im PMP22-Gen trägt (Notterpek *et al.*, 1997). In diesem Tiermodell wurde eine reduzierte Expression der Myelinproteine P0, PMP22 und MBP und eine erhöhte Expression der lysosomalen Proteine Lamp-1 und Cathepsin D beschrieben, die auf eine gesteigerte lysosomale Degradierung der Myelinproteine schließen lässt (Notterpek *et al.*, 1997; Fortun *et al.*, 2003, 2005). Die Autoren gehen davon aus, dass mutiertes PMP22 in das Myelin integriert wird, wobei das Myelin durch Mutationen im PMP22-Protein instabil wird. Die Myelinproteine PMP22, P0 und MBP werden dadurch vermutlich endozytiert und über späte Endosomen in Lysosomen degradiert. Die Beobachtung, dass eine niedrigere Expression der Myelinproteine einherging mit einer erhöhten Expression spät endosomaler/lysosomaler Proteine in der Limp-2 Knock-out-Maus ist vergleichbar mit der Situation in der *Trembler-J*-Maus.

Weitere Zusammenhänge peripherer Neuropathien mit Endosomen und Lysosomen wurden bei Patienten mit den CMT-Formen 1C und 2B gefunden. Bei der CMT1C

liegen Mutationen in dem spät endosomalen/lysosomalen Protein SIMPLE (*small integral membrane protein of lysosome/late endosome*) vor. SIMPLE ist ein kleines 17.1 kD schweres Protein mit einer Zinkfinger-Domäne, das ubiquitär exprimiert wird (Moriwaki et al., 2001; Street et al., 2003). Es wird vermutet, dass SIMPLE wie ein Clathrin-Adaptor-Molekül funktioniert und ubiquitinierte Proteine zu Endosomen liefert (Bennett et al., 2004). Das Myelinprotein PMP22 könnte ein Substrat für diesen über SIMPLE-gesteuerten Abbauweg sein (Saifi et al., 2005). Bei der CMT2B, einer axonalen Form der CMT-Krankheit (Auer-Grumbach et al., 2003), ist die kleine spät endosomale GTPase Rab7 mutiert, die ubiquitär exprimiert wird (Verhoeven et al., 2003). Rab7 ist involviert in dem Transport zwischen späten Endosomen und Lysosomen (Buczynski et al., 1997) und es konnte gezeigt werden, dass der Rab7-Effektor RILP (*Rab interacting lysosomal protein*) diesen Transport über Mikrotubuli reguliert (Cantalupo et al., 2001; Jordens et al., 2001). Durch Mutationen in der GTPase wird vermutlich die lysosomale Degradierung von Proteinen inhibiert (Press et al., 1998), was zu einer peripheren Neuropathie führen kann (Verhoeven et al., 2003).

Limp-2 kann vermutlich wie Rab7 eine Rolle bei der Sortierung der Myelinproteine zur Plasmamembran der Schwann-Zellen spielen. Eine weitere Beteiligung von Limp-2 bei der Homodimerbildung von PMP22 und/oder bei der Homotetramerbildung von P0 kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Durch eine veränderte Dimer- oder Tetramerbildung dieser Myelinproteine könnte die Insertion in die Plasmamembran fehlerhaft sein und einen Transport in Endosomen/Lysosomen auslösen (Bonifacino and Lippincott-Schwartz, 1991), was für PMP22 bereits gezeigt wurde (Naef und Suter, 1999). Aufgrund des hohen Umsatzes (*turn over*) der Myelinproteine spielt der endosomale/lysosomale Apparat in den Schwann-Zellen eine wichtige Rolle (Notterpek et al., 1999). Die Defizienz von Limp-2 könnte also eine Veränderung im endosomalen/lysosomalen Degradierungsweg der Myelinproteine hervorrufen. Dies wurde für Mutationen des spät endosomalen/lysosomalen Proteins SIMPLE gezeigt (Street et al., 2003; Saifi et al., 2005).

5.5 Gemeinsamkeiten in den drei betroffenen Zelltypen der Limp-2 Knock-out-Maus

Die drei betroffenen Zelltypen in der Limp-2 defizienten Maus, Deckzellen in Ureter und Blase, Myelin-produzierende Schwann-Zellen in peripheren Nerven und Marginalzellen der Stria vascularis im Innenohr, sind alles polarisierte Zellen. Die Schwann-Zellen werden aufgrund ihrer Form, Verteilung der Membranproteine und Anordnung des Zytoskeletts als polarisierte Zelle angesehen (Knust und Bossinger, 2002). Des Weiteren hat Myelin große Ähnlichkeiten mit der Glykosphingolipid-angereicherten apikalen Membran epithelialer Zellen (Craig und Banker, 1994).

Die Plasmamembran polarisierter Zellen ist in zwei Domänen unterteilt, die apikale und die basolaterale Membran, die sich in ihrer Proteinzusammensetzung grundlegend unterscheiden (Caplan *et al.*, 1997). Die apikale Membran ist reich an Sphingolipiden und der extrazellulären Umgebung zugewandt, die basolaterale Membran besteht unter anderem vermehrt aus Phosphatidylcholin, einem ungesättigten Glycerolipid (Henderson *et al.*, 2004). Die basolaterale Membran polarisierter Zellen unterteilt sich noch einmal in zwei Bereiche. Der laterale Bereich ist für die Adhäsion zwischen benachbarten Zellen zuständig, der basale Bereich kontaktiert das Substratum (Salzer, 2003).

Alle bisher durch die Limp-2 Defizienz in ihrer Expression und Lokalisierung gestörten Proteine - die Uroplakine 3a, 3b und 1b im Urothel, die Myelinproteine P0 und PMP22 im PNS, der Kaliumkanal aus KCNQ1 und KCNE1 und der Rezeptor Megalin in der Stria vascularis - sind normalerweise an der apikalen Membran polarisierter Zellen lokalisiert. Alle eben genannten Proteine bilden am ER Hetero- oder Homodimere und Homotetramere miteinander, was essentiell für das Verlassen des ER und die Sortierung an die apikale Membran ist.

5.6 Vermutete Funktion von Limp-2

Die Sortierung neu-synthetisierter Proteine an die apikale Membran polarisierter Zellen ist ein relativ junges Forschungsfeld. Aus diesem Grund ist über die Mechanismen der Sortierung apikaler Proteine noch nicht sehr viel bekannt. Fast alle

bisher bekannten apikalen Sortierungssignale sind nicht zytoplasmatisch im Gegensatz zu den bekannten basolateralen Sortierungssignalen (Tai *et al.*, 2001). Es wurden einige spezifische Proteinsequenzen entdeckt, die als apikale Sortierungssignale diskutiert werden und vorwiegend C-terminal lokalisiert sind (Chuang und Sung, 1998). Dies ist der Fall bei Megalin in Nierene epithelien (Takeda *et al.*, 2003). Zudem wurden auch apikale Sortierungssignale proximal zu den Transmembrandomänen der sortierten Proteine (Dunbar *et al.*, 2000) ermittelt. Es wurde gezeigt, dass N-Glykane von glykosylierten Proteinen (Urquhart *et al.*, 2005) und die *Glykosylphosphatidylinositol*-Verankerung (GPI) Signale für apikale Sortierung darstellen können (Ikonen und Simons, 1998). Für die Myelinproteine PMP22 und P0 wurde eine Sortierung vom ER zur apikalen Membran über Lipid rafts beschrieben (Erne *et al.*, 2002).

Proteine, die an der apikalen Membran polarisierter Zellen lokalisiert sind, werden in vielen Fällen zur Regulierung ihrer Expression endozytiert und zu frühen und/oder rezyklisierenden Endosomen geliefert (Clageu und Urbe, 2001; Volpicelli *et al.*, 2002). Frühe und rezyklisierende Endosomen werden auch als Sortierungsstation oder als *endocytic recycling compartment* (ERC) beschrieben (Gruenberg, 2001; Maxfield und McGraw, 2004). In ihnen werden die endozytierten Proteine entweder wieder an die apikale Membran rezykliert oder zur Degradierung über späte Endosomen in Lysosomen transportiert (Pagano *et al.*, 2004). Dieser Transportprozess von der apikalen Membran wurde unter anderem für Megalin beschrieben. Megalin bindet Liganden, wird dann endozytiert und zum ERC transportiert, in denen der Ligand von dem Rezeptor getrennt wird und Megalin wieder zur apikalen Membran rezykliert (Christensen und Birn, 2002; Nagai *et al.*, 2003). Die Endozytose von Megalin erfolgt vermutlich über ein Tyrosin-Motiv mit dem AP2-Komplex in Clathrin-bedeckten Vesikeln (Caplan, 2003).

Die in dieser Arbeit beschriebenen Beobachtungen lassen die Vermutung zu, dass Limp-2 vermutlich mit dafür verantwortlich ist, endozytierte Proteine von den Endosomen wieder an die apikale Membran zurückzutransportieren. Durch die Defizienz von Limp-2 kann es möglicherweise zu einem gestörten Rücktransport an die apikale Membran und zu einem Weitertransport über späte Endosomen in Lysosomen kommen (Abb. 65 A).

Die Limp-2 vermittelte Sortierung von Proteinen in frühen Endosomen erfolgt vermutlich über spezifische Aminosäuresequenzen in den Proteinen, die allerdings

auch gewebespezifisch sein müssen, da z. B. eine veränderte Expression von Megalin in den Limp-2 defizienten Nieren nicht festgestellt wurde. Es wird derzeit diskutiert, ob verschiedene Gewebe in einem Organismus, die apikalen und basolateralen Sortierungssignale unterschiedlich erkennen (Tai *et al.*, 2001; Gu *et al.*, 1996; Roush *et al.*, 1998). Diese Vermutung würde die gestörten Expressionen von KCNQ1/KCNE1 und Megalin erklären, die sich vermutlich in der Limp-2 Knock-out Maus nur auf die Stria vascularis beschränken.

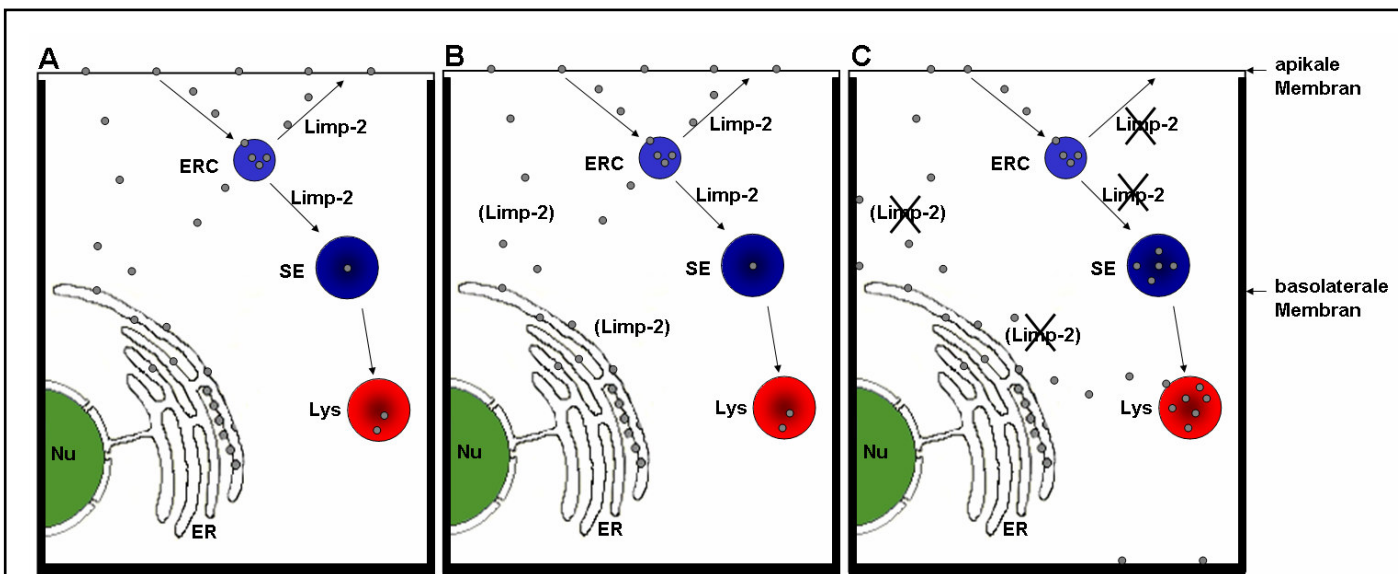


Abb. 65: Vermutete Funktionen von Limp-2 in der Sortierung von Proteinen an der apikalen Membran. **A** - Limp-2 spielt vermutlich eine wichtige Rolle in der Sortierung endozytierter Proteine am ERC. Eventuell werden von der apikalen Membran endozytierte Proteine in den frühen/rezyklisierenden Endosomen von Limp-2 erkannt und zum Teil zur Plasmamembran rezykliert oder über späte Endosomen zu Lysosomen transportiert. **B** - Limp-2 spielt vermutlich außer bei der Sortierung am ERC auch eine Rolle bei der Sortierung vom ER zur apikalen Membran polarisierter Zellen. Partiiell wird auch eine Beteiligung in der Neu-Synthese am ER und Sortierung dieser neu-synthetisierter Proteine mittels Transportvesikeln an die apikale Membran polarisierter Zellen angenommen. **C** - Durch die Defizienz von Limp-2 kommt es in polarisierten Zellen zu einer Fehlsortierung von Proteinen am ER und zu einer Weiterleitung der Proteine vom ERC über späte Endosomen in Lysosomen. Diese Proteine stehen nicht mehr zur Rezyklisierung an die apikale Membran zur Verfügung. Dargestellt ist eine polarisierte Zelle. ERC – endocytic recycling compartment, das frühe und späte Endosomen beinhaltet, SE – späte Endosomen, Lys – Lysosomen, Nu – Nukleus, ER – endoplasmatisches Retikulum.

Es ist denkbar und wahrscheinlich, dass nicht nur Limp-2 für die Sortierung der Proteine in frühen Endosomen verantwortlich ist, sondern ein Komplex aus verschiedenen Proteinen. Wahrscheinlich spielen Adaptor-Komplexe und Rab-Proteine in der Limp-2 abhängigen Sortierung eine wichtige Rolle. Rab-Proteine

regulieren unter anderem Fusionsprozesse von frühen und späten Endosomen und Lysosomen sowie den Transport von Proteinen zu Endosomen und an Plasmamembranen in Clathrin-bedeckten Vesikeln (Barbero *et al.*, 2002). Ein Beispiel für die Wichtigkeit der Rab-Proteine wurde durch eine dominant-negative Form von Rab11a in MDCK-Zellen gezeigt. Dort wurde die Rezyklisierung der Proteine von den frühen Endosomen an die apikale Membran unterbrochen (Prekeris, 2003), was zu einer Erhöhung der Proteine in den frühen/rezyklisierenden Endosomen führte und zu einer Verzögerung der Rezyklisierung (Volpicelli *et al.*, 2002; Fan *et al.*, 2004).

Die Proteine, die durch die Limp-2 Defizienz eine gestörte Expression aufweisen, müssen nach ihrer Neu-Synthese am ER Hetero- oder Homodimere oder –tetramere bilden, um das ER verlassen zu können. Aufgrund dessen könnten die Funktionen von Limp-2 nicht nur in der Sortierung am ERC, sondern auch in der Sortierung neu-synthetisierter Proteine vom ER zur apikalen Membran vermutet werden. Dabei kann sich eine Interaktion oder Bindung von Limp-2 nur auf spezifische Proteine beziehen, da nicht alle Proteine im Urogenitaltrakt, im Innenohr und in den peripheren Nerven von der Limp-2 Defizienz betroffen sind (Abb. 65 B).

Gegen dieses Model (Abb. 65 B) spricht, dass an der apikalen Membran, die durch die Limp-2 Defizienz in ihrer Expression gestörten Proteine, noch teilweise detektiert werden konnten. Diese Proteine konnten das ER nach der Neu-Synthese und Dimerbildung verlassen und wurden erfolgreich an die apikale Membran transportiert. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Limp-2 an den Prozessen der Heterodimer-/Homodimer- und Homotetramer-Bildung teilweise beteiligt ist und durch die Limp-2 Defizienz weniger Proteine an der apikalen Membran lokalisiert sind, die über Limp-2 transportiert werden. Ein Hinweis für die Funktion von Limp-2 in dem Transport vom ER zur apikalen Membran kann eventuell die gestörte Expression der Uroplakine 3a, 3b und 1b geben. Nach dem derzeitig meist anerkanntem Modell von Apodaca *et al.* (2004) werden die Uroplakin-haltigen Plaques während des Füllens der Blase endozytiert und direkt über späte Endosomen zu Lysosomen geliefert. In diesem Prozess wird die Sortierungsstation ERC nicht zur Rezyklisierung benötigt. Da von der Limp-2 Defizienz nur die Expression und die Lokalisierung der Uroplakine 3a, 3b und 1b betroffen sind, wird davon ausgegangen, dass Limp-2 eine wichtige Rolle bei dem Transport dieser Uroplakin Heterodimere vom ER zur apikalen

Membran oder direkt in der Heterodimerbildung am ER spielt. Das Fehlen von Limp-2 am ER und während des Transports durch das TGN könnte zu einer Fehlsortierung mancher Proteine an die basolaterale Membran polarisierter Zellen führen eventuell zu einer Störung der Polarität der Zelle.

Ein weiteres Modell bezüglich der vermuteten Folgen der Limp-2 Defizienz ist in Abbildung 65 C zusammengefasst dargestellt. Nach diesem Model kommt es durch die Defizienz von Limp-2 zu einer gestörten Sortierung von bestimmten Proteinen am ERC in polarisierten Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass die Limp-2 Defizienz zu einer Fehlsortierung von Uroplakin 3a an die basolaterale Membran führen kann und zu einer vermehrten Degradierung neu-synthetisierter Proteine in Lysosomen. Eine erhöhte Expression spät endosomaler Proteine und lysosomaler Proteine konnte im Urothel der Blase und im Innenohr in der Stria vascularis gezeigt werden, was ebenfalls ein Indiz für eine erhöhte Degradierung von Uroplakinen, von KCNQ1 und von Megalin in Lysosomen sein könnte.

5.7 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit analysieren einige Aspekte des Limp-2 Knock-out-Phänotyps genauer und lassen Rückschlüsse auf die *in vivo* Funktionen von Limp-2 und die vermutete Rolle bei der Determinierung bestimmter polarisierter Zelltypen zu. Anhand der in Abbildung 65 dargestellten Modelle soll der Wirkungsmechanismus und -ort von Limp-2 im Transport von ausgewählten apikal sortierten Proteinen näher untersucht werden. Zu diesem Zweck sollen etablierte Standardmodelle von polarisierten Zellen (MDCK oder Caco-2) eingesetzt werden, da primäre polarisierte Zellen aus dem Urothel oder der Stria vascularis der Maus nicht kultivierbar sind.

Der Wirkungsmechanismus von Limp-2 in polarisierten Zellen soll mittels Überexpression oder siRNA und gleichzeitiger Kotransfektion mit KCNQ1/KCNE1 oder verschiedenen Uroplakinen untersucht werden. Der Transport von KCNQ1/KCNE1 oder Uroplakinen an die apikale Membran in An- und Abwesenheit von Limp-2 kann beispielsweise mit einer Oberflächenbiotinylierung und anschließender Immunpräzipitierung überprüft werden. Mittels lysosomaler Inhibitoren, wie Leupeptin und Pepstatin soll in den polarisierten Zellen weiterhin untersucht werden, ob eine so inhibierte lysosomale Degradierung die apikale Sortierung beeinflusst. Gleichzeitig soll in polarisierten Zellen das ERC - der

vermutete Wirkungsort von Limp-2 – durch Internalisierungsexperimente mit Dextran und Transferrin in An- und Abwesenheit von Limp-2 charakterisiert werden.

Um mögliche physiologische Interaktionen von Limp-2 mit KCNQ1/KCNE1, Megalin und Uroplakinen zu identifizieren, sind Co-Immunpräzipitationsexperimente von Limp-2 - nach Überexpression der jeweiligen Proteine - in polarisierten Zellen geplant. Auch kann eine mögliche Interaktion von Limp-2 mit apikal sortierten Proteinen über eine Kolo-kalisierung mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert werden. Sollten sich Interaktionen von Limp-2 mit den beschriebenen Proteinen herausstellen, kann darüber hinaus überprüft werden, ob durch Limp-2 bestimmte Signalsequenzen in den Kaliumkanälen KCNQ1/KCNE1, dem Rezeptor Megalin und den Uroplakinen erkannt werden. Zu diesem Zweck lassen sich Mutanten herstellen, in denen mögliche Signale, z.B. Dileucin-Motive oder Tyrosin-Motive die für eine apikale Sortierung nötig sein könnten, deletiert sind. Diese Konstrukte sollen anschließend mit Limp-2 in polarisierte Zellen transfiziert werden und eine mögliche Änderung der apikalen Sortierung untersucht werden.

Interessanterweise konnte in ersten Vorversuchen gezeigt werden, dass Limp-2, wenn es mit dem Kaliumkanal KCNQ1 in Oozyten aus dem Frosch injiziert wird, die Eigenschaften des Kanals verändert. Weitere Versuche mit Koinjektionen von mutiertem Limp-2, welches durch Deletion der Aminosäuren 31-74 unfähig ist nach Überexpression große Vesikel hervorzurufen (Y. Tanaka, Manuskript in Revision) sind geplant. Dabei kann die Koinjektion von KCNQ1 mit Lamp-1 oder Lamp-2 als negative Kontrolle eingesetzt werden.

Des Weiteren soll die vermutete Interaktion von Limp-2 mit Rab-Proteinen am ERC (z.B. Rab5 und Rab11) in polarisierten Zellen und nicht-polarisierten Zellen überprüft werden. Dies kann mittels der indirekten Immunfluoreszenz erfolgen oder über weitere Immunpräzipitations-Versuche mit Limp-2.

Bisher wurde gezeigt, dass sich die Defizienz von Limp-2 auf die apikale Sortierung mehrschichtiger Epithelien - Stria vascularis und Urothel – auswirkt, wobei periphere Nerven nicht zu mehrschichtigen Epithelien gehören. Weitere Gewebe der Limp-2 Knock-out-Maus müssen untersucht werden, die von mehrschichtigem Epithel ausgekleidet sind. Dazu gehören die z.B. der *Canalis analis* (das Endstück des Rektums), das Epithel der *Vagina*, das Epithel des *Ösophagus* und die *Cornea* des Auges. Die Epidermis der Limp-2 defizienten Tiere wird zur Zeit aufgrund des vermuteten Haarausfalls auf Veränderungen untersucht.

6. Zusammenfassung

Limp-2 ist ein Typ I Transmembranprotein, das größtenteils in späten Endosomen und Lysosomen lokalisiert und ubiquitär exprimiert ist. Limp-2 defiziente Mäuse entwickeln Anomalien in den ableitenden Harnwegen, einen progressiven Hörschaden und periphere Neuropathien. Die Mäuse sind fertil und lebensfähig, aber zeigen im Vergleich zu Kontrollmäusen eine erhöhte Mortalität.

6.1 Ableitende Harnwege

Limp-2 defiziente Mäuse leiden an einer Hyperplasie des Ureterurothels nahe des Nierenbeckens, wodurch eine Ureterstenose entsteht, die vermutlich durch den Rückstau von Urin in die Nieren, uni- und bilaterale Hydronephrosen hervorruft. Die Defizienz von Limp-2 führt zu einer gestörten Expression und Lokalisierung der Uroplakine 3a, 3b und 1b, die in der Kontrollmaus das gesamte Urothel in Ureter und Blase in Form von apikal lokalisierten Plaques auskleiden und eine Barriere zwischen dem Urin und dem darunter liegenden Gewebe bilden. Aufgrund der Expressions- und Lokalisierungsunterschiede der Uroplakine 3a, 3b und 2 in dem Urothel der Limp-2 Knock-out-Maus kommt es zu Entwicklungsstörungen in den Deckzellen der Blase und zur Entwicklung von sehr großen Vakuolen, was auf einen Defekt in intrazellularen Fusionsprozessen schließen lässt.

6.2 Taubheit

Limp-2 defiziente Mäuse leiden an einem progressiven Hörschaden, der mit der Degenerierung der Stria vascularis beginnt. Das durch die Kompartimentierung der Stria vascularis aufgebaute endocochleare Potential kann vermutlich durch den teilweisen Verlust des apikal sortierten KCNQ1/KCNE1-Kaliumkanal in den Marginalzellen nicht aufrecht erhalten werden. Der Verlust des endocochlearen Potentials führt in der postnatalen Entwicklung der Limp-2 defizienten Mäuse zur Atrophierung der Stria vascularis, Degenerierung der äußeren und inneren Haarzellen im Corti-Organ und letztlich zum Verlust von Neuronen im peripheren Hörnerv.

6.3 Periphere Neuropathie

Die Entwicklung einer peripheren Neuropathie ist ein weiteres Charakteristikum Limp-2 defizienter Mäuse. Die Schwann-Zellen um die Axone der Limp-2 Knock-out-Mäuse bilden durch den stetigen Wechsel von De- und Remyelinisierung Zwiebelring-artige Strukturen, sogenannte '*onion bulbs*'. Aufgrund der Expressions- und/oder Lokalisierungsstörungen der Myelinproteine PMP22 und P0 in den Schwann-Zellen der Limp-2 Knock-out-Mäuse kommt es zu einer Destabilisierung der Myelinhülle.

6.4 Zusammenhänge der Anomalien mit der Limp-2 Defizienz

Limp-2 ist größtenteils in Lysosomen, aber auch in späten Endosomen und der Plasmamembran lokalisiert. Die in dieser Arbeit beschriebenen experimentellen Ansätze lassen vermuten, dass die Defizienz von Limp-2

- zu einer Fehlsortierung bestimmter Proteine führt, die normalerweise an der apikalen Membran von polarisierten Zellen lokalisiert sind.
- zu einer verstärkten lysosomalen Degradierung insbesondere apikal sortierter Proteine führt, die wahrscheinlich mit der Fehlsortierung dieser Proteine zusammenhängt.
- zu einer gestörten Heterodimer-Bildung bestimmter Proteine führen kann, die dadurch das endoplasmatische Retikulum nicht verlassen können und degradiert werden.
- zu einer Störung homotyper Fusionsprozesse in den Deckzellen des Urothels führen kann.

7. Literaturverzeichnis

Acton, S.L. *et al.*, 1994, Expression Cloning of SR-BI, a CD36-related Class B Scavenger Receptor. *J. Biol. Chem.* **269**, 21003-21009.

Adachi, W., Okubo, K. und Kinoshita, S., 2002, Human uroplakin 1b in ocular surface epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**, 2900-2905.

Adra, C.N. *et al.*, 1996, LAPTM5: a novel lysosomal-associated multispinning membrane protein preferentially expressed in hematopoietic cells. *Genomics* **35**, 328-337.

Aguilar, R.C. *et al.*, 2001, Signal-binding specificity of the mu4 subunit of the adaptor protein complex AP-4. *J. Biol. Chem.* **276**, 13145-13152.

Akasaki, K. *et al.*, 1992, Isolation and characterization of a novel membrane glycoprotein of 85,000 molecular weight from rat liver lysosomes. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **40**, 170-173.

Andrejewski, N. *et al.*, 1999, Normal lysosomal morphology and function in Lamp-1-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **274**, 12692-12701.

Apodaca, G., 2004, The Uroepithelium: Not Just a Passive Barrier. *Traffic* **5**, 117-128.

Asch, A.S. *et al.*, 1993, Analysis of CD36 binding domains ligand specificity controlled by dephosphorylation of an ecto domain. *Science* **262**, 1436-1440.

Auer-Grumbach, M. *et al.*, 2003, Autosomal dominant inherited neuropathies with prominent sensory loss and mutilations: a review. *Arch. Neurol.* **60**, 329-334.

Baillie, A.G.S., Coburn, C.T. und Abumrad, N.A., 1996, Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36-Homologe. *J. Membr. Biol.* **153**, 75-81.

Barbero, P. *et al.*, 2002, Visualization of Rab9-mediated vesicle transport from endosomes to the trans-Golgi in living cells. *J. Cell Biol.* **156**, 511-518.

Ben-Yosef, T. *et al.*, 2003, Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration. *Hum. Mol. Gen.* **12**, 2049-2061.

Bennett, C.L. *et al.*, 2004, SIMPLE mutation in demyelinating neuropathy and distribution in sciatic nerve. *Ann. Neurol.* **55**, 13-20.

Bjartmar, C., Yin, X. und Trapp, B.D, Axonal pathology in myelin disorders. *J. Neurocyt.* **28**, 383-395.

Bleistein, J. *et al.*, 1980, The phospholipids of liver lysosomes from untreated rats. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **266**, 21327-21330.

Blum, H., Beier, H. und Gross, H.J., 1987, Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Eur. J. Biochem.* **46**, 84-88.

Bonifacino, J.S. und Lippincot-Schwartz, J., 1991, Degradation of proteins within the endoplasmatic reticulum. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**, 592-600.

Bonifacino, J.S. und Dell'Angelica, E.C., 1999, Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J. Cell Biol.* **145**, 923-926.

Born, M. *et al.*, 2003, The maintenance of the permeability barrier of bladder facet cells requires a continuous fusion of discoid vesicles with the apical plasma membrane. *Eur. J. Cell Biol.* **82**, 343-350.

Bosse, F. *et al.*, 2003, Proteolipid plasmolipin: lokalization in polarized cells, regulated expression und lipid raft association in CNS und PNS myelin. *J. Neurochem.* **86**, 508-518.

Brancolini, C. *et al.*, 1999, Rho-dependent regulation of cell spreading by the tetraspan membrane protein Gas3/PMP22. *Mol. Biol. Cell* **10**, 2441-2459.

Bright, N.A. *et al.*, 1997, Dense core lysosomes can fuse with late endosomes and are re-formed from the resulting hybrid organelles. *J. Cell Sci.* **70**, 2027-2040.

Brown, M.S. und Goldstein, J.L., 1983, Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 223-261.

Brown, A.M. und Lemke, G., 1997, Multiple Regulatory Elements Control Transcription of the Peripheral Myelin Protein Zero Gene. *J. Biol. Chem.* **272**, 28939-28947.

Brown, D.A. und London, E., 2000, Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* **275**, 17221-17224.

Brunner, R. und Nöldeke, I., 2001, Das Ohr. *Thieme Verlag*, **2te Auflage**, 45-54.

Brunner, C. *et al.*, 1989, Differential ultrastructural localization of myelin basic protein, myelin/oligodendroglial glycoprotein, and 2'3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the CNS of adult rats. *J. Neurochem.* **53**, 296-304

Buczynski, G. *et al.*, 1997, Evidence for a Recycling Role for Rab7 in Regulating a Late Step in Endocytosis and in Retention of Lysosomal Enzymes in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell* **8**, 1343-1360.

Calvo, D. und Vega, M.A., 1993, Identification, Primary Structure, and Distribution of CLA-1, a Novel Member of the CD36/LIMPII Gene family. *J. Biol. Chem.* **268**, 18929-18935.

Cantalupo, G. *et al.*, 2001, Rab-interacting lysosomal protein (RILP): the Rab7effector required for transport to lysosomes. *EMBO J.* **20**, 683-693.

Caplan, M.J. *et al.*, 1997, Membrane polarity in epithelial cells: protein sorting and establishment of polarized domains. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **272**, 425-429.

Casimiro, M.C. *et al.*, 2000, Targeted disruption of the Kcnq1 gene produces a mouse model of Jervell and Lange-Nielsen Syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **5**, 2526–2531.

Chandross, K.J. *et al.*, 1999, Identification and characterization of early glial progenitors using a transgenic selection strategy. *J. Neurosci.* **19**, 759-774.

Chang, A. *et al.*, 1996, Permeability properties of the mammalian bladder apical membrane. *Am. J. Physiol.* **267**, C1483-C1492.

Chapon, F. *et al.*, 1999, Axonal neuropathy of Charcot-Marie-Tooth disease associated with a mutation in the myelin protein zero gene. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **66**, 779-782.

Chen, J.W. *et al.*, 1985, Identification of two lysosomal membrane glycoproteins. *J. Cell Biol.* **101**, 85-95.

Chen, Y. *et al.*, 2003, Rab27b is associated with fusiform vesicles and may be involved in targeting uroplakins to urothelial apical membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 14012-14017.

Christensen, E.I. *et al.*, 1992, Renal tubule gp330 is a calcium binding receptor for endocytic uptake of protein. *J. Histochem. Cytochem.* **40**, 1481-1490.

Christensen, E.I. *et al.*, 1998, Membrane receptors for endocytosis in renal proximal tubule. *Int. Rev. Cytol.* **180**, 237-284.

Christensen, E.I. und Verroust, P.J., 2002, Megalin und Cubilin, role in proximal tubule function and during development. *Pediatr. Nephrol.* **17**, 993-999.

Chuang J.Z. und Sung C.H., 1998, The cytoplasmic tail of rhodopsin acts as a novel apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J. Cell Biol.* **7**, 1245-1256.

Clague, M.J. und Urbe, S., 2001, The interface of receptor trafficking and signalling. *J. Cell Sci.* **114**, 3075-3081.

Claussen, M. *et al.*, 1995, Regulation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-6 and mannose 6-phosphate/IGF-II receptor expression in IGF-IL-overexpressing NIH 3T3 cells. *Mol. Endocrinol.* **9**, 902-912.

Craig A.M. und Banker G., 1994, Neuronal polarity. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**, 267-310.

Crombie, R. und Silverstein, R., 1998, Lysosomal Integral Membrane Protein II Binds Thrombospondin-1. *J. Biol. Chem.* **273**, 4855-4863.

Cuervo, A.M. und Dice, J.F., 2000, Unique properties of Lamp2a compared to other Lamp2 isoforms. *J. Cell Sci.* **113**, 4441-4450.

Curhan, G.C. *et al.*, 2000, Urinary Tract Obstruction. *The Kidney. G.M. Brenner, editor. W.B. Saunders, Philadelphia* 1820-1843.

Danon, M.J., *et al.*, 1981, Lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase. *Neurology* **31**, 51-57.

de Duve, C., 1983, Lysosomes revisited. *Eur. J. Biochem.* **137**, 391-397.

Delbrück, R. *et al.*, 1994, Proteolytic processing of cathepsin D in prelysosomal organelles. *Eur. J. Cell Biol.* **64**, 7-14.

Dell'Angelica, E.C. und Payne, G.S., 2001, Intracellular cycling of lysosomal enzyme receptors: cytoplasmic tails' tales. *Cell* **106**, 395-398.

- Dell'Angelica, E.C. *et al.*, 1999, Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak Syndrome due to mutations in the β 3A subunit of the AP-3 adaptor. *Mol. Cell* **3**, 11-21.
- Deng, F.M. *et al.*, 2002, Uroplakin IIIb, a urothelial differentiation marker, dimerizes with Uroplakin Ib as an early step of urothelial plaque assembly. *J. Cell Biol.* **4**, 685-694.
- De Vries, H. *et al.*, 1998, An apical-type trafficking pathway is present in cultured oligodendrocytes but the sphingolipid-enriched myelin membrane is the target of a basolateral-type pathway. *Mol. Biol. Cell* **9**, 599-609.
- Dixon, M.J. *et al.*, 2004, Mutation of the Na-K-Cl co-transporter gene Slc12a2 results in deafness in mice. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 1579-1584.
- Doray, B. *et al.*, 2002, Autoinhibition of the ligand-binding site of GGA1/3 VHS domains by an internal acidic cluster-dileucine motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 8072-8077.
- Drover, V.A. *et al.*, 2005, CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood. *J. Clin. Inv.* **115**, 1290-1297.
- Dunbar L.A., Aronson P. und Caplan M.J., 2000, A transmembrane segment determines the steady-state localization of an ion-transporting adenosine triphosphatase. *J. Cell Biol.* **148**, 769-778.
- Duncan, M.J. *et al.*, 2004, Bacterial Penetration of Bladder Epithelium through Lipid Rafts. *J. Biol. Chem.* **279**, 18944-18951.
- D'Urso, D., Ehrhardt, P. und Muller, H.W., 1999, Peripheral myelin protein 22 and protein zero: a novel association in peripheral nervous system myelin. *J. Neurosci.* **19**, 3396-3403.

Ekici, A.B. *et al.*, 2002, Tracing Myelin Protein Zero (P0) in vivo by construction of P0-GFP fusion proteins. *Biomed Cell Biol.* **3**, 1471-2121.

Endemann, G. *et al.*, 1993, CD36 is a receptor for oxidized low density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* **268**, 11811-11816.

Erne, B. *et al.*, 2002, Rafts in adult peripheral nerve myelin contain major structural myelin proteins and myelin and lymphocyte protein (MAL) and CD59 as specific markers. *J. Neurochem.* **82**, 550-562.

Eskelinen, E.L. *et al.*, 2002, Role of Lamp-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol. Biol. Cell* **13**, 3355-3368.

Eskelinen, E.L. *et al.*, 2004, Disturbed Cholesterol Traffic but Normal Proteolytic Function in LAMP-1/LAMP-2 Double-deficient Fibroblasts. *Mol. Biol. Cell* **15**, 3132-3145.

Eskelinen, E.L., Tanaka, Y. and Saftig, P., 2003, At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *TRENDS in Cell Biol.* **13-3**, 137-145.

Escola, J.M. *et al.*, 1998, Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **273**, 20121-20127.

Fan, G.H. *et al.*, 2004, Rab11-family interacting protein 2 and myosin Vb are required for CXCR2 recycling and receptor-mediated chemotaxis. *Mol. Biol. Cell.* **15**, 2456-2469.

Farsund, T., 1975, Cell kinetics of mouse urinary bladder epithelium. Circadian and age variations in cell proliferation and nuclear DNA content. *Virchows Arch. B. Cell Pathol.* **18**, 35-49.

Febbraio, M. *et al.*, 1999, A Null Mutation in Murine CD36 Reveals an Important Role in Fatty Acid and Lipoprotein Metabolism. *J. Biol. Chem.* **274**, 19055-19062.

Febbraio, M., Hajjar, D.P. und Silverstein, R.L., 2001, CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J. Clin. Inv.* **108**, 785-791.

Fortun, J. *et al.*, 2003, Emerging Role for Autophagy in the Removal of Aggresomes in Schwann Cells. *J. Neurosci.* **23**, 10672-10680.

Fortun, J. *et al.*, 2005, Impaired proteasome activity and accumulation of ubiquitinated substrates in a hereditary neuropathy model. *J. Neurochem.* **92**, 1531-1541.

Foster, D.B. *et al.*, 2004, Modes of Caldesmon Binding to Actin. *J. Biol. Chem.* **279**, 53387-53394.

Fritsch, H. und Kühnel, W., 2003, Taschenatlas der Anatomie, Bd.2 : Innere Organe. *Thieme-Verlag*.

Fujita, H. *et al.*, 1991, Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding 85 kDa sialoglycoprotein in rat lysosomal membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **178**, 444-452.

Fujita, H. *et al.*, 1992, Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding the 85 kDa human lysosomal sialoglycoprotein (hLGP85) in human metastatic pancreas islet tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **184**, 604-611.

Fukuda, M., 1991, Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J. Biol. Chem.* **266**, 21327-21330.

Gamp, A.-C. *et al.*, 2003, LIMP-2/LGP85 deficiency causes ureteric pelvic junction obstruction, deafness and peripheral neuropathy in mice. *Hum. Mol. Gen.* **12-6**, 631-646.

Garbay, B. *et al.*, 2000, Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog. Neurobiol.* **61**, 267-304.

Gaullier, J.-M. *et al.*, 1998, FYVE fingers bind PtdIns(3)P. *Nature* **394**, 432-433.

Giese, K.P. *et al.*, 1992, Mouse P0 gene disruption leads to hypomyelination, abnormal expression of recognition molecules, and degeneration of myelin and axons. *Cell* **71**, 565-576.

Gieselmann, V. *et al.*, 1983, Biosynthesis and transport of cathepsin D in cultured human fibroblasts. *J. Cell Biol.* **97**, 1-5.

Gough, N.R. und Fambrough, D.M., 1997, Different steady state subcellular distributions of the three splice variants of lysosome-associated membrane protein Lamp-2 are determined largely by the COOH-terminal amino acid residue. *J. Cell Biol.* **137**, 1161-1169.

Griffiths, G. und Simons, K. 1986, The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* **234**, 438-443.

Gruenberg, J., 2001, The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 721-730.

Gruenberg, J. und Stenmark, H., 2004, The biogenesis of multivesicular endosomes. *Mol. Cell Biol.* **5**, 317-323

Gu, H.H. *et al.*, 1996, Cell-specific sorting of biogenic amine transporters expressed in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 18100-18106.

Gubitosi-Klug, R.A. *et al.*, 2005, The human Kv1.1 channel is palmitoylated, modulating voltage sensing: Identification of a palmitoylation consensus sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 5964-5968.

Gusev, N.B., 2001, Some Properties of Caldesmon and Calponin and the Participation of These Proteins in Regulation of Smooth Muscle Contraction and Cytoskeleton Formation. *Biochem. (Moscow)* **66**, 1112-1121.

Gwènaëlle, S.G. *et al.*, 2003, Auditory amplification: outer hair cells pres the issue. *TRENDS Neurosci.* **26**, 115-117.

Hammad, S.M. *et al.*, 1999, Cubilin, the endocytic receptor for intrinsic factor-vitamin B(12) complex, mediates high-density lipoprotein holoparticle endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**, 10158-10163.

Henderson, R.M. *et al.*, 2004, Lipid Rafts: Feeling is Believing. *News Physiol. Sci.* **19**, 39-43.

Hicks, R., 1966, The formation of the Golgi complex in transitional epithelium. *J. Cell Biol.* **30**, 623-644.

Hirst, J. *et al.*, 1999, Characterization of a fourth adaptor-related protein complex. *Mol. Biol. Cell.* **10**, 2787-2802.

Holtzmann, E., 1989, Lysosomes. *New York, London: Plenum Press.*

Höning, S. *et al.*, 1998, A di-leucine motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosine mediates seledtive binding of AP-3. *EMBO* **17**, 1304-1314.

Hu, P. *et al.*, 2000, Ablation of Uroplakin III Gene Results in Small Urothelial Plaques, Urothelial Leakage, and Vesikoureteral Reflux. *J. Cell Biol.* **151**, 961-971.

Hunziker, W. *et al.*, 1996, Trafficking of lysosomal membrane proteins in polarized kidney cells. *Nephrologie* **17**, 347-350.

Hunziker, W. und Geuze, H.J., 1996, Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *BioEssays* **18**, 379-389.

Ikonen, E. und Simons, K., 1998, Protein and lipid sorting from the trans-Golgi network to the plasma membrane in polarized cells. *Cell. Dev. Biol.* **9**, 503-509.

Jordens, I. *et al.*, 2001, The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynein motors. *Curr. Biol.* **11**, 1680-1685.

Kacher, B. *et al.*, 1999, Three-dimensional analysis of the 16 nm urothelial plaque particle: luminal surface exposure, preferential head-to-head interaction, and hinge formation. *J. Mol. Biol.* **285**, 595-608.

Kahle, W. und Frotscher, M., 2002, Taschenatlas der Anatomie, Band 3: Nervensystem und Sinnesorgane. *Thieme Verlag 8te Auflage*, 36-41.

Karakesisoglou, I. *et al.*, 1999, Identification of a Suppressor of the Dictyostelium Profilin-minus Phenotype as a CD36/Limp-II Homologue. *J. Cell Biol.* **145**, 167-181.

Keilhoff, G. *et al.*, 1999, In vivo predegeneration of peripheral nerves: an effective technique to obtain activated Schwann cells for nerve conduits. *J. Neurosci. Methods* **89**, 17-24.

Keller, M.P. und Chance, P.F., 1999, Inherited peripheral Neuropathy. *Semin. Neurol.* **19**, 353-362.

Kessels, M.M. und Qualmann, B., 2004, The syndapin protein family: linking membrane trafficking with the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **117**, 3077-3086.

Kikuchi, T. *et al.*, 1995, Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat. Embryol.* **191**, 101-118.

Kirchhausen, T., Bonifacino, J.S. und Riezmann, H., 1997, Linking cargo to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 488-495.

Kitajiri, S.I. *et al.*, 2004a, Compartmentalization established by claudin-11-based tight junctions in stria vascularis is required for hearing through generation of endocochlear potential. *J. Cell Sci.* **117**, 5087-5096.

Kitajiri, S.I. *et al.*, 2004b, Expression patterns of claudins, tight junction adhesion molecules, in the inner ear. *Hear. Res.* **187**, 25-34.

Klionsky, D.J. und Emr, S.D., 2000, Autophagy as a Regulated Pathway of Cellular Degradation. *Science's Compass* **290**, 1717-1721.

Klumpermann, J. *et al.*, 1993, Differences in the endosomal distributions of the two mannose 6-phosphate receptors. *J. Cell Biol.* **121**, 997-1010.

Knipper, M. *et al.*, 2000, Thyroid hormone deficiency before the onset of hearing causes irreversible damage to peripheral and central auditory systems. *J. Neurophysiol.* **83**, 3101-3112.

Knust E. und Bossinger O., 2002, Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells. *Science* **298**, 1955-1959.

Kochanski A., 2004, Mutations in the Myelin Protein Zero result in a spectrum of Charcot-Marie-Tooth phenotypes. *Acta Myol.* **23**, 6-9.

Kong, X.T. *et al.*, 2004, Roles of uroplakins in plaque formation, umbrella cell enlargement, and urinary tract diseases. *J. Cell Biol.* **167**, 1195-1204.

Kornfeld, S. und Mellmann, I., 1989, The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**, 483-525.

Koss, L.G. *et al.*, 1969, Further cytologic and histologic studies of bladder lesions in workers exposed to para-aminodiphenyl: progress report. *J. Natl. Cancer Inst.* **43**, 233-243.

Kounnas, M.Z. *et al.*, 1994, Immunological localization of glycoprotein 330, low density lipoprotein receptor related protein and 39 kDa receptor associated protein in embryonic mouse tissues. *In Vivo* **8**, 343-351.

Krasnikova, T.L., 1976, Some features of the medium surrounding the mechano- and electroreceptors of the acousticolateral system of the ray *Raja clavata*. *Neurosci. Behav. Physiol.* **7**, 44-48.

Kundra, R. und Kornfeld, S., 1999, Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. *J. Biol. Chem.* **274**, 31039-31046.

Kuronita, T. *et al.*, 2002, A role for the lysosomal membrane protein LGP85 in the biogenesis and maintenance of endosomal and lysosomal morphology. *J. Cell. Sci.* **115**, 4117-4131.

Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Le Borgne, R. *et al.*, 1998, The mammalian AP-3 adaptor-like complex mediates the intracellular transport of lysosomal membrane glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **273**, 29451-29461.

Le Gall, A.H. *et al.*, 1995, Epithelial cell polarity: new perspectives. *Semin. Nephrol.* **15**, 272-284.

Le Roy, C. und Wrana, J.L., 2005, Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 112-126

Lesage, F. *et al.*, 1993, Are *Xenopus* oocytes unique in displaying functional Isk channel heterologous expression? *Receptors Channels* **1**, 143-152.

Lewis, S.A. und de Moura, J.L., 1982, Incorporation of cytoplasmic vesicles into apical membrane of mammalian urinary bladder epithelium. *Nature* **297**, 685-688.

Liang, F.X. *et al.*, 2001, Organization of uroplakin subunits: transmembrane topology, pair formation and plaque composition. *Biochem. J.* **355**, 13-18.

Lin, J.H. *et al.*, 1994, Precursor sequence, processing, and urothelium-specific expression of a major 15 kDa protein subunit of asymmetric unit membrane. *J. Biol. Chem.* **169**, 1775-1784.

Lloyd, J.B. and Forster, S., 1986, The lysosomal membrane. *TRENDS Biochem. Science* **11**, 365-368.

Lüllmann-Rauch, R., 2003, Histologie Verstehen – Lernen – Nachschlagen. *Thieme-Verlag, 1te Auflage.*

Luzio, J.P. *et al.*, 2000, Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J. Cell Sci.* **113**, 1515-1524.

Luzio, J.P. *et al.*, 2003, Membrane dynamics and the biogenesis of lysosomes (Review). *Mol. Membrane Biology* **20**, 141-154.

Maier, M. *et al.*, 2003, Distinct elements of the peripheral myelin protein 22 (PMP22) promotor regulate expression in Schwann cells and sensory neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* **24**, 803-817.

Marcus, D.C. *et al.*, 2002, KCNJ10 (Kir4.1) potassium channel knockout abolishes endocochlear potential. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **282**, 403–407

Marsh, M. *et al.*, 1987, Rapid analytical and preparative isolation of functional endosomes by free flow electrophoresis. *J. Cell. Biol.* **104**, 875-886.

Master, V.A. *et al.*, 2003, Urothelium facilitates the recruitment and trans-differentiation of fibroblasts into smooth-muscle in acellular matrix. *J. Urol.* **170**, 1628-1632.

Maxfield, F.R. und McGraw, T.E., 2004, Endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**, 121-132.

Mc Gookey, D.J. *et al.*, 1983, Filipin-cholesterol complexes form in uncoated vesicle membrane derived from coated vesicles during receptor-mediated endocytosis of low density lipoprotein. *J. Cell Biol.* **96**, 1273-1278.

Meikle, P.J., Fietz M.J., Hopwood J.J., 2004, Diagnosis of lysosomal storage disorders: current techniques and future directions. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **4**, 677-91.

Metzelaar, M.J. *et al.*, 1991, CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 3239-3245.

Min, G. *et al.*, 2003, Structural basis of urothelial permeability barrier function as revealed by Cryo-EM studies of the 16 nm Uroplakin particle. *J. Cell Sci.* **116**, 4087-4094.

Minowa, O. *et al.*, 1999, Altered Cochlear Fibrocytes in a Mouse Model of DFN3 Nonsyndromic Deafness. *Science* **185**, 1408-1410.

Minsky, B.D. und Chlapowski, F.J., 1978, Morphometric analysis of the translocation of luminal membrane between cytoplasm and cell surface of transitional epithelial cells during the expansion-contraction cycles of mammalian urinary bladder. *J. Cell Biol.* **77**, 685-697.

Morell, P. und Quarles, R.H., 1999, Myelin formation, structure and biochemistry. *Basic neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects* 6te Auflage, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.

Moriwaki, Y. *et al.*, 2001, Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin and its cell wall complex induce a novel lysosomal membrane protein, SIMPLE, that bridges the missing link between lipopolysaccharide and p53-inducible gene, LITAF(PIG7), and estrogen-inducible gene, EET-1. *J. Biol. Chem.* **276**, 23065-23076.

Mukherjee, S. und Maxfield, F.R., 2000, Role of membrane organization and membrane domains in endocytic lipid trafficking. *Traffic* **1**, 203-211.

Muller, H.W., Suter, U. und Van Broeckhoven, C., 1997, Advances in Charcot-Marie-Tooth disease research: cellular function of CMT-related proteins, transgenic animal models, and pathomechanisms. *Neurobiol. Dis.* **4**, 215-220.

Mullins, B.M. and Bonifacino, J.S., 2001, The molecular machinery for lysosome biogenesis. *BioEssays* **23**, 333-343.

Murphy, C.R., 2000, Understanding the apical surface markers of uterine receptivity. *Hum. Repr.* **15**, 2451-2454

Nabi, I.R., 1999, The polarization of the motile cell. *J. Cell Sci.* **112**, 1803-1811.

Naef, R. und Suter, U., 1999, Impaired Intracellular Trafficking Is a Common Disease Mechanism of PMP22 Point Mutations in Peripheral Neuropathies. *Neurobiol. Disease* **6**, 1-14.

Nagai, M. *et al.*, 2003, The adaptor protein ARH escorts megalin to and through endosomes. *Mol. Biol. Cell* **14**, 4984-4996.

Negrete, H.O. *et al.*, 1996, Permeability properties of the intact mammalian bladder epithelium. *Am. J. Physiol.* **271**, F86-F94.

Neiss, W.F., 1984, A coat of glycoconjugates on the inner surface of the lysosomal membrane in the rat kidney. *Histochemistry* **80**, 603-608.

Nicolas, M.T. *et al.*, 2001, KCNQ1/KCNE1 potassium channels in mammalian vestibular dark cells. *Hear. Res.* **153**, 132-145.

Nishino, I. *et al.*, 2000, Primary Lamp-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon Disease). *Nature* **406**, 906-910.

Notterpek, L., Shooter, E.M. und Snipes, G.J., 1997, Upregulation of the Endosomal-Lysosomal Pathway in the Trembler-J Neuropathy. *J. Neurosci.* **17**, 4190-4200.

Ogada, S. und Fukuda, M., 1994, Lysosomal targeting of Limp II membrane glycoprotein requires a novel Leu-Ile motif at a particular position in its cytoplasmic tail. *J. Biol. Chem.* **169**, 5210-5217.

Pagano, A. *et al.*, 2004, In Vitro Formation of Recycling Vesicles from Endosomes Requires Adaptor Protein-1/Clathrin and Is Regulated by Rab4 and the Connector Rabaptin-5. *Mol. Biol. Cell* **15**, 4990-5000.

Pareek, S. *et al.*, 1993, Detection und processing of peripheral myelin protein PMP22 in cultured Schwann cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 10372-10379.

Pareek, S. *et al.*, 1997, Neurons Promote the Translocation of Peripheral Myelin Protein 22 into Myelin. *J. Neurosci.* **17**, 7754–7762.

Parries, G. *et al.*, 1995, The human urinary epidermal growth factor (EGF) precursor. Isolation of a biologically active 160-kilodalton heparin-binding pro-EGF with a truncated carboxyl terminus. *J. Biol. Chem.* **270**, 27954-27960.

Pastwa, E. und Błasiak, J., 2003, Non-homologues DNA end joining. *Acta Biochim. Polon.* **50**, 891-908.

Patel, P.I. und Lupski, J.R., 1994, Charcot-Marie-Tooth disease: a new paradigm for the mechanism of inherited disease. *Trends Genet.* **10**, 128-133.

Peden, A.A. *et al.*, 2004, Localization of the AP-3 adaptor complex defines a novel endosomal exit site for lysosomal membrane proteins. *J. Cell Biol.* **164**, 1065-1076.

Peters, C. und von Figura, K., 1994, Biogenesis of lysosomal membranes. *FEBS Lett.* **346**, 146-150.

Platzer, W., 2003, Taschenatlas der Anatomie, Bd.1 : Bewegungsapparat. *Thieme-Verlag*.

Podratz, J.L., Rodriguez, E.H. und Windebank, A.J., 2004, Antioxidants are necessary for myelination of dorsal root ganglion neurons, in vitro. *Glia* **45**, 54-58.

Pohlmann, R., Boecker, M.W. und von Figura, K., 1995, The two mannose 6-phosphate receptors transport distinct complements of lysosomal proteins. *J. Biol. Chem.* **270**, 27311-27318.

Prekeris, R., 2003, Rabs, Rips, FIPs, and Endocytic Membrane Traffic. *Sci. World J.* **3**, 870-880.

Press, B. *et al.*, 1998, Mutant Rab7 causes the accumulation of cathepsin D and cation-independent mannose 6-phosphate receptor in an early endocytic compartment. *J. Cell. Biol.* **140**, 1075-1089.

Pryor, P.R. *et al.*, 2000, The role of intra-organelle Ca^{2+} in late endosome-lysosome heterotypic fusion and in the reformation of lysosomes from hybrid organelles. *J. Cell Biol.* **149**, 1053-1062.

Pussinen, P.J. *et al.*, 2000, The human breast carcinoma cell line HBL-100 acquires exogenous cholesterol from high-density lipoproteins via CLA-1 (CD36 and LIMPII analogous 1)-mediated selective cholesterol ester uptake. *Biochem. J.* **349**, 559-566.

Qian, Z.M. *et al.*, 2002, Targeted Drug Delivery via the Transferrin Receptor-Mediated Endocytosis Pathway. *Pharm. Rev.* **54**, 561-587.

Rebel, J.M. *et al.*, 2004, Modulation of intra-epithelial expansion of human T24 bladder-carcinoma cells in murine urothelium by growth factors and extracellular-matrix components. *Int. J. Cancer* **60**, 707-711.

Redowics, M.J., 2002, Myosins and pathology: genetics and biology. *Acta Biochim. Polon.* **49**, 789-804.

Ren, Y. *et al.*, 1995, CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J. Exp. Med.* **181**, 1857-1862.

Renlund, M. *et al.*, 1986, Defective sialic acid egress from isolated fibroblast lysosomes of patients with Salla disease. *Science* **232**, 759-762.

Ressot, C. *et al.*, 1998, Connexin32 Mutations Associated with X-Linked Charcot-Marie-Tooth Disease Show Two Distinct Behaviors : Loss of Function and Altered Gating Properties. *J. Neurosci.* **18**, 4063-4075.

Riedel, I. *et al.*, 2005, Urothelial umbrella cells of human ureter are heterogenous with respect to their uroplakin composition: different degrees of urothelial maturity in ureter and bladder? *Eur. J. Cell Biol.* **84**, 393-405.

Rigotti, A., Miettinen, H.E. und Krieger, M., 2003, The Role of the High-Density Lipoprotein Receptor SR-BI in the Lipid Metabolism of Endocrine and Other Tissues. *Endocrine Rev.* **24**, 357-387.

Rivas, A. und Francis, H.W., 2005, Inner Ear Abnormalities in a KCNQ1 (Kvlqt1) Knockout Mouse: A Model of Jervell and Lange-Nielsen Syndrome. *Oto. Neurotol.* **26**, 415-424.

Robinson, M.S. und Bonifacino, J.S., 2001, Adaptor-related proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 444-453.

Rome, L.H. *et al.*, 1983, Utilization of exogenously added acetyl coenzyme A by intact isolated lysosomes. *J. Bio. Chem.* **2258**, 3006-3011.

Roth, W. *et al.*, 2000, Cathepsin L deficiency as molecular defect of *furless*: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *FASEB J.* **14**, 2075-2086.

Rous, B.A. *et al.*, 2002, Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes. *Mol. Biol. Cell* **13**, 1071-1082.

Rous, K.J. *et al.*, 2005, Modulation of Epithelial Morphology, Monolayer Permeability, and Cell Migration by Growth Arrest Specific 3/Peripheral Myelin Protein 22. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1142-1151.

Roush, D.L. *et al.*, 1998, Tyrosine-based membrane protein sorting signals are differentially interpreted by polarized Madin-Darby canine kidney and LLC-PK1 epithelial cells. *J. Biol Chem.* **273**, 26862-26869.

Ryeom, S.W. *et al.*, 1996, Binding of anionic phospholipids to retinal pigment epithelium maybe mediated by the scavenger receptor CD36. *J. Biol. Chem.* **271**, 20563-20539.

Saftig, P., Tanaka, Y., Lüllmann-Rauch, R. und von Figura, K., 2001, Disease-Model: LAMP-2 enlightens Danon Disease. *TRENDS Mol. Med.* **7**, 37-39.

Saifi, G.M. *et al.*, 2005, SIMPLE mutations in Charcot-Marie-Tooth disease and the potential role of its protein product in protein degradation. *Hum. Mutat.* **25**, 372-383.

Salzer, J.L., 2003, Polarited Domains o Myelinated Axons. *Neuron* **40**, 297-318.

Sambuughin, N. *et al.*, 2003, Deafness and CMT disease associated with a novel four amino acid deletion in the PMP22 gene. *Neurology* **60**, 506-508.

Sandoval, I. *et al.*, 1994, The residues Leu (Ile)⁴⁷⁵-Ile (Leu, Val, Ala)⁴⁷⁶, contained in the extended carboxyl cytoplasmic tail, are critical for targeting of the resident lysosomal membrane protein LIMP II to lysosomes. *J. Biol. Chem.* **269**, 6622-6631.

Sanguinetti, M.C., 2000, Maximal function of minimal K⁺ channel subunits. *Trends Pharmacol. Sci.* **21**, 199-201.

Schimmang, T. *et al.*, 2003, Lack of Bdnf and TrkB signalling in the postnatal cochlea leads to a spatial reshaping of innervation along the tonotopic axis and hearing loss. *Develop.* **130**, 4741-4750.

Schneider, D.L. *et al.*, 1984, Lysosomal transport of cystine and other small molecules. *Biochem. Soc. Trans.* **12**, 908-910.

Schneider, S. *et al.*, 2001, The AN2 protein is a novel marker for the Schwann cell lineage expressed by immature and nonmyelinating Schwann cells. *J. Neurosci.* **21**, 920-933.

Seaman and Luzia, 2001, Lysosomes and other late compartments of the endocytic pathway. In *Endocytosis*, M. Marsh, ed. (Oxford University Press, Oxford), pp. 111-148.

Sereda, M. *et al.*, 1996, A Transgenic Rat Model of Charcot-Marie-Tooth Disease, *Neuron* **16**, 1049-1060.

Simmen, T. *et al.*, 2002, AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells. *Nat. Cell Biol.* **4**, 154-159.

Simsek, E. *et al.*, 2003, Wolfram (DIDMOAD) syndrome: a multidisciplinary clinical study in nine Turkish patients and review of the literature. *Acta Paediatr.* **92**, 55-61.

Slepecky, N.B., 1996, Structure of the mammalian cochlea. In: Dallos P, Popper AN, Fay RR. The cochlea. *New York: Springer-Verlag.*, 44–129.

Smith, C.J.A. *et al.*, 2004, Phenotype-Genotype Correlations in a Series of Wolfram Syndrome Families. *Diab. Care* **27**, 2003-2009.

Staehein, L.A., Chlapowski, F.J. und Bonneville, M.A., 1972, Luminal plasma membrane of the urinary bladder. Three-dimensional reconstitution from freeze-etch images. *J. Cell Biol.* **53**, 73-91.

Steel, K., 1999, The Benefits of Recycling, *Science* **285**, 1363-1364.

Stinchi, S. *et al.*, 1999, Targeted disruption of the lysosomal alpha-mannosidase gene results in mice resembling a mild form of human alpha-mannosidosis. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 1365-1372.

Storch, S., Pohl, S. und Braulke, T., 2004, A Dileucine Motif and a Cluster of Acidic Amino Acids in the Second Cytoplasmic Domain of the Batten Disease-related CLN3 Protein Are Required for Efficient Lysosomal Targeting. *J. Bio. Chem.* **279**, 53625-53634.

Street, V.A. *et al.*, 2003, Mutation of a putative protein degradation gene LITAF/SIMPLE in Charcot-Marie-Tooth disease 1C. *Neurology* **14**, 22-26.

Sun, T.T. *et al.*, 1996, Formation of asymmetric unit membrane during urothelial differentiation. *Mol. Biol. Rep.* **23**, 3-11.

Suter, U. und Scherer, S.S., 2003, Disease mechanisms in inherited neuropathies. *Nature* **4**, 714-726.

Tabuchi, N. *et al.*, 1997, Identification and characterization of a major lysosomal membrane glycoprotein, LGP85/LIMP II in mouse liver. *J. Biochem. (Tokyo)* **122**, 756-763.

Tai, A.W., Chuang, J.Z. und Sung, C.H., 2001, Cytoplasmic Dynein Regulation by Subunit Heterogeneity and Its Role in Apical Transport. *J. Cell Biol.* **153**, 1499-1509.

Takeda, T., Yamazaki H. und Farquhar M.G., 2003, Identification of an apical sorting determinant in the cytoplasmic tail of megalin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **284**, 1105-1113.

Takeuchi, S. und Ando, M., 1999, Voltage-dependent outward K⁺ current in intermediate cell of stria vascularis of gerbil cochlea. *Am. J. Physiol.* **277**, 91–99.

Tanaka, Y. *et al.*, 2000, Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in Lamp-2-deficient mice. *Nature* **406**, 902-906.

Tao, N. *et al.*, 1996, CD36 Is Palmitoylated on Both N- and C-terminal Cytoplasmic Tails. *J. Biol. Chem.* **271-37**, 22315-22320.

Tobler, A.R. *et al.*, 1999, Transport of Trembler-J mutant peripheral myelin protein 22 is blocked in the intermediate compartment affects the transport of the wild-type protein by direct interaction. *J. Neurosci.* **19**, 2027-2036.

Tobler, A.R. *et al.*, 2002, Differential aggregation of the Trembler and Trember J mutants of peripheral myelin protein 22. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 483-488.

Tofaris, G.K. *et al.*, 2002, Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. *J. Neurosci.* **22**, 6696-6703.

Trigatti, B.L. *et al.*, 2003, Influence of the HDL Receptor SR-BI on Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 1732-1738.

Truschel, S. *et al.*, 2002, Stretch-regulated Exocytosis/Endocytosis in Bladder Umbrella cells. *Mol. Biol. Cell* **13**, 830-846.

Tu, L., Sun, T.T. und Kreibich, G., 2002, Specific heterodimer formation is a prerequisite for uroplakins to exit from the endoplasmatic reticulum. *Mol. Biol. Cell.* **13**, 4221-4230.

Urquhart P., Pang S. und Hooper N.M., 2005, N-glycans as apical targeting signals in polarized epithelial cells. *Biochem. Soc. Symp.* **72**, 39-45.

Uthayakumar S. und Granger, B.L., 1995, Cell surface accumulation of overexpressed hamster lysosomal membrane glycoproteins. *Cell. Mol. Biol. Res.* **41**, 405-420.

van der Sluijs, P. *et al.*, 1992, The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* **70**, 729-740.

Varki, A. *et al.*, 1982, Demonstration of the heterozygous state for I-cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy by assay of N-acetylglucosaminyl-phosphtransferase in with blood cells and fibroblasts. *Am. J. Hum. Genet.* **34**, 717-729.

Vega, M.A. *et al.*, 1991, Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat LIMP II, a novel 74-kDa lysosomal membrane protein related to the surface adhesion protein CD36. *J. Biol. Chem.* **266**, 16818-16824.

Verhoeven, K. *et al.*, 2003, Mutations in the Small GTP-ase Late Endosomal Protein RAB7 Cause Charcot-Marie-Tooth Type 2B Neuropathy. *Am. J. Hum. Genet.* **72**, 722-727.

Verroust, P.J. und Christensen, E.I., 2002, Megalin and Cubilin-the story of two multiporpose receptors unfolds. *Nephrol. Dial. Transplant.* **17**, 1867–1871.

Vetter, D.E. *et al.*, 1996, Inner ear defects induced by null mutation of isk gene. *Neuron* **17**, 1251-1264.

Volpicelli, L.A. *et al.*, 2002, Rab11a and Myosin Vb Regulate of the M4 Muscarinic Acetylcholine Receptor. *J. Neurosci.* **22**, 9776-9784.

Voshol, H. *et al.*, 1996, Structure of the HNK-1 carbohydrate epitope on bovine peripheral myelin glycoprotein P0. *J. Biol. Chem.* **271**, 22957-22960.

Wangemann, P., 1995, Comparison of ion transport mechanisms between vestibular dark cells and strial marginal cells. *Hear. Res.* **90**, 149-157.

Wangemann, P. *et al.*, 1996, K⁺ secretion and cell volume regulation in vestibular dark cells and strial marginal cells of I_{sk} knockout, heterozygote and wild-type mice. *J. Gen. Physiol.* **108**, 31a.

Wangemann, P., 1997, Kaliumsekretion und Entstehung des endokochlearen Potentials in der Stria vascularis. *HNO* **4**, 205-209.

Wangemann, P. *et al.*, 2004, Loss of KCNJ10 protein expression abolishes endocochlear potential and causes deafness in Pendred syndrome mouse model. *BioMed Central Med.* **2**, 30-45.

Warth, R. und Barhanin, J., 2002, The multifaceted phenotype of the knockout mouse for the KCNE1 potassium channel gene. *Am. J. Physiol. Reg. Integrat. Comp. Physiol.* **282**, 639-648.

Watabe, K. *et al.*, 1990, Transfection and stable transformation of adult mouse Schwann cells with SV-40 large T antigen gene. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **49**, 455-67

Werner, H. *et al.*, 1998, Mouse models of myelin diseases. *Brain Pathol.* **8**, 771-793.

Wettey, F.R. *et al.*, 2002, Controlled elimination of clathrin heavy-chain expression in DT40 lymphocytes. *Science* **297**, 1521-1525.

Willems, P.J., 2000, Genetic cause of hearing loss. *The New England J. of Med.* **13**, 1101-1109.

Willnow, T.E. *et al.*, 1996, Defective forebrain development in mice lacking gp330/Megalin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8460-8464.

Wu, X.R. *et al.*, 1990, Large Scale Purification and Immunolocalization of Bovine Uroplakins I, II and III. *J. Biol. Chem.* **265**, 19170-19179.

Wu, X.R. und Sun, T.T., 1993, Molecular cloning of a 47 kDa tissue-specific and differentiation dependent urothelial cell surface glykoprotein. *J. Cell Sci.* **106**, 31-43.

You, K.H. *et al.*, 1991, DNA sequence, genomic organization, and chromosomal localization of the mouse peripheral myelin protein zero gene: identification of polymorphic alleles. *Genomics* **9**, 751-757.

Young, P. und Suter, U., 2003, The causes of Charcot-Marie-Tooth disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 2547-2560.

Zheng, J. *et al.*, 2000, Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature* **405**, 153-155.

Zuo, J., 2002, Transgenic and Gene Targeting Studies of Hair Cell Function in Mouse Inner Ear. *J. Neurobiol.* **53**, 286-305.

8. Abkürzungen

A	Alexa Fluor
Å	Angström ($10 \text{ Å} = 1 \text{ nm}$)
α	anti, griechischer Buchstabe Alpha
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Adaptorprotein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
β	griechischer Buchstabe Beta
BMP	bis-(monoacylglycero) Phosphat
bp	Basenpaare
BP	Band Pass Filter
BPE	Rinder-Hypophysenextrakt
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
C	Carboxy
CaCl_2	Calciumchlorid
CD	Cathepsin D
CMT	Charcot-Marie-Tooth Krankheit
d	Durchmesser
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DABCO	Diazobicyclooctan
dB	Dezibel
dest	destilliert
DF	Durchfluß
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSHB	Developmental Studies Hybridoma Bank
DSP	Dithiobis(succinimidylpropionat)
DSS	Disuccinimidyl suberat
DTT	Dithiothreitol
ϵ	Extinktionskoeffizient, griechischer Buchstabe Epsilon
EBSS	Earle's Balanced Salt Solution

ECV	Endosomaler Transport-Vesikel
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EL	Endolymphe
EM	Elektronenmikroskop
ERC	<i>endocytic recycling compartment</i>
EtOH	Ethanol
FKS	Fötale Kälberserum
γ	griechischer Buchstabe Gamma
g	Gravitationskonstante der Erde ($g=9.81\text{m}^2\text{s}^{-2}$)
G	Gauge, Feinheitsbezeichnung für den Nadelabstand z.B. bei Kanülen
GA	Glutaraldehyd
gER	glattes endoplasmatisches Retikulum
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GGA	<i>Golgi-localized, γ-ear-containing, ADP ribosylation factor-binding Protein</i>
GL	Gesamtlysat
GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamin
HAc	Essigsäure
HCl	Salzsäure
HEPES	2-[4-(Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]-Ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase
hum	human
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitierung
Kanin.	Kaninchen
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
KO	Knock-out
λ	Wellenlänge, griechischer Buchstabe Lambda
L	Lumen
Lamp	lysosomal assoziiertes Membranprotein
LAP	lysosomale saure Phosphatase
lbpa	Lysobisphatidsäure
LGP	lysosomales Glykoprotein

Li-2	Limp-2
Limp	lysosomales integrales Membranprotein
Lys	Lysosomen
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i>
MEF	murine embryonale Fibroblasten
MeOH	Methanol
M6P	Mannose-6-Phosphat
M6PR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
MPR	Mannose-Phosphat-Rezeptor
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MVB	<i>Multivesicular Body</i>
MW	Molekulargewicht
mur	murin
Mus	Muskularis
n	Anzahl der Tiere oder Proben
N	Amino
NaCl	Natriumchlorid
neoR	Neomycinresistenzgen
NeuNAc	N-Acetylneuraminsäure
ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
P	Plaques
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepuffertes Salz
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PNS	peripheres Nervensystem
PtdIns3P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rER	rauhes endoplasmatisches Retikulum
rpm	Umdrehungen pro Minute
Sch	Scharniere
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	späte Endosomen
SV	Simianer Virus
Sv	Stria vascularis

TBE	Tribromethanol
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
Temed	N,N,N',N'-Tetramethyldiamid
TGN	<i>Trans</i> -Golgi-Netzwerk
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Unit (Einheit bei Enzymkonzentrationen)
UP	Uroplakin
Ur	Urothel
V	Volt
Verd.	Verdünnung
VUR	Vesikoureteraler Reflux
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem