

# Untersuchungen zur Rolle von I-Plastin im intestinalen Bürstensaum

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln



vorgelegt von

**Eva-Maria Grimm-Günter**

aus Moers

Print-Factory, Köln

2008

Berichtersteller/in: Prof. Dr. Angelika A. Noegel  
Prof. Dr. Thomas Langer

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07.2008

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2004 bis Mai 2008 unter Anleitung von Prof. Dr. Angelika A. Noegel und der Betreuung von PD Dr. Francisco Rivero Crespo am Biochemischen Institut der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln angefertigt.

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Zentrums für Biochemie, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben, bedanken. Insbesondere gilt mein Dank:

**PD Dr. Francisco Rivero** für die Bereitstellung des interessanten Themas, seine fachliche Kompetenz sowie stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Besonders auch für die Möglichkeit an nationalen und internationalen Tagungen teilzunehmen,

**Prof. Dr. Angelika A. Noegel** für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit an ihrem renommierten Institut unter sehr guten Arbeitsbedingungen,

**Prof. Dr. Thomas Langer** für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Dissertation und **Prof. Dr. Siegfried Roth** für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes,

**Dr. Sonia Ramos, Dr. Neil R. Smyth, Wieslaw Krzyzak** und **Alexandra Ley** für die Herstellung des *targeting* Konstrukts, der ES-Zellkulturarbeit, die Mikroinjektion sowie den ersten *Screenings* bis zu den Chimären,

**Dr. Sylvie Robine** und **Dr. Céline Revenu** vom Institut Curie in Paris für die freundliche Aufnahme, wertvollen Ratschläge und vor allem für die transmissionen-elektronenmikroskopischen sowie den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen im Zusammenarbeit mit dem Institut Pasteur in Paris,

**PD Dr. Olaf Utermöhlen** für die Mithilfe bei der Durchführung der Infektionsversuche und seine stete Hilfsbereitschaft,

**Johann, Michaela** und **Conny** vom Tierstall des physiologischen Instituts für ihre freundliche Unterstützung bei der Tierzucht,

**Christian Frie** und **Maria Stumpf** für die unentbehrliche Hilfe bei technischen Fragen zur Histologie, **Dr. Markus Plomann** für seine Hilfsbereitschaft,

**Köln Fortune Programm der Medizinischen Fakultät** für das Promotionsstipendium sowie der **DFG** und Köln Fortune für die finanzielle Förderung des Projekts,

**Dörte, Budi** und **Gudrun** für ihre freundliche Hilfe bei organisatorischen und EDV-Angelegenheiten,

meiner **Arbeitsgruppe**, der ich für die tolle Zusammenarbeit und für die vielen schönen Momente ganz besonders danken möchte,

**Georgia, Jessi, Marion, Kristina, Carola, Sascha, Ria, Christoph, Akis, Jianbo, Christian, Mary, Vivek, Yogi, Hafi, Hua, Bärbel, Brigitte, Sonja** und allen weiteren aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie I,

meinen **Eltern**, die immer für mich da sind und ohne deren Unterstützung mein Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen wären sowie meinem Bruder **Dr. Robert Günter** für seine großartige Hilfe in allen EDV- bzw. Laborangelegenheiten und für seine moralische Unterstützung,

und **Michael** der mir in der ganzen Zeit immer wieder Kraft gegeben hat und für seine tatkräftige Unterstützung, einfach für alles!

Für meine Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b>I EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1 Der Darm.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Makroskopie des Darms.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Aufbau der Dünndarmwand.....</b>	<b>1</b>
<b>1.3 Die <i>Lamina epithelialis mucosae</i>.....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Zellerneuerung im Dünndarmepithel.....</b>	<b>3</b>
1.4.1 Zellerneuerung im Dünndarm.....	3
1.4.2 Der Zelltod im Dünndarm.....	5
<b>1.5 Die Enterozyten bzw. Darmepithelzellen.....</b>	<b>5</b>
Der Bürstensaum.....	6
<b>2 Das Aktinzytoskelett der intestinalen Epithelzellen.....</b>	<b>8</b>
<b>2.1 Aktinbündelnde Proteine.....</b>	<b>9</b>
2.1.1 Plastin/Fimbrin.....	9
2.1.2 Villin.....	12
2.1.3 Espin.....	13
<b>2.2 Andere aktinbindende Proteine des Bürstensaums.....</b>	<b>14</b>
2.2.1 Tropomyosin.....	14
2.2.2 Ezrin.....	15
2.2.3 Myosine.....	15
2.2.4 Quervernetzende Proteine.....	17
<b>3 Keratinfilamente.....</b>	<b>18</b>
<b>4 Assemblierung des intestinalen Bürstensaums.....</b>	<b>19</b>
<b>5 Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>22</b>
<b>II MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>24</b>
<b>1 Material.....</b>	<b>24</b>
<b>1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....</b>	<b>24</b>
<b>1.2 Lösungen und Puffer.....</b>	<b>24</b>
<b>1.3 Kits.....</b>	<b>25</b>
<b>1.4 Oligonukleotide.....</b>	<b>26</b>
<b>1.5 Konstrukte.....</b>	<b>26</b>
<b>1.6 Enzyme.....</b>	<b>27</b>
<b>1.7 Antikörper.....</b>	<b>27</b>
<b>1.8 Bakterienstämme und Nährmedium.....</b>	<b>31</b>
<b>1.9 Tiere.....</b>	<b>32</b>

<b>2</b>	<b>Methoden</b>	<b>32</b>
<b>2.1</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>32</b>
2.1.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	32
2.1.2	Aufreinigung von Plasmid-DNA (Roche/Macherey-Nagel)	33
2.1.3	Lagerung und Konservierung von Bakterien	33
2.1.4	Transformation von Bakterien	33
2.1.5	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	34
2.1.6	Restriktionsanalyse	34
2.1.7	Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien (Laird et al., 1991)	35
2.1.8	Restriktion genomischer DNA	35
2.1.9	DNA-Agarosegelelektrophorese	36
2.1.10	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	36
2.1.11	<i>Southern Blot</i> (Southern, 1975)	37
2.1.12	Radioaktive Markierung von DNA Sonden	37
2.1.13	Isolierung von Gesamt-RNA aus Mausgewebe	38
2.1.14	Denaturierende Gelelektrophorese (Lehrach et al., 1977)	38
2.1.15	<i>Northern Blot</i>	38
2.1.16	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	39
2.1.17	Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Saiki et al., 1988)	39
2.1.18	Hybridisierung radioaktiv markierter DNA Sonden mit filtergebundener DNA und RNA	40
<b>2.2</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>40</b>
2.2.1	Bestimmung der Proteinkonzentration mit der Bicinchoninsäure-Methode (BCA)	40
2.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry (Lowry et al., 1951)	41
2.2.3	Proteinexpression	41
2.2.4	Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine	42
2.2.5	GST-Fusionsproteinpräparation und Copräzipitation	42
2.2.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
2.2.7	Coomassie Blau Färbung	44
2.2.8	Geltrocknung	45
2.2.9	Übertragung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen ( <i>Western Blot</i> , Towbin et al., 1979)	45
2.2.10	Immunologischer Nachweis von Proteinen	46
2.2.11	Chemilumineszenz Detektion	46
2.2.12	Entfernung der Antikörper nach Immundetektion	47
<b>2.3</b>	<b>Mauspräparation</b>	<b>47</b>
2.3.1	Präparation von Mäusen	47
2.3.2	Herstellung von Gewebelysaten	47
2.3.3	Isolierung von Darmepithelzellen (modifiziert n. Weiser (Weiser, 1973))	48
2.3.4	Isolierung des Bürstensaums aus Darm	49
2.3.5	Kontraktion des Bürstensaums (McConnell und Tyska, 2007)	50
2.3.6	Gewinnung von Blutproben	51
<b>2.4</b>	<b>In vivo Analysen</b>	<b>51</b>
2.4.1	Messung von Körpergewicht und Länge	51
2.4.2	Untersuchung der Nahrungsaufnahme und Kotabgabe	51
2.4.3	Fasten mit anschließender Fütterung ( <i>fasting and refeeding</i> , Ferrary et al., 1999)	52
2.4.4	Basolaterale Infusion von Carbachol (Ferrary et al., 1999)	52
2.4.5	Induktion einer Kolitis mittels DSS	52
2.4.6	Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	53
2.4.7	Infektion mit <i>Shigella flexneri</i>	53
<b>2.5</b>	<b>Histologische Analysen</b>	<b>54</b>
2.5.1	Präparation von Gefrier- und Paraffinschnitten	54
2.5.2	Entparaffinierung	55
2.5.3	Hämatoxylin und Eosin (HE) Färbung	55
2.5.4	Immunfluoreszenz und immunhistochemische Färbungen	55
2.5.5	TUNEL-Färbung (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling)	57
2.5.6	<i>BrdU-Färbung</i>	57

2.5.7	Färbung von isoliertem Bürstensaum des Darms .....	57
<b>2.6</b>	<b>Elektronenmikroskopie .....</b>	<b>58</b>
2.6.1	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) .....	58
2.6.2	TEM an isoliertem Bürstensaum .....	58
2.6.3	Rasterelektronenmikroskopie (REM) .....	58
<b>2.7</b>	<b>Auswertung .....</b>	<b>59</b>
2.7.1	Mikroskopie .....	59
2.7.2	Bildbearbeitung .....	59
2.7.3	Datenbearbeitung .....	60
<b>III</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>61</b>
<b>1</b>	<b><i>Etablierung und Genotypisierung einer I-Plastin defizienten Mauslinie .....</i></b>	<b>61</b>
1.1	I-Plastin-knockout Strategie .....	61
1.2	Genotypisierung .....	63
1.3	Analyse der I-Plastin defizienten Mauslinie auf RNA- und Proteinebene .....	64
<b>2</b>	<b><i>Analyse der I-Plastin defizienten Mauslinie .....</i></b>	<b>66</b>
2.1	Lokalisationsanalyse von L- und T-Plastin im Darm .....	66
2.2	Eigenschaften der I-Plastin defizienten Maus .....	68
2.3	Morphometrische und Makroskopische Analysen .....	68
2.3.1	Länge und Körpergewicht .....	69
2.3.2	Nahrungsaufnahme und Kotproduktion .....	70
2.3.3	Länge des Dünn- und Dickdarmes .....	71
2.3.4	Blutserumspiegel einiger biochemischer Parameter .....	72
<b>3</b>	<b><i>Histologische und morphologische Analysen .....</i></b>	<b>73</b>
3.1	Mikroanatomie .....	73
3.1.1	Übersichtsfärbung .....	73
3.1.2	Elektronenmikroskopische Untersuchungen .....	75
3.1.3	Studien an isoliertem Bürstensaum .....	80
3.2	Lokalisation apikaler Markerproteine .....	84
3.2.1	Lokalisation von mikrovillaren Bestandteilen .....	84
3.2.2	Die Lokalisationen von Proteinen im terminalen Netz sind beeinträchtigt .....	87
3.3	I-Plastin ist im terminalen Netz angereichert .....	95
3.4	I-Plastin bindet an Komponenten des terminalen Netzes .....	97
3.5	Analyse der Zell-Zellkontakte und basolateraler Marker .....	99
3.6	Lokalisation apikaler Enzyme .....	101
3.7	Lokalisation an der Endozytose beteiligter Proteine .....	103
3.8	Analyse der Expression von Proteinen des Bürstensaums .....	105
<b>4</b>	<b><i>Funktionelle Analysen .....</i></b>	<b>107</b>
4.1	Kontraktion des Bürstensaums .....	107
4.2	Untersuchungen möglicher Auswirkungen der I-Plastin-Defizienz auf eine erhöhte Kalziumkonzentration .....	109
4.3	Die Rolle von I-Plastin bei der Umstrukturierung des Zytoskeletts bei bakteriellen Infektionen .....	111



---

4.4	Analyse der Stabilität von Darmepithelzellen <i>in vivo</i> .....	113
5	<i>Analyse der Apoptose, Proliferation und Differenzierung</i> .....	117
5.1	Erhöhte apoptotische Aktivität im Darmepithel .....	117
5.2	Der Verlust von I-Plastin führt zu einer erhöhten Zellerneuerung.....	118
<b>IV DISKUSSION</b> .....		<b>123</b>
1	<i>I-Plastin-Defizienz führt zu Veränderungen des intestinalen Bürstensaums ...</i>	<b>123</b>
1.1	I-Plastin ist für die Verlängerung der Mikrovilli verantwortlich.....	123
1.2	I-Plastin ist für den Aufbau des terminalen Netzes notwendig.....	124
1.2.1	Einfluss von I-Plastin auf die Keratinfilamente.....	126
1.2.2	I-Plastin interagiert mit Proteinen im terminalen Netz.....	127
1.3	Verlust der $\beta$ -Aktin-Anreicherung im terminalen Netz bei I-Plastin-Defizienz	129
2	<i>Auswirkungen der I-Plastin-Defizienz auf die Mikrovilli von Darmepithelzellen..</i> .....	<b>131</b>
2.1	I-Plastin-Defizienz wird nicht durch andere Plastinproteine kompensiert .....	131
2.2	Mögliche Kompensierung durch andere aktinbündelnde Proteine .....	133
3	<i>Modell der Funktion von I-Plastin im Bürstensaum</i> .....	<b>136</b>
3.1	Rolle bei der Mikrovilliassemblierung .....	136
3.2	Stabilisierung des Bürstensaums .....	137
4	<i>Erhöhter Zellumsatz als Kompensierungsmechanismus</i> .....	<b>140</b>
5	<i>Die Aktinwurzel als Transportroute</i> .....	<b>143</b>
6	<i>Schlussfolgerung</i> .....	<b>146</b>
<i>Literaturverzeichnis</i> .....		<b>147</b>
<i>Anhang</i> .....		<b>167</b>
<i>Abkürzungen</i> .....		<b>171</b>
<i>Zusammenfassung</i> .....		<b>174</b>
<i>Abstract</i> .....		<b>176</b>
<i>Erklärung</i>		
<i>Lebenslauf</i>		

# I Einleitung

## 1 Der Darm

### 1.1 Makroskopie des Darms

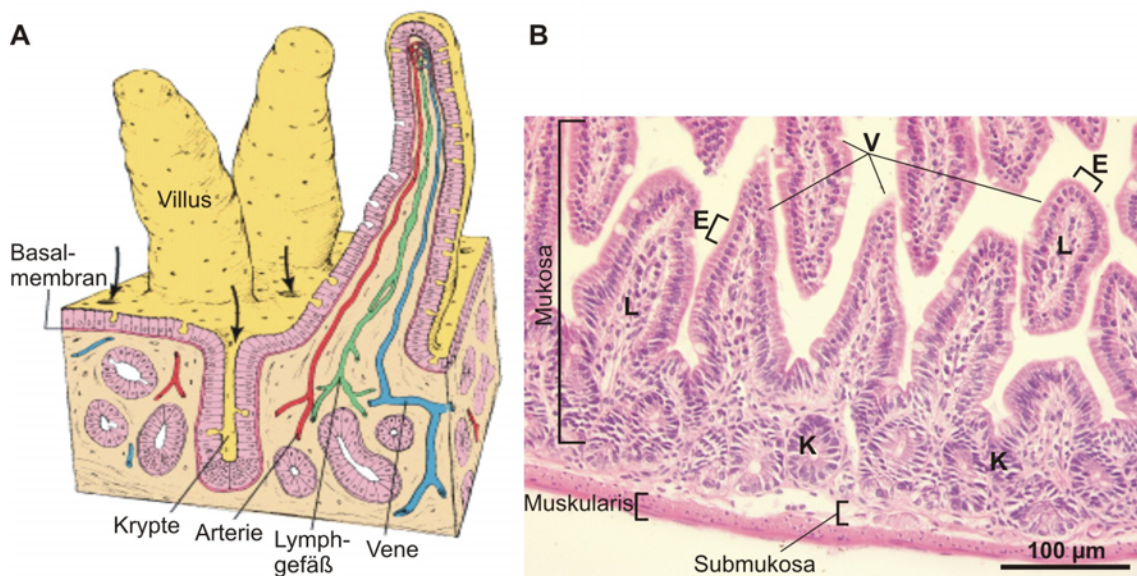
Der Darm (*Intestinum*) ist ein wichtiger Teil des Verdauungsapparats und wird in Dünndarm (*Intestinum tenue*) und Dickdarm (*Intestinum crassum*) unterteilt (Schwarze, 1962). Der Dünndarm besteht aus dem Zwölffingerdarm (Duodenum), dem Leerdarm (Jejunum) und dem Krummdarm (Ileum). Seine wesentliche Aufgabe liegt in der Verdauung und Resorption der Nährstoffe. Die letzten Schritte der Verdauung erfolgen an der Oberfläche der Schleimhaut, die durch Falten (Lieberkühn-Krypten bzw. Krypten), Zotten (*Villi intestinales* bzw. Villi) und Mikrovilli vergrößert ist. Der Dickdarm wird im Allgemeinen in Blinddarm (*Caecum*) und Enddarm gegliedert. Den Enddarm unterteilt man wiederum in Grimmdarm (Colon) und Mastdarm (Rektum). Im Dickdarm bewirken Krypten und Mikrovilli eine Oberflächenvergrößerung, nicht aber Villi. Die Hauptaufgabe des Dickdarms ist die Resorption von Salzen und Wasser sowie die Sezernierung von Schleimstoffen (Muzinen) als Gleitmittel. Der Darm ist aber auch ein wichtiges Immunorgan und daher mit vielen Abwehrzellen ausgestattet (Lüllmann-Rauch, 2003).

Die nachfolgenden Kapitel beziehen sich hauptsächlich auf den Dünndarm, da in der vorliegenden Arbeit dieser Darmabschnitt im Besonderen untersucht worden ist.

### 1.2 Aufbau der Dünndarmwand

Die Wand des Dünndarmtrakts besteht prinzipiell von innen nach außen aus der Schleimhaut (*Tunica mucosa* oder Mukosa), dem Bindegewebe (Submukosa), einer Muskelschicht (*Muscularis externa* oder Muskularis) und dem Bauchfellüberzug (Serosa; Abbildung I-1). Die Mukosa ist mit einem einschichtigen, hochprismatischen Epithel, einer Basalmembran und der darunterliegenden *Lamina propria* aus drei Schichten aufgebaut (Ross et al., 2003). Sie stellt eine Barriere zwischen dem Darmlumen und dem restlichen Organismus dar. Aus diesem Grund sind in der Mukosa und der Submukosa Immunzellen in großer Anzahl vorhanden und bilden das

Darm assoziierte lymphatische Gewebe (GALT) (Landsverk, 1998). Die Zellen des GALTs können sowohl einzeln als auch in organisierten Gruppen vorkommen. Die Hauptfunktion des Dünndarms, der Abbau und die Resorption von Nährstoffen, wird maßgeblich von den Zellen der Mukosa gewährleistet. Zur Vergrößerung der resorptionsaktiven Oberfläche ist die Mukosa, wie bereits erwähnt, in Krypten (Vertiefungen) und Villi (finger- oder blattartige Ausstülpungen) gefaltet. Die Erhebungen des Epithels werden dabei von der *Lamina propria*, in der ein System von Blut- und Lymphgefäßen eingebunden ist, ausgefüllt. Die Krypten wachsen in die *Lamina propria* ein und werden durch die *Lamina muscularis mucosae* begrenzt (Lüllmann-Rauch, 2003). Die Submukosa trennt die Mukosa von der Muskularis. Das in ihr enthaltene Bindegewebe mit eingelagerten Gefäßen ermöglicht eine gewisse Dehnbarkeit des Darmrohres. Die Muskularis besteht aus einer inneren, quergestreiften und einer äußeren, längsgestreiften glatten Muskelschicht, die durch eine Bindegewebsschicht voneinander getrennt sind. Durch aufeinander abgestimmte Kontraktionen durchmischen sie den Nahrungsbrei mit sezernierten Enzymen und sorgen für dessen Weitertransport (Ross et al., 2003).



**Abbildung I-1: Aufbau der Dünndarmwand.** **A:** Dreidimensionale Darstellung der Villi und Krypten im Dünndarm. Innerhalb eines Villus befinden sich u.a. Gefäße und Zellen des Immunsystems. Die Pfeile kennzeichnen die Krypten und die Vertiefungen in den Villi deuten die Becherzellen im Epithel an (modifiziert nach Ross et al., 2003). **B:** Hematoxylin und Eosin gefärbter Paraffinschnitt (Längsschnitt mit z.T. quer geschnittenen Villi) vom Dünndarm. V: Villus, E: Epithelzellen, L: *Lamina propria*, K: Krypte.

### 1.3 Die *Lamina epithelialis mucosae*

Das einschichtige Zylinderepithel der Mukosa kleidet die Wand der Krypten aus und bildet die Oberfläche der Villi (Abbildung I-2). Im Kryptenepithel befinden sich vor allem sekretorische Zellen wie die Panethzellen und zusätzlich findet hier die Zellerneuerung statt. Der wichtigste Inhaltsstoff der Panethzellen ist das Lysozym, das die Muraminsäure in Bakterienwänden spaltet. In den Villi sind die Saumzellen (Enterozyten oder Darmepithelzellen) mit mehr als 90 % der vorherrschende Zelltyp. Sie werden in Abschnitt 1.5 genauer beschrieben. Zwischen den Darmepithelzellen liegen die Becherzellen, die Muzine durch Exozytose ausschütten (Lüllmann-Rauch, 2003). Sie treten vermehrt im Jejunum auf (Bajaj-Elliott und Sanderson, 2004). Deutlich seltener kommen enteroendokrine Zellen (1 % der Epithelzellen), die Peptidhormone und einige biogene Amine produzieren, in den Krypten und Villi vor (Ross et al., 2003). M-Zellen (Mikrofalten an der luminalen Oberfläche) sind ausschließlich im sogenannten Dome-Epithel zu finden (Potten, 1997). Sie nehmen Antigene über Pinozytose auf und geben diese im basalen Bereich in den Interzellularraum ab. Diesem Zelltyp kommt daher die Rolle eines Initiators bei der Immunantwort zu (Landsverk, 1998). Im Epithel befindliche Lymphozyten (intraepitheliale Lymphozyten) sind aus der *Lamina propria* eingewandert und verweilen nur vorübergehend im Zylinderepithel. Sie werden daher nicht zum Epithel gezählt.

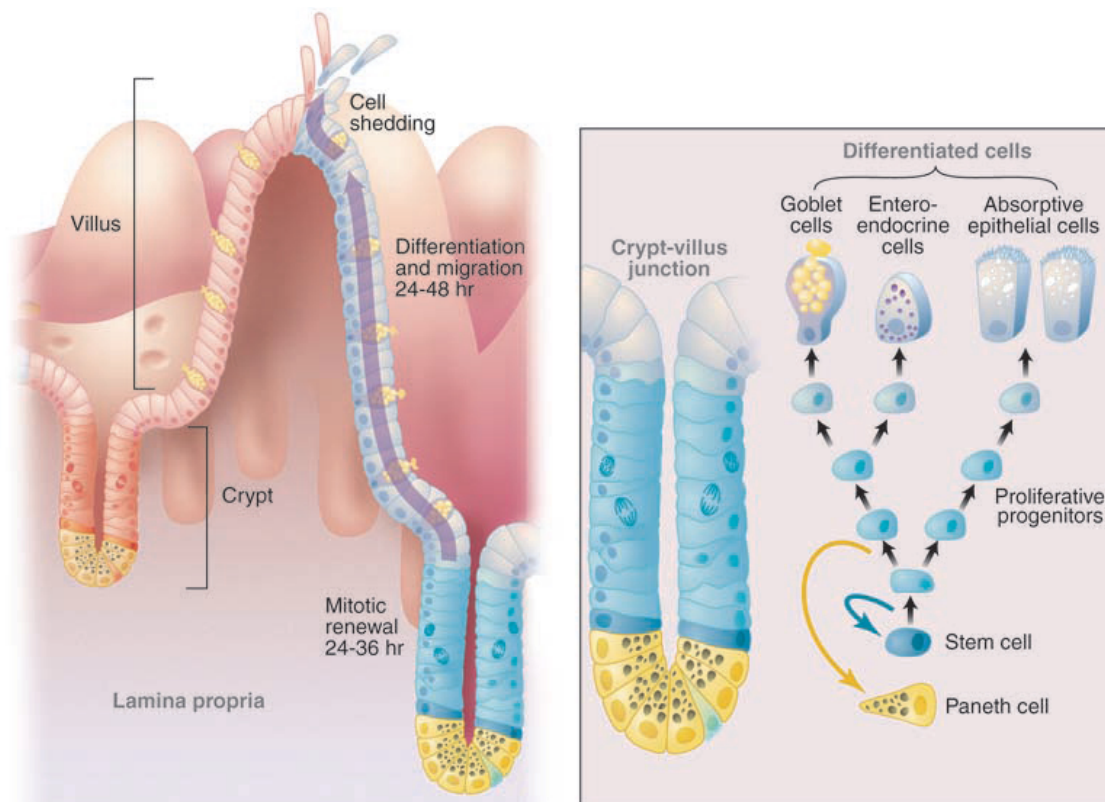
### 1.4 Zellerneuerung im Dünndarmepithel

Die Lebensspanne einer intestinalen Epithelzelle beträgt zwei bis sieben Tage bevor sie vom Villus ins Darmlumen abgegeben wird. In der Maus werden jeden Tag etwa 200 Zellen pro Krypte generiert, so dass der Verlust von Zellen kompensiert wird (Reya und Clevers, 2005). Zur Aufrechterhaltung des stabilen Zustands sind sowohl die Zellproliferation als auch der Zelltod genau reguliert (Creamer et al., 1961; Tutton, 1973; Miller et al., 1977; Potten und Booth, 1997).

#### 1.4.1 Zellerneuerung im Dünndarm

Die intestinalen Stammzellen sind auf die Krypten begrenzt, während ihre Abkömmlinge, mit Ausnahme der Panethzellen, in Richtung Villusspitze migrieren (Crosnier et al., 2006) (Abbildung I-2). Im Darm findet eine kontinuierliche Zellerneuerung statt, wobei die genaue Anzahl von Stammzellen in einer Krypte noch

nicht bekannt ist (Marshman et al., 2002). Die Epithelzellen eines Villus sind polyklonal, da sie von unterschiedlichen Krypten stammen (Yen und Wright, 2006). Es wird angenommen, dass sich vier bis sechs Stammzellen in einer Krypte teilen und sich ihre Tochterzellen über einen längeren Zeitraum replizieren (Bjerknes und Cheng, 1999). Andere Autoren vermuten, dass die Anzahl nicht konstant ist, sondern im Bedarfsfall erhöht oder bei Energiemangelsituationen verringert werden kann (Booth und Potten, 2000). Eine weitere Studie zeigt zudem die Bedeutung der Zellerneuerung bei der Regenerierung des Epithels nach Verletzungen (Reya und Clevers, 2005).



**Abbildung I-2: Zellerneuerung im adulten Dünndarm.** Die Stammzellen (*stem cell*) liegen unmittelbar oberhalb oder zwischen den Panethzellen (*Paneth cell*) in der Nähe des Kryptenbodens. Darüber befinden sich die proliferierenden Vorläuferzellen (*Proliferative progenitors*). Im oberen Drittel der Krypten und in den Villi sind weitere ausdifferenzierte Zelltypen zu finden (*Goblet cells*: Becherzellen; *Enteroendocrine cells*: enteroendokrine Zellen; *Absorptive epithelial cells*: Enterozyten/Darmepithelzellen). Der Pfeil in den Epithelzellen im linken Bild kennzeichnet den Migrationsweg der ausdifferenzierten Zellen (Ausnahme: Panethzellen) und ihren Abwurf (*cell shedding*). (Abb. entnommen aus Radtke und Clevers, 2005).

## 1.4.2 Der Zelltod im Dünndarm

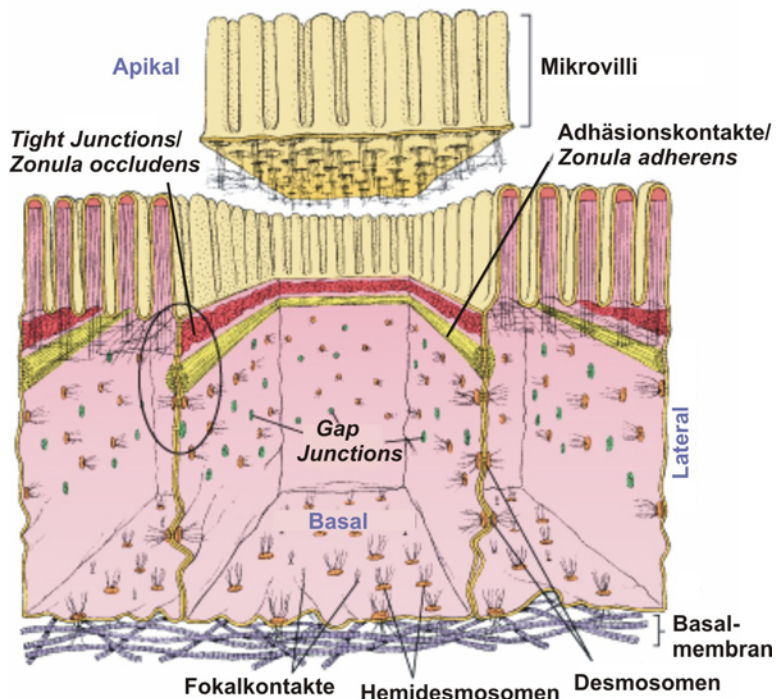
Darmepithelzellen verlassen den Epithelverband durch Apoptose oder Nekrose. Bei der Apoptose bleibt die Integrität des Epithelverbandes trotz Einzelzellverlustes erhalten. Bei der Nekrose tritt dagegen kurzzeitig ein Epitheldefekt auf (Mayhew et al., 1999). Apoptose dient dazu, alternde, beschädigte, redundante oder schädliche (z.B. infizierte) Zellen zu eliminieren (Kerr et al., 1972; Adams, 2003). Eine zelleigene Enzymkaskade wird durch unterschiedliche Faktoren aktiviert, was letztendlich zum Zelltod führt. Dabei schrumpft und verdichtet sich die Zelle. Ihr Zytoskelett bricht zusammen, die Kernhülle zerfällt und die Desoxyribonukleinsäure (DNA) wird in Stücke zerlegt. Die Familie der Caspasen spielt dabei eine Schlüsselrolle. Bei der Nekrose gehen Zellen durch äußere Einflüsse zugrunde. Histologisch beinhaltet der Begriff Nekrose Veränderungen, die erst mehrere Stunden nach dem Tod der Zelle entstehen und an denen der Zelltod erkennbar ist. Bei der Nekrose kommt es zur Kondensation der Kernsubstanz, zum Anschwellen der Zellorganellen und schließlich zum Zerfall der ganzen Zelle (Lyse) (Majno und Joris, 1995).

## 1.5 Die Enterozyten bzw. Darmepithelzellen

Die Darmepithelzellen sind für die Resorption hydrolysierter Nährstoffe verantwortlich und bedecken den größten Teil der Kryptenwand sowie der Villioberfläche. Ihre apikale Oberfläche ist dicht mit gleichartig geformten Mikrovilli besetzt, die die resorbierende Fläche um ein Vielfaches vergrößern. Aufgrund ihres Erscheinungsbilds wird der apikale Bereich der Darmepithelzellen auch als Bürstensaum bezeichnet (Welsch, 2005). Die Epithelzellen sind lateral über Zell-Zellkontakte verbunden. Der untere Bereich der Zellen wird als basale Domäne bezeichnet (Abbildung I-3).

Der Bürstensaum ist zum Schutz vor Zellschäden mit einer Schicht aus Glykoproteinen und Glykolipiden (Glykokalix) überzogen. Die Membran der Mikrovilli enthält spezifische Ektoenzyme (Transmembranproteine), deren extrazelluläre Domänen die Spaltung von Oligosacchariden und Oligopeptiden katalysieren. Zu diesen Hydrolasen gehören beispielsweise die Sucrase-Isomaltase, die Neutrale Aminopeptidase und die Alkalische Phosphatase. Neben den Enzymen sind verschiedene Transporter, die die enzymatischen Spaltprodukte sowie diverse Ionen in die Zelle einschleusen, in der apikalen Membran lokalisiert (Lüllmann-Rauch, 2003). Die Resorption von Stoffen verläuft im Dünndarmepithel para- und transzellulär. Im intermikrovillaren Bereich erfolgt die Endozytose. Sie dient zum einem der Resorption von Nahrungs-

bestandteilen und spielt zum anderen eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Zelloberflächenexpression sowie der Internalisierung von Rezeptoren. Zudem ist sie essenziell für die Ummodellierung der Plasmamembran und der Generierung der Zellpolarität (Hasson, 2003). Der am Besten untersuchte und vorherrschende Endozytoseweg in Säugerzellen ist die clathrinvermittelte Endozytose (Slepnev und De Camilli, 2000; Conner und Schmid, 2003).

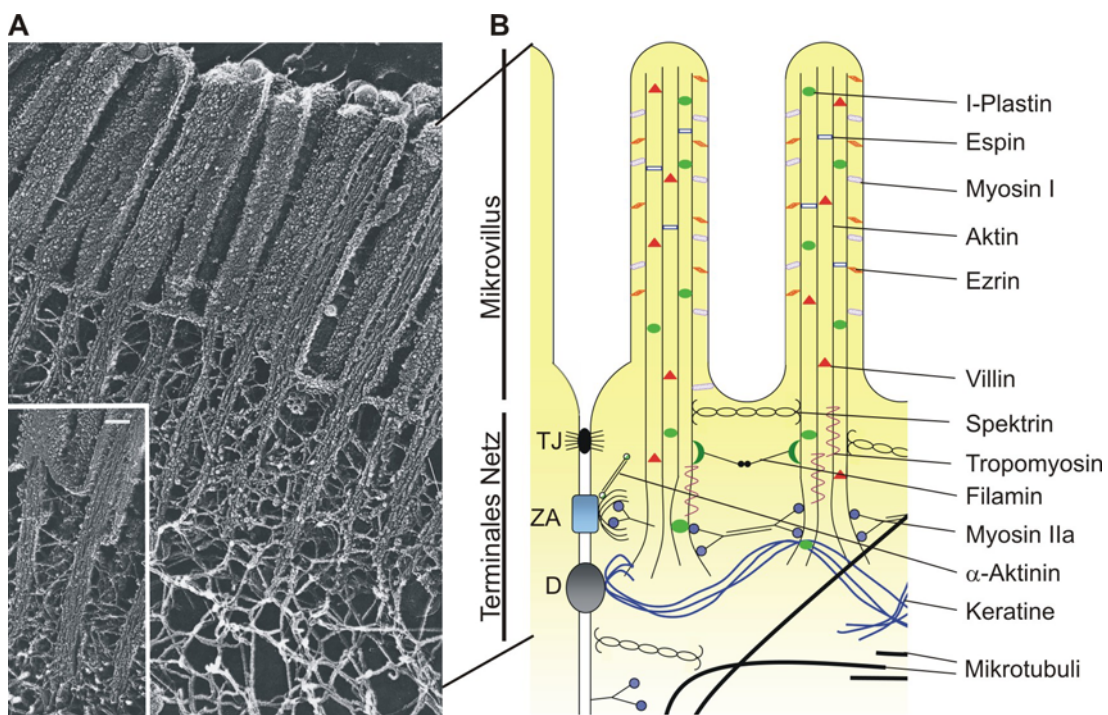


**Abbildung I-3: Aufbau der Epithelzellen im Dünndarm.** Die schematische Abbildung (entnommen aus Ross et al., 2003) zeigt die Verteilung der Zell-Zellkontakte in den drei zellulären Domänen von Epithelzellen. Die apikale Domäne mit den Mikrovilli wurde angehoben, um die räumliche Anordnung der Komplexe zu verdeutlichen. Zur vollständigen Übersicht sind Fokalkontakte und Hemidesmosomen, die das Aktinzytoskelett bzw. die Intermediärfilamente der Zellen mit der extrazellulären Matrix verknüpfen, auch eingezeichnet.

## Der Bürstensaum

Der Bürstensaum intestinaler Epithelzellen ist eine hochgeordnete, stabile Struktur, die aus zwei Domänen besteht, den Mikrovilli und dem terminalen Netz. Intestinale Mikrovilli sind zwischen 1 und 2  $\mu\text{m}$  lang und 0,1  $\mu\text{m}$  breit. Jeder Mikrovillus wird durch ein axiales Bündel von ungefähr 20 - 30 uniform polarisierten Aktinfilamenten unterstützt (Mooseker und Tilney, 1975). Die Struktur und die Zusammensetzung von dem Zytoskelett des Bürstensaums (Abbildung I-4) wurde von zahlreichen Laboren in unterschiedlichen Organismen bereits in den 80er Jahren intensiv untersucht. Die Aktinfilamente in den Mikrovilli werden durch I-Plastin (Fimbrin) (Bretscher und Weber, 1980), Villin (Bretscher und Weber, 1979) sowie von dem schwächer exprimierten Espin (kleine Spleißvariante) (Bartles et al., 1998) gebündelt. Die mikrovillaren Aktinfilamente sind über Myosine der Klasse I (Matsudaira und Burgess, 1982) und Ezrin (Bretscher, 1983) mit der Plasmamembran verknüpft. Die Aktinfilamente der

Mikrovilli erstrecken sich bis in das terminale Netz, wo sie als Aktinwurzel blind enden. Neben Villin (Drenckhahn et al., 1983) und I-Plastin (Drenckhahn und Dermietzel, 1988) enthält die Aktinwurzel hier Tropomyosin (Bretscher und Weber, 1978; Drenckhahn und Groschel-Stewart, 1980), Spektrin (Glenney und Glenney, 1983; Hirokawa et al., 1983), Filamin und Myosin IIa (Bretscher und Weber, 1978; Mooseker et al., 1978). Spektrin, Filamin und Myosin IIa verknüpfen die Aktinwurzeln miteinander und zusätzlich verankert Spektrin die Filamente mit der Membran (Hirokawa et al., 1983). Myosin IIa lokalisiert zudem an den Adhäsionskontakten und dem Aktingürtel (Keller et al., 1985).



**Abbildung I-4: Struktur und Zusammensetzung des intestinalen Bürstensaums.** **A:** Die elektronenmikroskopische Aufnahme mit Hilfe des Gefrierbruchsverfahrens zeigt die apikale Domäne einer resorbierenden Epithelzelle mit den Mikrovilli und dem terminalen Netz. Jede Zelle besitzt mehrere tausend dicht gepackter Mikrovilli (entnommen aus Hirokawa et al., 1982). Der Anteil von I-Plastin, Villin, Myosin Ia mit Calmodulin und Espin zu Aktin beträgt 0,65 : 1,3 : 0,8 : 0,1 : 10 (Coluccio und Bretscher, 1989; Bartles et al., 1998). **B:** Die schematische Abbildung zeigt die Lokalisation der Proteine im Bürstensaum. (TW: terminales Netz/*terminal web*; TJ: *Tight Junction*; ZA: Adhäsionskontakte/*Zonula adherens*; D: Desmosomen).

Weitere aktinbindende Proteine an den Adhäsionskontakten und ggf. an dem Aktingürtel sind unter anderem α-Aktinin (Craig und Pardo, 1979; Geiger et al., 1979) und Vinkulin (Geiger et al., 1981; Geiger et al., 1983; Drenckhahn und Franz, 1986). Somit befinden sich im terminalen Netz alle für eine Kontraktion notwendigen Proteine. Das terminale Netz besitzt nicht nur eine stabilisierende Struktur sondern auch eine bewegende Funktion. Mittels *in vitro* Studien wurde gezeigt, dass eine Kontraktion des



Bürstensaums im terminalen Netz in Höhe der Adhäsionsverbindungen durch Zugabe von ATP ausgelöst werden kann (Keller und Mooseker, 1982). Es wird vermutet, dass diese Kontraktion *in vivo* die Resorptionsfläche erhöht bzw. Lücken schließt, die sich im Epithel durch alternde oder sterbende Zellen bilden (Ross et al., 2003).

Die Zell-Zellkontakte sind auch auf Höhe des terminalen Netzes zu finden (Franke et al., 1979; Madara, 1987; Madara, 1989). Dabei unterscheidet man zwischen drei Typen, den undurchlässigen Verbindungen (*Tight Junctions* oder *Zonula occludens*; Nusrat et al., 2000; Van Itallie und Anderson, 2004), den Haft- bzw. Ankerverbindungen (Adhäsionskontakte oder *Zonula adherens* und Desmosomen; Yin und Green, 2004; Erez et al., 2005) und den kommunizierenden Verbindungen (*Gap Junctions*; Giepmans, 2004; Abbildung I-3). Die *Tight Junctions* und die Adhäsionskontakte sind über Adapterproteine mit dem Aktinzytoskelett verbunden (Aberle et al., 1994; Rimm et al., 1995; Kobiela und Fuchs, 2004; Kapus und Szaszi, 2006). Desmosomen sind dagegen mit dem Keratinnetzwerk, das in das terminale Netz hineinreicht, verknüpft (Ross et al., 2003; Alberts et al., 2004). Diese Intermediärfilamente werden aus Typ I und II Keratinen gebildet.

Zusätzlich reichen Bereiche des Mikrotubulinnetzwerks in das terminale Netz hinein (Sandoz et al., 1986; Hagen et al., 1987). Mikrotubuli sind asymmetrische Strukturen mit einem Plus- und Minusende (Wade und Hyman, 1997). Sie sind in Darmepithelzellen im gesamten Zytoplasma in parallelen Strukturen verteilt, wobei das Minusende in der submembranalen apikalen Region liegt (Bacallao et al., 1989; Mogensen et al., 1989; Oriolo et al., 2007b) und sich das Plusende oberhalb des Zellkerns befindet (Oriolo et al., 2007b). Es wird angenommen, dass Mikrotubuli generell als „Bahnen“ für den polarisierten Transport dienen (Musch, 2004).

## 2 Das Aktinzytoskelett der intestinalen Epithelzellen

Aktin ist das am weitesten verbreitete Protein, das viele verschiedene strukturelle und regulatorische Funktionen besitzt (Delanote et al., 2005). In Säugern sind die drei Isoformen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aktin des hochkonservierten, ubiquitär exprimierten Proteins bekannt, die von unterschiedlichen Genen kodiert werden. Während  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aktine in nahezu allen Nichtmuskelzellen exprimiert werden, kommt  $\alpha$ -Aktin nur in Muskelzellen vor (Vandekerckhove und Weber, 1978; Hofer et al., 1997; Alberts et al., 2004).

Aktinmonomere (G-Aktin) liegen hauptsächlich im Zytosol vor. Sie polymerisieren unter bestimmten Bedingungen zu Filamenten (F-Aktin). Bei den Aktinfilamenten handelt es sich um polarisierte, dynamische Strukturen, die ein schnell wachsendes Plus- und ein langsam wachsendes Minusende besitzen (Goode und Eck, 2007). Wie in anderen nicht muskulären Zellen ist F-Aktin in einfachen Epithelien in der apikalen Domäne konzentriert, in geringeren Mengen ist es auch basolateral und zytoplasmatisch zu finden (Hofer et al., 1998). Die Organisation des Aktinzytoskeletts wird durch aktinbindende Proteine kontrolliert (Delanote et al., 2005; Pak et al., 2008), die in unterschiedliche Gruppen unterteilt werden. So gibt es Proteine die mit G-Aktin assoziieren (z.B. Cofilin, Profilin), Plusenden von F-Aktin bedecken (*capping*; z.B. CapZ, Gelsolin), Aktinfilamente quervernetzen und bündeln (z.B. Plastin/Fimbrin,  $\alpha$ -Aktinin, Spektrin, Dystrophin), Motorproteine (z.B. Myosine) oder membranverankernde Proteine (z.B. Vinkulin, Ezrin). Nachfolgend werden nur solche Proteine ausführlicher beschrieben, die im Bürstensaum lokalisieren.

## 2.1 Aktinbündelnde Proteine

### 2.1.1 Plastin/Fimbrin

Plastine (auch Fimbrine genannt) sind von niedrigen Eukaryonten bis hin zum Menschen konservierte aktinbündelnde Proteine mit einem modularen Aufbau. N-terminal weisen sie zwei kalziumbindende Domänen, sogenannte EF-Hände, auf. Aufgrund der geringen Homologie in dieser Region werden die Isoformen unterschiedlich stark durch Kalzium reguliert (Delanote et al., 2005). Des Weiteren besitzen sie zwei aktinbindende Domänen (ABD), die jeweils aus einer Zwillingsanordnung von Calponin-Homologie (CH)-Domänen bestehen, so dass sie als Monomer Aktinfilamente bündeln können (Abbildung I-5). Die CH-Domäne ist aus etwa 100 Aminosäuren aufgebaut, die sich in vier  $\alpha$ -helikalen Segmenten kugelförmig falten (Korenbaum und Rivero, 2002; Delanote et al., 2005).

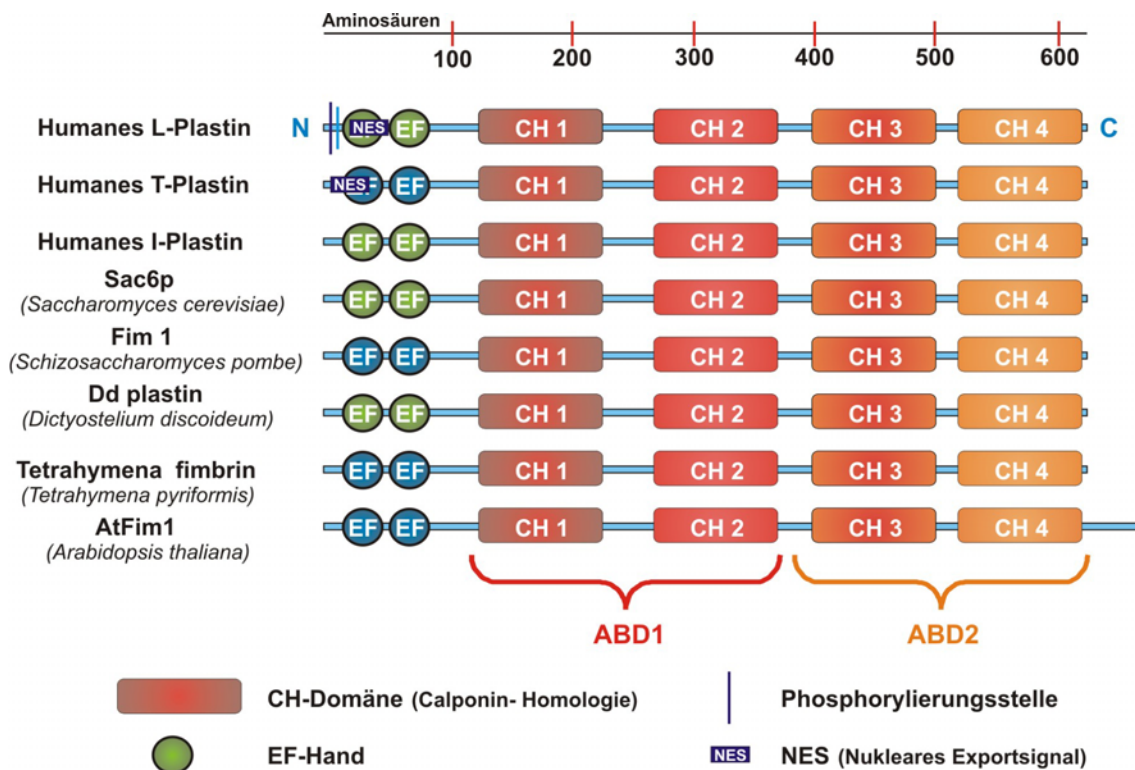
In Vertebraten werden drei verschiedene Mitglieder der Plastinfamilie (L-, T- und I-Plastin) gewebespezifisch exprimiert und besitzen unterschiedliche Funktionen. Sie weisen eine Aminosäuresequenzhomologie von 70 % auf, werden aber von drei unterschiedlichen Genen auf unterschiedlichen Chromosomen codiert (in der Maus Chromosom 14, X bzw. 9) (Lin et al., 1988; Lin et al., 1993b; Lin et al., 1994). Im Allgemeinen kommen Plastine an Fokalkontakten, Lammellipodien, Filopodien oder spezialisierten Membranausstülpungen mit hochgeordneten Mikrofilamentbündeln wie

in Mikrovilli und Stereozilien vor. Während der Differenzierung des Darmepithels in Mäusen werden alle drei Plastinproteine zellspezifisch exprimiert (Chafel et al., 1995) (siehe Abschnitt 4). Überexpressionsstudien von T-Plastin in Zellen zeigen, dass es, im Gegensatz zu Villin, keinen Einfluss auf die Mikrovillillänge hat (Friederich et al., 1990; Arpin et al., 1994). Die Überexpression sowohl von T- als auch von L-Plastin hat zwar keinen Einfluss auf das kortikale Aktin, aber es induziert eine Zellabrundung verbunden mit der Umstrukturierung von Aktinstressfasern (Arpin et al., 1994).

**L-Plastin** wird in hämatopoetischen Zellen wie beispielsweise Lymphozyten exprimiert, kann aber auch in Tumorzellen nicht hämatopoetischen Ursprungs nachgewiesen werden (Goldstein et al., 1985; Lin et al., 1988). Es wird negativ durch die Anwesenheit von Kalzium (Namba et al., 1992), Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) und im geringeren Ausmaß durch Phosphatidylinositol reguliert (Lebart et al., 2004). L-Plastin ist bisher als einziges Mitglied beschrieben worden, das *in vitro* und *in vivo* phosphoryliert wird (Shinomiya et al., 1995; Lin et al., 1998; Wang und Brown, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung an einem Serinrest (Ser5) die Bündelungsaktivität in Zellen und *in vitro* erhöht (Janji et al., 2006). Die Phosphorylierung ist sowohl zelltyp- als auch signalabhängig und soll die Interaktion zwischen den Plastinproteinen und anderen Proteinen beeinflussen. Analysen einer L-Plastin defizienten Mauslinie zeigen, dass L-Plastin eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Adhäsion von Integrin spielt. Es wird vermutet, dass seine aktinbündelnde Aktivität für die Assemblierung der Integrin initiierten Tyrosinkinasekaskade notwendig ist (Chen et al., 2003a).

**T-Plastin** wird in Epithelzellen, Endothelzellen und in mesenchymalen Zellen exprimiert (Bretscher und Weber, 1980; Daudet und Lebart, 2002). In Mesenchymzellen lokalisiert T-Plastin an Fokalkontakten und dem *leading edge* (Arpin et al., 1994). Im Gegensatz zu I- und L-Plastin wird T-Plastin nicht durch Kalzium reguliert (Giganti et al., 2005). Des Weiteren ist für T-Plastin bekannt, dass es - unabhängig von seiner Funktion als bündelndes Protein - F-Aktin stabilisiert (Giganti et al., 2005).

**I-Plastin** ist ein 68 kDa Polypeptid, das in Bürstensäumen von Dünndarm, Dickdarm und Niere vorkommt und eine 86 %ige Homologie zum Fimbrin in Hühnern aufweist (Bretscher und Weber, 1980; Lin et al., 1993b; Lin et al., 1994). Im Gegensatz zu den anderen beiden Isoformen existieren wenige Studien über seine Funktion. Es ist aber bekannt, dass die Bündelungsaktivität von I-Plastin in Gegenwart von Kalzium inhibiert ist (Lin et al., 1994).

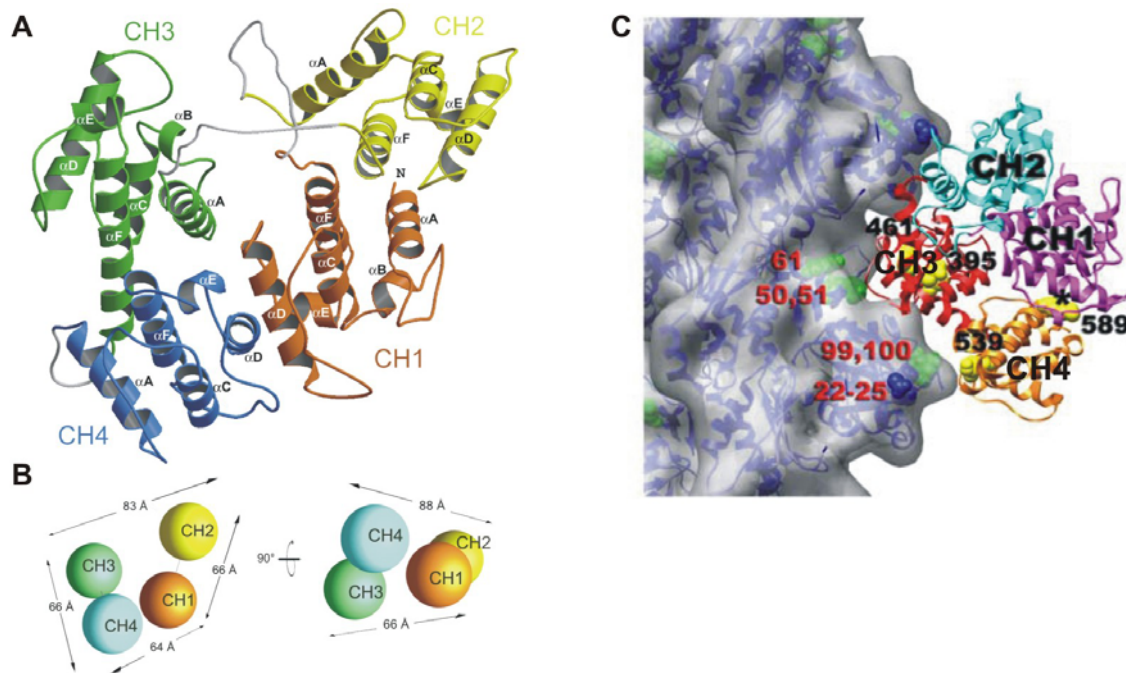


**Abbildung I-5: Organisation der Domänen von Plastinproteinen verschiedener Spezies.** Ein Maßstab ist oberhalb der Abb. in Aminosäuren angegeben. In blau dargestellte Domänen haben keine oder nur geringe Funktionalität. ABD: Aktinbindende Domäne (bestehend aus zwei CH-Domänen). Humanes T- und L-Plastin besitzen ein Kernexportsignal (NES), aber es ist nicht bekannt, ob Plastine von anderen Spezies ebenfalls ein solches Motiv aufweisen (Abb. entnommen aus Delanote et al., 2005).

## Die Struktur von Plastin/Fimbrin

Volkman et al. postulieren mit ihrem Strukturmodell von Aktin/Plastin-Bündeln, dass ABD2 auf die gleiche Art und Weise mit Aktinfilamenten interagiert (Volkman et al., 2001), wie es für ABD1 beobachtet worden ist (Hanein et al., 1998). Biochemische Studien und neuere hochauflösende kryoelektronenmikroskopische Strukturaufnahmen lassen vermuten, dass die beiden ABD von Plastin unterschiedlich mit Aktin interagieren (Lebart et al., 2004; Galkin et al., 2008). Die Kristallstruktur des Kerns von Plastin in *A. thaliana* weist eine kompakte Organisation auf, bei der die CH1-Domäne von ABD1 in räumlicher Nähe zur CH4-Domäne von ABD2 liegt (Abbildung I-6). Es wird vermutet, dass diese Organisation in der Plastinfamilie universell und biologisch relevant ist (Klein et al., 2004). Dies wird durch neuere Studien von der Struktur des F-Aktin/Plastin-ABD2-Komplexes gestützt. Im aktuellen Modell wird angenommen, dass ABD2 an F-Aktin bindet und dadurch ABD1 über eine Konformationsänderung „aktiviert“ wird, so dass es Filamente mit höherer Affinität bindet (Galkin et al., 2008).

Diese strukturelle Plastizität der ABD1 durch Reorganisation der CH-Domänen wird durch andere Kristallstrukturen wie von Utrophin, Dystrophin, Plektin und  $\alpha$ -Aktinin bestätigt (Keep et al., 1999; Norwood et al., 2000; Garcia-Alvarez et al., 2003; Liu et al., 2004).



**Abbildung I-6: Die Struktur des F-Aktin/Plastin-Komplexes. A-B: Kristallstruktur des Plastinkerns von *A. thaliana*.** **A:** Bänderartige Darstellung des Kerns. Die Verbindungen der Domänen untereinander, die möglicherweise hoch dynamisch sind und daher nicht durch die Elektronendichte repräsentiert wurden, sind in grau dargestellt. **B:** Schematisches Diagramm des Plastinkerns. Die dichte Anordnung der ABDs besteht zwischen der N-terminalen CH1 in ABD1 und der C-terminalen CH4 in ABD2. (Abb. entnommen aus Klein et al., 2004)). **C:** Atomares Modell der F-Aktin/Plastin-Interaktion. Grüne Bereiche stellen Aktinreste (in rot nummeriert) dar, die mit Plastin interagieren. Wichtige ABD2 Reste (schwarz nummeriert) für die Wechselwirkung mit F-Aktin sind in gelb dargestellt. Die Kristallstruktur des Plastinkerns aus A bzw. B wurde mit dem atomaren Modell überlagert. (Abb. entnommen aus Galkin et al., 2008)

### 2.1.2 Villin

Bei Villin handelt es sich um ein gewebespezifisches aktinbindendes Protein, das im Bürstensaum von Darmepithelzellen, in der Leber und Niere exprimiert wird. Es gehört zu der Gelsolinfamilie (Athman et al., 2002). Die Mitglieder dieser Familie besitzen drei bis sechs homologe, hochkonservierte Domänen. Villin besitzt sechs dieser Domänen – sie werden auch zusammen als Kerndomäne oder *core domain* bezeichnet – und zusätzlich ein sogenanntes C-terminales Kopfstück (*headpiece*) (Friederich et al., 1990). Es ist zudem einzigartig in dieser Familie, da Villin als einziges Mitglied

Aktinfilamente bündeln, fragmentieren und Plusenden bedecken, sowie mit G-Aktin assoziieren kann. Dies ist möglich, da Villin zwei F-Aktinbindestellen besitzt, von denen eine kalziumabhängig ist und sich in der Kerndomäne befindet (de Arruda et al., 1992). Die zweite Bindestelle ist kalziumunabhängig und sitzt im C-terminalen Kopfstück (Friederich et al., 1992; Vermeulen et al., 2004; Meng et al., 2005). Sie ist, zusammen mit der Aktinbindestelle aus der Kerndomäne, für die Fähigkeit, Aktinfilamente zu bündeln, essenziell und spielt keine Rolle bei der Aktinpolymerisierung (Kreis und Vale, 1999). Neuere Studien zeigen allerdings, dass Villin zu einem Dimer assoziiert und dadurch auch nur mit der Aktinbindestelle im Kopfstück F-Aktin bündeln kann (George et al., 2007; Khurana und George, 2008). In der Kerndomäne liegen zudem G-Aktinbindestellen, die für die Aktinzytoskelett Regulierung wichtig sind (Khurana und George, 2008). Die Funktion von Villin wird zusätzlich durch Phosphorylierung und PIP<sub>2</sub> beeinflusst (Janmey und Stossel, 1987; Khurana et al., 1997; Khurana, 2000; Zhai et al., 2001). *In vitro* Studien postulierten eine führende Rolle von Villin bei der Assemblierung der Mikrovilli (Friederich et al., 1990; Friederich et al., 1992; Costa de Beauregard et al., 1995), während der Verlust von Villin in der Maus zu keinen größeren Veränderungen in der Ultrastruktur der Mikrovilli oder in der Lokalisation von anderen aktinbindenden- bzw. von Membranproteinen führt (Pinson et al., 1998; Ferrary et al., 1999; Athman et al., 2002). Villin spielt vielmehr eine Rolle in der Wundheilung und bei der Geschwindigkeit einer Infektion mit Shigellen (Ferrary et al., 1999; Athman et al., 2005). Es wird daher vermutet, dass neben der aktinbündelnden Rolle von Villin in intestinalen Epithelzellen vor allem die Fähigkeit Aktinfilamente aufzulösen eine größere Bedeutung in diesen Situationen spielt (Revenu et al., 2007). Es wird zudem in neueren Studien angenommen, dass es sich bei Villin um ein anti-apoptotisches Protein handelt (Wang et al., 2008).

### 2.1.3 Espin

Espine lokalisieren an zahlreichen Ausstülpungen, die durch parallele Aktinbündel wie Mikrovilli und Stereozilien gestützt werden (Zheng et al., 2000; Sekerkova et al., 2004; Sekerkova et al., 2005; Sekerkova et al., 2006b). Es existieren viele Espinisoformen (28-110 kDa), die von einem einzelnen Gen kodiert werden. Sie verfügen über ein C-terminales, aktinbindendes Modul sowie eine Wiskott-Aldrich-Syndrom-Proteinhomologiedomäne 2 (WH2) (Sekerkova et al., 2006b). Die kleinere Espinisoform (~ 30 kDa) ist in den Mikrovilli der intestinalen Epithelzellen und dem proximalen Nierentubuli zwar gering exprimiert, aber es bindet mit hoher Affinität an F-Aktin und bündelt es (Bartles et al., 1996; Bartles et al., 1998). Espin ist im Gegensatz zu den

anderen aktinbündelnden Proteinen im Bürstensaum nicht durch Kalzium reguliert (Bartles et al., 1998; Sekerkova et al., 2004). *In vitro* Studien mit Epithelzellen zeigen für Espin eine konzentrationsabhängige Verlängerung von Aktinfilamenten (Loomis et al., 2003; Sekerkova et al., 2004). Mäuse mit einer Mutation in Espin (*deaf jerker mouse*; Deletion eines Glycinrestes in der Domäne, die für die aktinbündelnde Funktion essenziell ist und alle Isoformen betrifft) zeigen verkürzte Stereozilien der Sinneszellen im Ohr und sind nicht in der Lage zu hören (Zheng et al., 2000). Die Mäuse sind jedoch lebensfähig, und Untersuchungen des Darms zeigen keine morphologischen Veränderungen (persönliche Mitteilung von S. Robine).

## 2.2 Andere aktinbindende Proteine des Bürstensaums

### 2.2.1 Tropomyosin

In Säugern kodieren vier Gene ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ ) für Tropomyosine und durch alternatives Spleißen existieren zahlreiche Isoformen (Pittenger et al., 1994). Historisch werden Tropomyosine in hoch- und niedermolekulargewichtige Klassen unterteilt. In Epithelzellen kommen Vertreter beider Klassen vor, die von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Genen kodiert werden (Dalby-Payne et al., 2003). Die Isoformen dieser Gene weisen eine polarisierte Verteilung auf (Percival et al., 2000).  $\alpha$ -Tropomyosine 5a und 5b lokalisieren zusammen mit  $\gamma$ -Tropomyosinen apikal in intestinalen Epithelzellen (Dalby-Payne et al., 2003). Sie bilden alle helikale und stabförmige *coiled-coil* Dimere, die sich in Kopf-zu-Schwanz-Orientierung als Polymere der Länge nach an den Aktinfilamenten anlagern (Phillips et al., 1979; Lin et al., 1997). Sie nehmen eine regulierende Rolle bei vielen Aktinfunktionen, wie in der Stabilisierung von F-Aktin oder der Kontraktion im Muskel, ein (Greaser und Gergely, 1971; Cooper, 2002). Die Rolle von Tropomyosinen in nicht muskulären Zellen ist noch nicht vollständig geklärt (Gunning et al., 2005). Mit Hilfe von *antisense*-RNA-Experimenten ist gezeigt worden, dass die apikale Lokalisation Auswirkungen auf den Einbau des Chloridkanals CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) in die Membran und somit auf die Polarisierung von Epithelzellen hat (Dalby-Payne et al., 2003). Ob auch Veränderungen in den Bürstensäumen auftreten ist bisher nicht untersucht worden.

Weitere *in vitro* Analysen zeigen, dass nicht muskuläre Tropomyosine mit Platin und Villin um die Bindung an F-Aktin konkurrieren und die aktinbündelnde Funktion von Villin durch Tropomyosin inhibiert wird (Burgess et al., 1987). Sowohl die Defizienz von allen  $\alpha$ - als auch die von allen  $\gamma$ -Tropomyosinen ist embryonal letal (Rethinasamy et al., 1998; Hook et al., 2004).

### 2.2.2 Ezrin

Ezrin ist ein Mitglied der Ezrin-Radixin-Moesin (ERM)-Familie und ist nur innerhalb der Mikrovilli nicht aber in der Aktinwurzel oder im terminalen Netz lokalisiert (Berryman et al., 1993). Es verbindet die Filamente mit der Membran entweder direkt (Martin et al., 2003) oder indirekt über Proteine, die zwei PDZ-Domänen aufweisen (z.B. EBP50; ERM bindendes Phosphoprotein von 50 kD; Bretscher et al., 2000). Ezrin wird in einer inaktiven Konfiguration synthetisiert, bei der die N-terminale Domäne (N-ERMAND) mit der C-terminalen Domäne (C-ERMAND) interagiert und auf diese Weise die Interaktion mit anderen Proteinen inhibiert (Bretscher, 1999). Durch Phosphorylierung oder Interaktion mit PIP<sub>2</sub> öffnet sich die Konfiguration, was als aktives Ezrin bezeichnet wird. Freies C-ERMAND bindet an Aktin, während N-ERMAND mit Membranproteinen oder anderen Proteinen interagiert (Fievet et al., 2004). Ezrin ist das am besten untersuchte Protein im Bürstensaum. Es weist allerdings auch ein breites Spektrum an Funktionen auf. So ist es beispielsweise strukturell von Bedeutung aber auch in die Signalübertragung involviert. Für Ezrin ist beschrieben worden, dass eine Überexpression der N-terminalen Domäne zu einer reduzierten Anzahl von Mikrovilli in Nierenzellen führt (Crepaldi et al., 1997). In Epithelzellen aus der Maus führte der *knockdown* von ERM-Proteinen zu einem Verlust der Zell-Zell- und Zell-Substratadhäsion sowie von Mikrovilli (Takeuchi et al., 1994). Ezrin defiziente Mäuse sterben als Neugeborene nach der Entwöhnung von der Muttermilch. Obwohl die Morphologie ihrer Villi anomal ist, sind die Epithelzellen polarisiert und besitzen Mikrovilli. Die Mikrovilli sind aber verdickt, fehlorientiert und nicht mehr uniform (Saotome et al., 2004).

### 2.2.3 Myosine

Myosine sind Motorproteine, die aus ATP-Hydrolyse gewonnene Energie nutzen, um an polaren Aktinfilamenten entlangzugleiten. Die meisten schweren Ketten von Myosinen sind aus drei Regionen aufgebaut: a) Der Kopfregion oder Motordomäne, die ATP bindet und hydrolysiert sowie sich an F-Aktin anlagert; b) Der Gelenkregion



(*neck*), die als Bindungsstelle für leichte Ketten dient; und c) dem C-terminalen Schwanz, der die Fracht bindet und/oder für die Dimerisierung der schweren Ketten verantwortlich ist (Krendel und Mooseker, 2005). Mehrere Studien zeigen, dass die Schwanzdomäne wichtig für die Funktion der Myosine ist (Krendel und Mooseker, 2005).

Im Bürstensaum von Darmepithelzellen werden viele unterschiedliche Klassen von Myosinen exprimiert und es lokalisieren dort auch viele Mitglieder jeder Klasse (Bement und Mooseker, 1996). Myosine der Klasse I sind monomere Motoren, die mit der Membran assoziieren und keine Filamente ausbilden (Coluccio, 1997).

**Myosin Ia** - früher als Bürstensaum Myosin-I, BBMI bezeichnet - bildet eine hochgeordnete Anordnung von Brückenverbindungen aus, die Aktinfilamente in den Mikrovilli mit der Membran verknüpfen (Matsudaira und Burgess, 1979; Coluccio und Bretscher, 1987). Es besteht aus einer einzelnen schweren Kette und vier bis fünf leichten Ketten aus Calmodulin. Es ist damit ein wichtiger Kalziumpuffer innerhalb der Mikrovilli des Bürstensaums, wo Kalzium resorbiert wird (Krendel und Mooseker, 2005). Myosin Ia defiziente Mäuse zeigen geringe Defekte in der Organisation und Komposition des Bürstensaums. Der milde Phänotyp wird auf die funktionelle Redundanz der Myosin I-Klasse in Vertebraten zurückgeführt. Der Verlust von Myosin Ia wird durch Myosin Ic kompensiert, das normalerweise nicht im Bürstensaum lokalisiert ist (Tyska et al., 2005). Der C-terminale Schwanz von Myosin Ia interagiert mit der zytoplasmatischen Domäne der Sucrase-Isomaltase. Die Lokalisation dieser Disaccharidase ist von der Interaktion des Myosins mit dem *Lipid-Raft* assoziierten Enzym abhängig (Tyska und Mooseker, 2004; Tyska et al., 2005). *In vitro* Studien zeigen, dass Myosin Ia für die Translation der apikalen Membran entlang der mikrovillären Aktinfilamente in Richtung Plusende verantwortlich ist. *In vivo* soll dies die Effizienz der Nahrungsaufnahme steigern (McConnell und Tyska, 2007).

Als Vertreter der konventionellen Myosine wird in den Darmepithelzellen nicht muskuläres **Myosin II** exprimiert. Diese Klasse ist aus zwei schweren und jeweils zwei essenziellen bzw. regulatorischen leichten Ketten aufgebaut (Shohet et al., 1989; Landsverk und Epstein, 2005). In Vertebraten bilden sie kurze bipolare Filamente und werden durch Myosin IIa (Kovacs et al., 2003) und Myosin IIb (Rosenfeld et al., 2003; Wang et al., 2003) repräsentiert. Myosin IIa und IIb besitzen unterschiedliche ATPase-Aktivitäten, Kontraktionsraten und subzelluläre Lokalisationen, so dass sie verschiedene Funktionen bei der Regulierung des Aktinzytoskeletts haben (Kolega, 1998; Bridgman et al., 2001; Wylie und Chantler, 2003; Lo et al., 2004; Betapudi et al., 2006; Cai et al., 2006; Vicente-Manzanares et al., 2007).

Zusätzlich zu den kontraktile Eigenschaften kann Myosin IIa durch Ausbildung bipolarer Filamente F-Aktin quervernetzen und stabilisiert es somit (Siddique et al., 2005).

Auch Myosin V und **Myosin VI** lokalisieren im Bürstensaum von intestinalen Epithelzellen (Heintzelman et al., 1994). Beide sind in den vesikulären Transport und in die Membrandynamik involviert. Myosin VI ist, im Gegensatz zu den anderen hier erwähnten Myosinen, ein Motorprotein, das in Richtung Minusende an den Aktinfilamenten entlanggleitet (Schliwa, 1999; Wells et al., 1999). Für Myosin VI konnte *in vivo* gezeigt werden, dass es für die Internalisierung von CFTR in Darmepithelzellen essenziell ist (Ameen und Apodaca, 2007).

Dass noch nicht alle Myosine im Bürstensaum bekannt sind, zeigt die kürzliche Entdeckung von Myosin Id mit Hilfe der Massenspektroskopie. Es ist an der Spitze der Mikrovilli angereichert (Benesh et al., 2007).

## 2.2.4 Quervernetzende Proteine

Im Bürstensaum von Epithelzellen existieren Vertreter der Spektrin-,  $\alpha$ -Aktinin- und der Filaminfamilie. Ihre ABD besteht wie bei der Plastinfamilie aus einer Zwillingsanordnung der CH-Domänen. Durch Dimerisierung sind sie in der Lage, Aktinfilamente quervernetzen.

**Spektrine** sind heterodimere Proteine, die aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit aufgebaut sind (Coleman et al., 1989b). Mitglieder dieser Familie besitzen Spektrinwiederholungen (*Spektrin-Repeats*), aktinbindende Domänen und EF-Hände. Die meisten nicht erythroiden Gewebe haben gemeinsame  $\alpha$ -Spektrine, die sich vom erythroiden  $\alpha$ -Spektrin unterscheiden. Ihre  $\beta$ -Spektrine sind jedoch unterschiedlich (Glenney et al., 1982b; Glenney und Glenney, 1983). Am weitesten verbreitet ist  $\alpha$ -II-Spektrin (Winkelmann und Forget, 1993). Es ist in intestinalen Epithelzellen sowohl an den Zell-Zellkontakten als auch im terminalen Netz lokalisiert. Die Heterodimere assoziieren antiparallel zu filamentösen Tetrameren (Kopf-zu-Schwanz-Anordnung) (Coleman et al., 1989a) und vernetzen so Aktinfilamente miteinander. Sie können mit verschiedenen Proteinen interagieren und sorgen u.a. für mechanische Stabilität. Sie besitzen allerdings auch noch viele weitere zelluläre Funktionen (De Matteis und Morrow, 2000; Bennett und Baines, 2001). In *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass Spektrin im Bürstensaum für das Recycling durch frühe Endosomen notwendig ist (Phillips und Thomas, 2006).

**$\alpha$ -Aktinine** bilden antiparallele Homodimere, die Aktinfilamente quervernetzen oder bündeln (Kreis und Vale, 1999). Jedes Monomer besitzt N-terminal zwei CH-Domänen, gefolgt von vier Spektrinwiederholungen und einer Calmodulin ähnlichen Domäne aus zwei EF-Hand-Motiven (Otey und Carpen, 2004). Nicht muskuläres  $\alpha$ -Aktinin ist in Darmepithelzellen an den Adhäsionskontakten lokalisiert, wo es neben Aktin mit verschiedenen Proteinen wie beispielsweise  $\alpha$ -Catenin interagiert (Craig und Pardo, 1979; Otey und Carpen, 2004).

**Filamine** bilden flexible Homodimere, die, abhängig von dem relativen Aktin/Filamin-Anteil, entweder orthogonale Netzwerke oder parallele Aktinfilamentbündel erzeugen (Tseng et al., 2004). Beim Menschen sind drei Filaminisogene bekannt: Filamin-A, -B und -C. Filamin-A und -B sind weit verbreitet, während Filamin-C vorwiegend im Muskel exprimiert wird (Stossel et al., 2001; van der Flier und Sonnenberg, 2001). Filamin-A (früher auch als nicht muskuläres Filamin bezeichnet) wird u.a. im Darm exprimiert. Im terminalen Netz der Epithelzellen quervernetzt es die Aktinwurzeln und verknüpft das Aktinzytoskelett zudem über Interaktionen mit integralen Membranproteinen mit der Plasmamembran (Stossel et al., 2001; Tosco et al., 2005). Filamine besitzen neben der ABD eine stabförmige Domäne, die aus 24 Wiederholungen aufgebaut ist und für die Dimerisierung mit Hilfe der letzten Wiederholung verantwortlich ist (Fucini et al., 1997).

### 3 Keratinfilamente

Die Intermediärfilamente im intestinalen Epithel liegen als dicke Schicht unmittelbar unterhalb und zum Teil in das terminale Netz hineinreichend vor (Franke et al., 1979; Quaroni et al., 1991; Fath et al., 1993). Dünne, isolierte Bündel von Keratinfilamenten befinden sich im oberen Bereich der lateralen Domäne, wo sie mit den Desmosomen verknüpft sind (Kottke et al., 2006; Oriolo et al., 2007b). Die apikale Lokalisation der Keratine ist evolutionär konserviert, wie man im Darm von *C. elegans* beobachten kann (Van Furden et al., 2004), wobei die molekulare Basis dieser Lokalisation im Epithel bisher unbekannt ist. Allerdings ist klar, dass im Gegensatz zu den Intermediärfilamenten in Keratinozyten die Filamente hier nicht abhängig von den Mikrotubuli sind (Oriolo et al., 2007b).

Keratine bilden Heterodimere aus einem Typ I und einem Typ II Keratin. In Darmepithelzellen sind die gebräuchlichsten Keratine des Typs I Keratin 18 bzw. 19 und bei Typ II ist Keratin 8 am weitesten verbreitet (Moll et al., 1982). Die subzelluläre Lokalisation von Keratin 8/18 ist geringfügig anders als die von Keratin 8/19. Die

erstgenannten sind weniger polarisiert und vorwiegend an der lateralen Domäne zu finden (Toivola et al., 2000). Die Keratinfilamente aus Keratin 8/19 liegen dagegen polarisiert an der apikalen Domäne in intestinalen Epithelzellen vor (Oriolo et al., 2007a). Zusätzlich zu diesen Keratinen wird noch Keratin 20 vom Typ I exprimiert, was zu mildereren Phänotypen in Typ I *knockout*-Modellen führen kann.

Verschiedene Gruppen haben gezeigt, dass Keratin 8 defiziente Mäuse eine verringerte Expression apikaler Proteine, wie beispielsweise Sucrase-Isomaltase und alkalischer Phosphatase in der Membran aufweisen (Ameen et al., 2001; Toivola et al., 2004). Obwohl ein Phänotyp offensichtlich ist, fehlen die zugrunde liegenden mechanistischen Erklärungen. Es gibt Hinweise, dass Mutationen im Keratin 8 zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen führen (Owens et al., 2004), während eine Verbindung von Keratin 19 und 20 zu Erkrankungen bisher nicht bekannt ist. Keratin 8 Mutationen führen zu einer gestörten Polarisierung und/oder zu mechanischer Instabilität, mit dem Effekt, dass mehr Darmflora mit dem Immunsystem in Kontakt kommt (Owens und Lane, 2004). Diese *in vivo* Studien zusammen mit *in vitro* Studien (Salas et al., 1997) zeigen, dass Keratine im einschichtigen Epithel wichtig für eine normale Polarität und die epitheliale Funktion sind.

Die Reduzierung von Keratin 19 in verschiedenen Zelllinien resultiert in einer verringerten Anzahl von Mikrovilli, apikaler Fehlorganisationen, Veränderungen in den apikalen Mikrotubuli sowie Verarmung oder Umverteilung von apikalen Membranproteinen (Salas et al., 1997). Dagegen zeigen Keratin 19 defiziente Mäuse in Epithelzellen des Darms und der Niere keinen Phänotyp, allerdings fehlen ultrastrukturelle Untersuchungen (Tamai et al., 2000).

## 4 Assemblierung des intestinalen Bürstensaums

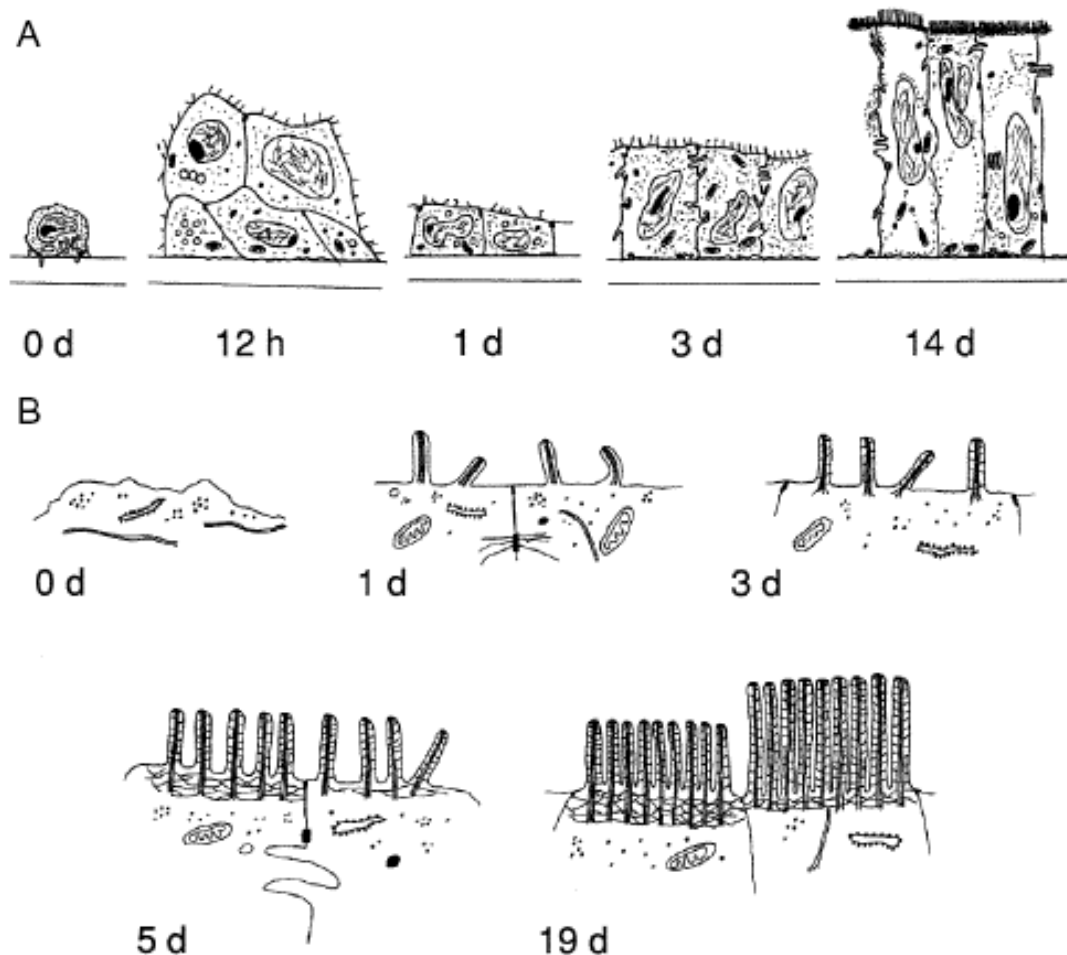
Die Assemblierung des Bürstensaums im Darm ist durch Studien an der Differenzierung des Darmepithels während der **Embryogenese** untersucht worden. Dabei zeigen elektronenmikroskopische Untersuchungen im Darm von Hühnern, Nagern und Menschen, dass sie eine gemeinsame Basis in der Reihenfolge der morphologischen Ereignisse besitzen. Der große Unterschied besteht nur in der Geschwindigkeit, mit der diese Schritte eintreten (Kelley, 1973; Mathan et al., 1976; Chambers und Grey, 1979; Moxey und Trier, 1979; Ezzell et al., 1989; Heintzelman und Mooseker, 1990). Der gemeinsame Ablauf ist wie folgt: nachdem sich das polarisierte Epithel gebildet hat, treten kurze ungeordnete Mikrovilli zum ersten Mal auf (bis Tag 16 in der Maus). Anschließend nimmt ihre Zahl zu und sie nehmen eine

organisiertere Anordnung ein. Die Aktinfilamente der Mikrovilli beginnen sich in das Zytoplasma auszudehnen, das terminale Netz bildet sich und die Mikrovilli erscheinen regelmäßig. Darauf folgt eine Verlängerung der Mikrovilli (Heintzelman und Mooseker, 1992; Mamajiwalla et al., 1992). Bei der Bildung des Dünndarmepithels in Embryonen kann Villin am Tag 8,5 detektiert werden und erscheint apikal in intestinalen Epithelzellen am Tag 12,5. Dagegen kann I-Plastin erst am Tag 10,5 detektiert werden und lokalisiert apikal am Tag 14,5 der embryonalen Entwicklung (Ezzell et al., 1989). T- und L-Plastin sind in den ersten Tagen bis zum Tag 14,5 der Differenzierung von intestinalen Epithelzellen vorhanden und lokalisieren sowohl apikal als auch basal. Nach dem Tag 16,5 sind sie nicht mehr nachweisbar. Dies lässt vermuten, dass die Isoformen unterschiedliche Rollen während der Differenzierung der Darmepithelzellen ausführen. Dabei könnten T- und I-Plastin für die Bildung und Verlängerung der Mikrovilli entscheidend sein, während L-Plastin für die Kontrolle der Zelladhäsion wichtig sein könnte (Delanote et al., 2005).

Die Assemblierung des Bürstensaums während der **Differenzierung** der Zellen in den Krypten ist bisher nur wenig in Säugern untersucht worden. Außerdem fehlen gute Zellkulturmodelle. Der Zusammenbau der Mikrovilli im adulten Epithel ist generell aber ähnlich wie in der Embryogenese, wobei sie sich in einigen Details unterscheiden. Die frühen Ereignisse der Mikrovilliassemblierung haben bereits in den Tiefen der Krypten stattgefunden (Trier, 1963; Fath et al., 1990; Heintzelman und Mooseker, 1990). Über die Assemblierung der Mikrovilli im humanen Darmepithel ist wenig bekannt. Das Zeitfenster, in dem die Assemblierung bzw. Differenzierung an der Krypte/Villus-Achse stattfindet, ist wesentlich kürzer als bei Hühnern (Trier, 1963). Aus diesem Grund wird im Folgenden die Assemblierung bei Hühnern beschrieben:

Die Zellen der Krypten besitzen kurze Mikrovilli, haben aber noch kein terminales Netz ausgebildet. Höher gelegene Zellen in den Krypten verfügen über eine höhere Anzahl an Mikrovilli und einige gebündelte Filamente können im terminalen Netz beobachtet werden. Letztendlich werden die Mikrovilli verlängert und ihre Dichte nimmt zu. Zudem erhält das terminale Netz seine gut definierte Struktur, einschließlich der Ausschließung von Organellen (organellenfreie Zone) (Fath et al., 1990). Studien an Caco2-Zellen zeigen ähnlich zu der embryonalen Entwicklung, dass erst die Mikrovilli entstehen, gefolgt von der Aktinwurzel. Im Laufe der Differenzierung nehmen die Dichte der Mikrovilli und ihre Länge zu. Nachdem das terminale Netz ausgebildet ist, erreichen die Mikrovilli ihre endgültige Länge (Peterson und Mooseker, 1993).

Es konnte gezeigt werden, dass erst Villin und Aktin apikal lokalisieren und die ersten Mikrovilli ausbilden. Später, wenn die ersten Aktinwurzeln sichtbar werden, lokalisiert auch Spektrin unterhalb der Mikrovilli und ein terminales Netz fängt an sich zu bilden (Peterson et al., 1993).



**Abbildung I-7: Assemblierung des Bürstensaums in Caco2 BBe1 Zellen.** A: Allgemeine zelluläre Veränderungen mit immer größer und differenzierter werdenden Epithelzellen. B: Apikale Veränderungen mit Entstehung der Mikrovilli, Ausdehnung der mikrovillären Aktinfilamentbündel und die Assemblierung des terminalen Netzes. Die Dichte der Mikrovilli nimmt im Laufe der Zeit zu (Abb. entnommen aus Peterson und Mooseker (1993)).

Das Verhalten von I-Plastin wurde in dieser humanen Adenokarzinom Zelllinie noch nicht untersucht. In dieser und weiteren Zelllinien wurden hauptsächlich Erkenntnisse über andere regulatorische Faktoren wie Wachstumsfaktoren und Zytokine (Podolsky, 1993; Chailier und Menard, 1999) und die Interaktionen zwischen dem Epithel und dem Mesenchym sowie Zell-Matrix-Interaktionen gewonnen (Beaulieu, 1997; Kedinger et al., 1998a; Kedinger et al., 1998b; Beaulieu, 1999).

## 5 Zielsetzung der Arbeit

Die Struktur und Komposition der Mikrovilli sind zwar weitgehend bekannt, dennoch sind noch viele Fragen offen, wie beispielsweise die Regulierung der Assemblierung von den Mikrovilli. In Zellkulturmodellen wurde die Rolle der aktinbindenden Proteine an diesem Prozess und ihre funktionelle Beziehung bereits untersucht. Diese Studien haben zwar viele Informationen geliefert, können die Situation *in vivo* aber nicht exakt reproduzieren. Studien an Mäusen und anderen Organismen, die defizient für eines der Bürstensaumproteine sind, zeigen vielmehr, dass, von wenigen Ausnahmen abgesehen, keine dieser untersuchten Komponenten für die Formation der Mikrovilli essenziell ist. In einigen Fällen sind allerdings morphologische und kompositionelle Veränderungen zu beobachten (Tabelle I-1). Die Ursache für den milden Phänotyp im Darm von Villin- und Espin defizienten Mäusen lässt sich vermutlich auf ein gewisses Maß an funktioneller Redundanz mit anderen aktinbündelnden Proteinen zurückführen. Tatsächlich bündelt I-Plastin *in vitro* Aktinfilamente, die strukturell denen in Mikrovilli ähneln (Glenney et al., 1981; Matsudaira et al., 1983) und Mikrovilli werden embryonal vervollständigt, wenn I-Plastin apikal im Darm auftritt (Ezzell et al., 1989). Damit ist I-Plastin das einzige bekannte aktinbündelnde Protein in den Mikrovilli, das bisher nicht in einem *knockout*-Mausmodell untersucht worden ist.

Ziel dieser Arbeit ist daher die Verifizierung sowie die detaillierte morphologische und funktionelle Charakterisierung der I-Plastin defizienten Mauslinie. Zunächst soll mit Hilfe immunhistochemischer und biochemischer Analysen eine Kompensierung durch andere Mitglieder der Plastinfamilie ausgeschlossen werden. Die Mäuse sollen danach postnatal mit verschiedenen Techniken analysiert werden. Mit Hilfe morphometrischer und biochemischer Analysen soll der allgemeine Phänotyp der Mäuse sowie die Effizienz der Transporteigenschaften, das Essverhalten und die Stuhlproduktion bestimmt werden. Die Morphologie des Darms und insbesondere des Bürstensaums der Darmepithelzellen soll histologisch und elektronenmikroskopisch untersucht werden. Im nächsten Schritt werden isolierte Bürstensäume und der apikale Bereich der Darmepithelzellen in Gewebeschnitten näher analysiert. Die Auswirkungen des I-Plastin-Verlusts auf die Expression und Verteilung relevanter Proteine im apikalen Bereich der Darmepithelzellen ist dabei von besonderem Interesse und soll mittels immunhistochemischer Färbungen sowie biochemischer Methoden bestimmt werden. Eine mögliche Rolle von I-Plastin bei der Kontraktion des Bürstensaums, der kalziumabhängigen F-Aktin-Fragmentierung, in infektiösen Prozessen und bei der Barrierefunktion der Epithelzellen soll in funktionellen Analysen ermittelt werden.

Tabelle I-1: Verlustphänotypen einiger ausgewählter Bürstensaumkomponenten

Defizienz/ Organismus	Phänotyp	Veröffentlichung
<b>Aktin (ACT-5)</b> <i>C. elegans</i>	Lebensfähig bis 1.Larvenstadium und normal polarisierte intestinale Zellen; Defekte in der apikal-basalen Polarität; keine MV	(MacQueen et al., 2005)
<b>Villin</b> <i>M. musculus</i>	Lebensfähig und fertil; intakte MV; Defekte unter stressinduzierten Bedingungen (wie beispielsweise Infektionen, induzierte Kolitis)	(Pinson et al., 1998; Ferrary et al., 1999; Athman et al., 2002; Wang et al., 2008)
<b>Espin</b> <i>M. musculus</i>	Verkürzte Stereozilien; taub; keine Veränderungen in den MV des Darms	(Zheng et al., 2000) persönliche Mitteilung von S. Robine
<b>Ezrin</b> <i>M. musculus</i>	Neonatal letal; Defekte in der Villusformierung; verdickte, ungeordnete und nicht uniforme MV	(Saotome et al., 2004)
<b>Myosin Ia</b> <i>M. musculus</i>	Normale Länge der MV; z.T. Vesikulierung der MV; Verlust von apikaler SI; Umverteilung der Intermediärfilamente und von Myosin Ic; erhöhte Apoptose	(Tyska et al., 2005)
<b>Myosin IB</b> <i>D. melanogaster</i>	Normale Länge der MV; z.T. Vesikulierung der MV; DMOesin (Mitglied der ERM-Familie) apikal reduziert; Destabilisierung des Bürstensaums und dadurch bedingte eingeschränkte Barrierefunktion; erhöhte Apoptose	(Hegan et al., 2007)
<b>Myosin VI</b> <i>M. musculus</i>	Taub; deformierte und z.T. fusionierte Stereozilien; geringes Körpergewicht; Darm fragiler bei Präparation; verkürzte intestinale MV; Aktinwurzel vorhanden; CFTR Akkumulation an der Membran	(Self et al., 1999; Ameen und Apodaca, 2007)
<b><math>\alpha</math>-Spektrin</b> <i>D. melanogaster</i>	Letal; intakte MV, die teilweise nicht dicht gepackt sind; Verlust von Zell-Zellkontakten; Darmansäuerungsdefekt	(Lee et al., 1993)
<b><math>\beta_H</math>-Spektrin</b> <i>D. melanogaster</i>	Rab5-vermitteltes endosomales Recycling reduziert; Verlust von funktioneller H <sup>+</sup> -ATPase in der Membran; fehlende Ansäuerung des Darms; erhöhte Anzahl an späten Endosomen und Lysosomen	(Phillips und Thomas, 2006)
<b>Keratin 8</b> <i>M. musculus</i>	Embryonal letal in C57Bl/6 In FVB/n: Reduktion von SI und alkalischer Phosphatase; Darmepithelzellen in den Villi besitzen keine Intermediärfilamente mehr; mechanische Instabilität	(Baribault et al., 1993); (Baribault et al., 1994; Ameen et al., 2001; Toivola et al., 2004)
<b>Keratin 19</b> <i>M. musculus</i>	Keine Veränderung in der Lokalisation von anderen Keratinen in Darmepithelzellen; milde Myopathie	(Tamai et al., 2000; Stone et al., 2007)

[CFTR: *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*; DPPIV: Dipeptidylpeptidase IV; ERM: Ezrin-Radixin-Moesin; MV: Mikrovilli; SI: Sucrase-Isomaltase]



# II Material und Methoden

## 1 Material

### 1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien der Qualität *pro analysis* (p.a.) und Enzyme wurden von den Firmen Biozym, Fluka bzw. Sigma, Gibco™ bzw. Invitrogen, Life Technologies, Merck und New England Biolabs (NEB), VWR oder Roche bezogen. Falls von weiteren Firmen Chemikalien, Enzyme oder andere Verbrauchsmaterialien genutzt wurden, sind diese an entsprechender Stelle aufgeführt. Standardlaborgeräte wurden von den Firmen Beckmann, Biorad, Eppendorf, Hoefer, Hybaid, Leica, Liebherr, Medite, Microm, Nunc, Polyscience, Samsung oder Sorvall bezogen oder an jeweiliger Stelle angegeben. Verwendete Lösungen und Puffer, die im Folgenden nicht aufgeführt sind, wurden nach Sambrook (Sambrook et al., 2001) hergestellt.

### 1.2 Lösungen und Puffer

Die Herstellung sämtlicher Lösungen wurde mit entionisiertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage von Millipore durchgeführt. Für die Arbeiten mit RNA wurde DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandeltes Wasser verwendet und die Oberflächen mit „RNase Away“ (Molecular Bioproducts) behandelt. Puffer und Lösungen, die hier nicht verzeichnet sind, werden unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

#### PBS (10x, pH 7,2)

10 mM KCl  
10 mM NaCl  
16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
32 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

#### NCP (10x, pH 8,9)

12,1 g Tris  
87,0 g NaCl  
5 ml Tween 20  
2,0 g Natriumazid  
Mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen.

<u>SSC (20x)</u>	<u>TAE-Puffer (50x)</u>	<u>TBE-Puffer (5x)</u>
3 M NaCl	1 M Tris/HCl, pH 8,0	455 mM Tris/HCl, pH 8,0
0,3 M Natriumcitrat	950 mM Essigsäure	455 mM Borsäure
	50 mM EDTA	10 mM EDTA
<u>TE-Puffer</u>	<u>TBS-Puffer</u>	<u>TBST-Puffer</u>
10 mM Tris/HCl, pH 8,0	150 mM NaCl	TBS
1 mM EDTA, pH 8,0	50 mM Tris/HCl, pH 7,4	0,1 % Tween20 (v/v)

### 1.3 Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten, kommerziell erhältlichen Kits sind, sofern sie nicht im Methodenteil aufgeführt werden, in der Tabelle II-1 angegeben und wurden nach Herstellerangaben unter Verwendung der angegebenen oder mitgelieferten Hilfsmittel, Lösungen und Chemikalien eingesetzt.

**Tabelle II-1: Kommerziell erhältliche Kits**

Bezeichnung	Hersteller
BC-Assay Kit UP40840A	Pierce
DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System	Promega
High Pure Plasmid Purification Kit	Roche
High Pure PCR Purification Kit	Roche
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel
pGEM-Teasy-Vector System	Promega
Super Sensitive™ IHC Detection Kit	BioGenex
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat	Pierce
Random Primed DNA Labeling Kit	Roche
RNeasy Mini Kit (50)	Qiagen
Western-Blot Recycling Kit	Chemicon

## 1.4 Oligonukleotide

Die Synthese aller in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Sigma-Ark. Tabelle II-2 gibt einen Überblick über die synthetisch hergestellten Oligonukleotide.

**Tabelle II-2: Oligonukleotide mit zugehöriger Sequenz. Sequenzen zeigen 5'-3'-Orientierung.**

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
5'-Sonde fwd rev	cttcatagtagggagtcacatggtg gatataattggaagatctaag	Genotypisierung
3'-Sonde fwd rev	ggctacagagggcaggcaaaacc gagacacttttagtgacatgaacg	Genotypisierung
Neo-Sonde fwd rev	agggatctcctgtcatctcaccttgctcctcc gaagaactcgtcaagaaggcgaatagaaggcga	<i>Southern Blot</i>
Interne-Sonde fwd rev	gttgttgtgaactcaggtgc ttcacacaggaaacagctatgacc	<i>Southern Blot</i>
E2-5 prime	atataaagacttgaagtagcccttccagt	RT-PCR
E4-3 prime	ctgagtacgaatgctgggtgcct	RT-PCR

## 1.5 Konstrukte

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konstrukte von I-Plastin, T-Plastin (humane Formen) und L-Plastin (murine Variante, N-terminal 317 aa) lagen kloniert im Vektor pGEX-2T vor.

## 1.6 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind in der Tabelle II-3 aufgeführt und wurden gemäß den Angaben des Herstellers eingesetzt.

**Tabelle II-3: Verwendete Enzyme und Hersteller**

Enzyme	Hersteller
Deoxyribonuklease I (DNase I)	Roche
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega
Lysozym	Sigma
Klenow-Fragment (DNA-Polymerase I)	Roche
Proteinase K	Merck
Restriktionsendonukleasen	Amersham, NEB, Jena Biosciences
Ribonuklease A (RNase A)	Roche
Taq-DNA-Polymerase	Roche
Trypsin	Biochrom

## 1.7 Antikörper

Die verwendeten Antikörper wurden nach Herstellerangaben für *Western Blots* (WB), sowie bei Immunfluoreszenz (IF)- und immunhistochemischen (IHC) Färbungen eingesetzt und bei 4 °C oder -20 °C gelagert. Alle verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind jeweils in den Tabelle II-4 bzw. Tabelle II-5 aufgeführt.

**Tabelle II-4: Liste der verwendeten primären Antikörper**

Antikörper gegen	Wirt	Quelle	WB	IHC/IF
I-Plastin	rb	Diese Arbeit	1:1000	1:300
T-Plastin	rb	Diese Arbeit	1:1000	1:500
L-Plastin	rb	Diese Arbeit	1:1000	1:300
Fimbrin	rb	(Drenckhahn et al., 1985)	1:5000	-
$\alpha$ -Tubulin	m	Calbiochem	1:1000	-
$\alpha$ II-spectrin	gp	(Rotter et al., 2005)	1:2000	1:1000
Lamp2 (Abl-93)	r	DSHB	-	1:2
Plectin	gp	Progen Biotechnik	-	1:500
Vinkulin	m	Sigma	1:2000	-
BrdU (BU33)	m	Sigma	-	1:1000

Antikörper gegen	Wirt	Quelle	WB	IHC/IF
Clathrin-HC	m	BD Transduction Laboratories	1:1000	1:100
GST	rb	Amersham	1:5000	-
Myosin Ia	rb	(Skowron et al., 1998)	1:1000	1:100
Myosin Ie	rb	(Skowron et al., 1998)	1:1000	1:100
Non-muscle Myosin IIa	rb	Acris/Novus Biologicals	1:1000	1:100
Espin	rb	(Bartles et al., 1996)	-	1:5
Keratin 8 (Troma I)	r	DSHB	1:4	1:1
Keratin 19 (Troma III)	r	DSHB	1:4	1:1
I-Fabp	rb	(Carroll et al., 1990)	1:1000	1:200
Tropomyosin 1-3, 5a, 5b, 6	s	Chemicon	1:300	1:100
$\alpha$ -E-catenin	rb	Sigma	-	1:2000
$\beta$ -catenin	m	BD Transduction Laboratories	1:500	1:300
E-cadherin	m	TaKaRa	-	1:200
Ki67	rb	Dianova	-	1:50
Villin	rb	(Coudrier et al., 1981)	1:1000	1:300
Villin	m	(Dudouet et al., 1987)	1:1000	1:300
Ezrin	rb	(Pakkanen et al., 1988)	1:1000	1:500
$\beta$ -Aktin	m	Sigma	1:5000	1:1000
ZO-1	rb	Zymed	-	1:200
Pan-Keratin	rb	Dako	-	1:200
Laktase phlorhizin hydrolase (LPH)	m	(Quaroni und Isselbacher, 1985)	-	1:500
Sucrase-Isomaltase (SI)	m	(Quaroni und Isselbacher, 1985)	-	1:500
Neutrale Aminopeptidase	rb	(Sjostrom et al., 1980)	-	1:500
Dipeptidylpeptidase IV (DPPIV)	m	Danielsen	-	1:500
Na/K-ATPase	rb	(Jaisser et al., 1993)	-	1:50

[rb: *rabbit*, Kaninchen; m: *mouse*, Maus; gp: *guinea pig*, Meerschweinchen; s: *sheep*, Schaf; r: *rat*, Ratte] DSHB: *Developmental Studies Hybridoma Bank*. Western Blot (WB), Immunfluoreszenz (IF), Immunhistochemie (IHC) In den beiden rechten Spalten sind die jeweiligen Verdünnungen angegeben.

**Tabelle II-5: Liste verwendeter Sekundärantikörper**

Antikörper gegen	Konjugat	Quelle	WB	IHC/IF
IgG Kaninchen	HRP	Sigma	1:10000	
IgG Kaninchen	Alexa488	Molecular Probes	-	1:1000
IgG Kaninchen	Alexa568	Molecular Probes	-	1:1000
IgG Maus	HRP	Sigma	1:10000	1 :100
IgG Maus	Alexa488	Sigma	-	1:1000
IgG Maus	Alexa568	Sigma	-	1:1000
IgG Meerschweinchen	HRP	Sigma	1:10000	-
IgG Meerschweinchen	FITC	Sigma	-	1:1000
IgG Ziege/Schaf	HRP	Sigma	1:10000	-
IgG Ziege/Schaf	Alexa488	Molecular Probes	-	1:1000
IgG Ratte	HRP	Sigma	1:10000	-
IgG Ratte	Alexa488	Molecular Probes	-	1:1000
IgG Ratte	Alexa568	Molecular Probes	-	1:1000

Immunglobulin G (IgG); Horseradish Peroxidase (HRP); *Western Blot* (WB), Immunfluoreszenz (IF), Immunhistochemie (IHC). In den rechten Spalten sind die jeweiligen Verdünnungen angegeben.

Die Mitglieder der Plastinfamilie sind nahezu identisch. Sie unterscheiden sich lediglich im N-terminalen Bereich. Aus diesem Grund wurden spezifische Plastinantikörper gegen folgende synthetischen Peptide, die der entsprechenden N-terminalen Region des jeweiligen Plastins zuzuordnen sind, generiert.

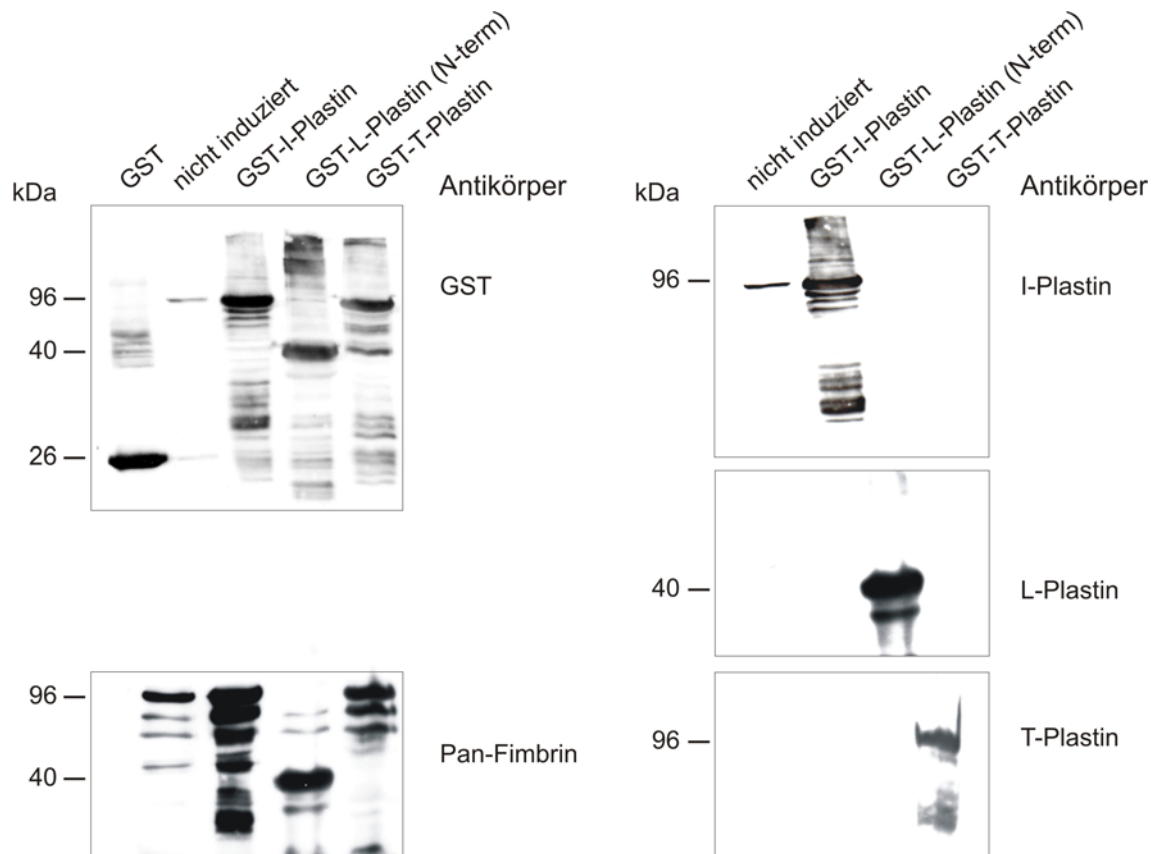
I-Plastin: ENSTTTISREELEELQEAC

L-Plastin: MARGSVSDEEMMELREAF

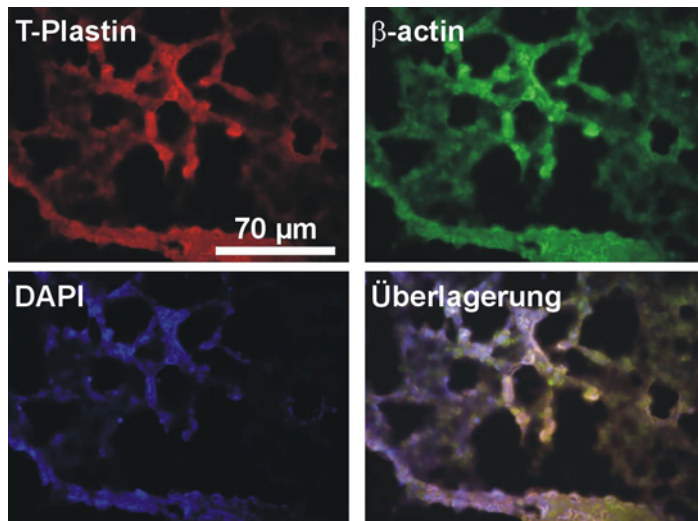
T-Plastin: MATTQISKDELDELKE

Die Peptide wurden an *keyhole limpet* Hämozyanin (KLH aus der Schlitzschnecke, Sigma) gekoppelt und für die Immunisierung von Kaninchen verwendet (Pineda Antikörper-Service, Berlin, Germany und Eurogentec, Seraing, Belgium). Anschließend wurde das I-Plastin-Antiserum affinitätsgereinigt, indem eine Säule verwendet wurde, an der das I-Plastinpeptid kovalent an Sepharose 4B gekoppelt war. Die Spezifität der Plastinantiseren wurde mit Hilfe von bakteriell exprimierten Plastinproteinen (Abschnitt 1.5) in *Western Blot* Analysen sichergestellt (Abbildung II-1). Des Weiteren wurden die Antikörper in Paraffinschnitten auf ihre Spezifität getestet. In Gewebeschnitten sollte gezeigt werden, ob es in I-Plastin defizienten Mäusen zu einer Relokalisation der anderen Isoformen kommt.

Da T-Plastin im Darm nur sehr schwach, in der Lunge allerdings stark exprimiert wird, wurde der Antikörper in Lungenschnitten getestet (Abbildung II-2), I- und L-Plastin sind nur in Darmschnitten verwendet worden (Abbildung III-4).



**Abbildung II-1: Überprüfung der Antikörperspezifität.** Die drei Mitglieder der Plastinfamilie in Vertebraten wurden rekombinant als GST-Fusionsproteine in Bakterienzellen exprimiert, wobei von L-Plastin nur ein verkürztes Konstrukt verwendet wurde. Die Proteine wurden in einer 10 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose übertragen. Die Immundetektion erfolgte mit den Antiseren von L- und T-Plastin und dem affinitätsgereinigtem I-Plastin-Antikörper. Zur Kontrolle wurden die Blots mit einem Pan-Fimbrinantikörper inkubiert, der alle Isoformen erkennt. Zudem diente ein GST-Antikörper als Kontrolle. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit einem sekundären anti-Kaninchen Peroxidase gekoppelten Antikörper und anschließender Chemilumineszenz.



**Abbildung II-2: Überprüfung des T-Plastin-Antikörpers in Paraffinschnitten der Mauslunge.** Die Paraffinschnitte wurden mit dem T-Plastin-Antiserum und einem  $\beta$ -Aktin Antikörper inkubiert (sekundäre Antikörper anti-Kaninchen Alexa568 bzw. anti-Maus Alexa488). Die Kerne wurden zur Kontrolle mit DAPI angefärbt. Die Bilder wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes aufgenommen.

## 1.8 Bakterienstämme und Nährmedium

### Bakterienstämme:

<i>E. coli</i> XL1-Blue	(Bullock, 1987)
<i>E. coli</i> BL21 (DE)	(Studier und Moffatt, 1986)
<i>E. coli</i> M15	(Hanahan, 1983)

Die verwendeten Medien (pH 7,4) wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt und bei 120 °C autoklaviert. Antibiotika (100 mg/l Ampicillin) wurden nach Abkühlen des Mediums hinzugegeben. Für die Herstellung von Agarplatten wurden den Medien 0,9 % (w/v) Agar-Agar und bei Bedarf 100 mg/l Ampicillin zugesetzt. Für die Blau/Weiß-Selektion von *E. coli*-Transformanten wurden die fertigen Platten jeweils mit 10  $\mu$ l einer 1 M IPTG-Lösung und 10  $\mu$ l X-Gal-Lösung (2 % in Dimethylformamid) bestrichen.

### LB-Flüssig-Medium

10 g Bacto-Trypton  
 5 g Hefeextrakt  
 5 g NaCl  
 auf 1 l mit Wasser auffüllen.

### SOC-Medium

20 g Bacto-Trypton  
 5 g Hefeextrakt  
 0,5 g NaCl  
 20 mM Glucose  
 auf 1 l mit Wasser auffüllen.



## 1.9 Tiere

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Mausstamm C57Bl/6 verwendet. Die Versuchstiere waren, wenn nicht anders angegeben, im Alter von 8-12 Wochen (adulte Mäuse). Die Tiere wurden unter spezifisch pathogen freien (SPF)-Bedingungen in individuell ventilierten Mikroisolatorenkäfigen (IVC-Käfigen) der Fa. Thoren (Model#2 bzw. Model#9) im Tierstall des Zentrums für Physiologie gehalten. Als Trinkwasser diente angesäuertes Leitungswasser (pH 2,5) und das Futter (Zuchtfutter) wurde von der Fa. Altromin bezogen. Es erfolgte ein wöchentlicher Käfig- und Flaschenwechsel. Als Einstreu für die Käfige wurde Holfaser/Fichte plus (HW 300/500, Fa. Harlan) und als Nistmaterial wurden Nestlets der Fa. Plexx verwendet. Die Mäuse wurden unter einem gesteuerten Lichtzyklus (12/12 h) gehalten.

## 2 Methoden

Allgemeine Arbeitsanweisungen der Molekularbiologie, Proteinbiochemie, Zellkultur, Histologie sowie tierexperimentelle Arbeiten, welche hier nicht näher beschrieben sind, wurden auf Grundlage von Standardprotokollen (Mühlhardt, 2000; Rehm, 2000; Sambrook et al., 2001) durchgeführt und ggf. optimiert.

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Bakterien wurden je nach Bedarf in entsprechenden Mengen LB-Medium kultiviert. Die Flüssigkulturen wurden bei 37 °C im Schüttelinkubator (250 Upm), die auf LB Platten ausgestrichenen Bakterien ü.N. bei 37 °C im Brutschrank (Heraeus Instruments) inkubiert.

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* ist eine abgewandelte Methode der alkalischen Lyse von Birnboim (Birnboim und Doly, 1979). Infolge der SDS- und Alkalibehandlung werden dabei die Zellmembranen zerstört. Nach der Ausfällung wurde die DNA-haltige Lösung mit Isopropanol versetzt. Die durch Isopropanolzugabe gefällte Plasmid-DNA wurde mittels Zentrifugation sedimentiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, in 10 mM Tris/HCl aufgelöst und mit 2 µl RNase (10 mg/ml) behandelt.

## 2.1.2 Aufreinigung von Plasmid-DNA (Roche/Macherey-Nagel)

Um bis zu 40 µg saubere Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen zu gewinnen (z.B. Proben für eine Sequenzanalyse), wurde das „*High Pure Plasmid Purification*“-Kit von der Firma Roche benutzt. Hierzu wurden 5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur in LB-Medium, welches das entsprechende Antibiotikum enthielt, abzentrifugiert. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben. Die so erhaltene DNA wurde bei -20°C gelagert.

## 2.1.3 Lagerung und Konservierung von Bakterien

Flüssigkulturen wurden eine Woche, LB-Agarplatten mit Bakterienkolonien vier Wochen bei 4 °C gelagert. 100 ml Bakterienkulturen wurden zunächst zentrifugiert (4000 xg, 5 min, 4 °C), der Überstand verworfen und das Bakterienpellet bei -20 °C gelagert. Zur dauerhaften Lagerung transformierter Bakterien wurden aus einer Übernachtskultur 850 µl Bakteriensuspension entnommen und mit 150 µl sterilem Glycerin vermischt. Die Probe wurde sofort bei -80 °C tiefgefroren und konnte so mindestens ein Jahr gelagert werden.

## 2.1.4 Transformation von Bakterien

### 2.1.4.1 Herstellung kompetenter Bakterien (Chung und Miller, 1988)

Eine Übernachtskultur von XL1-Blue Bakterien wurde in 250 ml LB-Medium bei RT bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,5 angezogen. Die Kultur wurde für 20 min auf Eis inkubiert und danach 10 min bei 2500 xg und 4 °C sedimentiert. Das Sediment wurde in 80 ml eisgekühltem Transformationspuffer in einem Eisbad resuspendiert, um danach wieder abzentrifugiert zu werden. Daraufhin wurde das Sediment in 20 ml eiskaltem Transformationspuffer resuspendiert und mit 1,6 ml DMSO versetzt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 10 min im Eisbad wurden Aliquots von 100 µl in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

#### Transformationspuffer

10 mM PIPES  
15 mM CaCl<sub>2</sub>  
250 mM KCl

Nach pH-Einstellung auf 6,7 mit KOH und der Zugabe von  $\text{MnCl}_2$  (55 mM Endkonzentration) wird die Lösung steril filtriert und bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

#### 2.1.4.2 Transformation von Bakterien

Ein 100  $\mu\text{l}$  Aliquot der kompetenten *E. coli* Bakterien wurde auf Eis angetaut und mit 0,1-0,5  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA oder 10  $\mu\text{l}$  eines Ligationsansatzes versetzt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 45 s auf 42 °C erhitzt und sofort danach wieder für 2 min auf Eis gekühlt. Danach wurden die Zellen mit 1 ml SOC-Medium versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Ein 50  $\mu\text{l}$  Aliquot wurde sofort, der restliche Ansatz nach Sedimentierung, auf entsprechende Selektionsagarplatten ausplattiert.

#### 2.1.5 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration von DNA und RNA in wässriger Lösung kann spektralphotometrisch bei 260 bzw. 280 nm mit Wasser oder TE als Referenz bestimmt werden. Eine OD von 1 entspricht bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  dsDNA, bzw. 40  $\mu\text{g/ml}$  RNA. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors ergibt sich folgende Beziehung:

$$\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = E_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Grad der Verunreinigung mit Proteinen und Phenolen lässt sich mit Hilfe des Quotienten  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  abschätzen. Beträgt der Wert des Quotienten 1,8 oder mehr, kann die DNA- bzw. RNA-haltige Lösung als rein angesehen werden. Isolierte RNA wird bei -80 °C, Plasmid-DNA wird bei -20 °C gelagert.

#### 2.1.6 Restriktionsanalyse

Für das Schneiden von Plasmid DNA wurden Restriktionsendonukleasen entsprechend den Angaben des jeweiligen Herstellers in den mitgelieferten Puffern und bei den empfohlenen Temperaturen eingesetzt. Die Restriktion erfolgte für 1-2 h bei 37 °C. Eine Standardrestriktionsanalyse beinhaltete in 20  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen folgende Komponenten:

DNA	0,2 – 2 µg
Enzym	5 U
10x Puffer	1 µl
ggf. 10x BSA	1 µl
H <sub>2</sub> O bidest	ad 20 µl

### 2.1.7 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien (Laird et al., 1991)

Die genomische DNA wurde jeweils aus einem etwa 1 cm langen Stück der Schwanzspitze gewonnen, welches zuerst über Nacht in 500 µl Lysepuffer bei 55 °C in einem Eppendorfschüttler (500 Upm) inkubiert wurde. Nach einer 5 min Zentrifugation (11.000 xg Tischzentrifuge) wurde der Überstand in ein neues, steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die DNA mit einem Volumen 100 % Ethanol gefällt und erneut zentrifugiert. Das resultierende Sediment wurde mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Sediment bei Raumtemperatur getrocknet und in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. Nach 20 min Inkubation bei 65 °C wurde die genomische DNA bei 4 °C gelagert.

#### Schwanzspitzen Lysepuffer

50 mM	Tris/HCl, pH 8
100 mM	EDTA, pH 8
0,5 %	SDS
400 mM	NaCl

Vor Gebrauch wird in den Lysepuffer 20 mg/ml Proteinase K gegeben.

### 2.1.8 Restriktion genomischer DNA

Vor der *Southern Blot* Analyse wurde die genomische DNA mit einer spezifischen Restriktionsendonuklease behandelt. Für einen Nachweis I-Plastin defizienter Mäuse wurde die genomische DNA entweder mit dem Enzym EcoRV oder mit PstI behandelt. Die Restriktion erfolgte bei 37 °C über Nacht in einem 80 µl Standard Ansatz:

Genomische DNA	12-30 µl
Puffer (10x)	8 µl
BSA (200 µg/ml)	8 µl
Enzym	6 µl
Spermidin 0,1 M	2 µl
H <sub>2</sub> O dest ad	80 µl

### 2.1.9 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten erfolgte aufgrund der vom Molekulargewicht abhängigen Laufgeschwindigkeit in einer Agarosegel-Matrix. Je nach Verwendung und Auftrennungsziel wurden 0,7-2,0 %ige Gele in TAE-Puffer oder TBE-Puffer verwendet. Zur Herstellung eines Agarosegels wurde Agarose im Puffer aufgekocht, mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,1 µg/ml) und nach Abkühlung auf Gelträger verschiedener Größe (7,5 cm x 8 cm, 11,5 cm x 14 cm) mit Taschenformer gegossen. Die zu untersuchenden DNA-Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und in die Probenaschen geladen. Die DNA-Auftrennung erfolgte in entsprechendem Puffer horizontal in Flachbett-Gelapparaturen. In Abhängigkeit von der Gelgröße, Laufdauer und Auftrennungseffizienz wurde eine Spannung von 20 V bis 140 V angelegt. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde die DNA mit einem Transilluminator ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ ) sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte unter UV-Licht mit einem Videodokumentationsgerät (Alpha Innotech). Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte jeweils im Vergleich mit einem geeigneten Größenstandard.

#### 5x Probenpuffer

30 % Glycerin  
0,25 % Bromphenolblau  
in TE-Puffer

1 kb DNA Leiter (Life Technologies): 12216; 11198; 10180; 9162; 8144; 7126; 6108; 5090; 4072; 3054; 2036; 1636; 1018; 506; 396; 344; 298; 220; 201; 154; 134; 75 bp.

### 2.1.10 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zunächst wurde die mit Restriktionsendonukleasen behandelte DNA im TAE-Agarosegel ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Die Elution erfolgte mit dem „NucleoSpin Extract II“-Kit der Firma Macherey-Nagel. Dabei wurde die Bande des gewünschten DNA-Fragments mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten nach Herstellangaben im Kit spezifischen Puffer gelöst.

### 2.1.11 Southern Blot (Southern, 1975)

Die als *Southern Blot* bezeichnete Methode beschreibt den Transfer der im Agarosegel aufgetrennten DNA auf eine Nylonmembran. Anschließend folgt die Identifizierung spezifischer Fragmente durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA Sonde. Um später eine größenspezifische Zuordnung der radioaktiven Signale zu ermöglichen, wurde vorab das Agarosegel nach elektrophoretischer Auftrennung der verdauten genomischen DNA im UV-Licht mit einem Lineal fotografiert. Danach wurde die DNA im Gel 15 min (max. bis zur Gelbfärbung der Bromphenolblau-Bande) in 0,25 M HCl depurinert und anschließend das Gel kurz in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  gewaschen. Dann wurde die DNA im Gel ca. 30 min (bis zur Blaufärbung der Bromphenolblau-Bande) in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,25 M NaOH) inkubiert. Der Transfer der DNA mittels Kapillarmethode auf die Nylonmembran (Pal Corporation) wurde über Nacht in Denaturierungslösung durchgeführt. Nach Transfer wurde die DNA mittels *crosslinking* ( $2 \times 70 \text{ mJ/cm}^2$ , UV Crosslinker UVC 500, Hoefer) auf der Nylonmembran fixiert und anschließend  $1 \times 10 \text{ min}$  in  $2 \times \text{SSC}$  Lösung gewaschen und zwischen Blot Papier (Whatman) getrocknet.

### 2.1.12 Radioaktive Markierung von DNA Sonden

Als Sonde dienten PCR-Produkte, die aus genomischer DNA mit spezifischen Oligonukleotiden gewonnen wurden. Die radioaktive Markierung erfolgte mit 50 ng des gereinigten PCR-Produkts und 50 mCi Adenosin 5'-[ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-triphosphat (10 mCi/ml der Firma Amersham) mit dem Random Primed DNA Labeling Kit (Roche) gemäß den Anleitungen des Vertreibers. Hierbei werden mittels „*random priming*“ Fragmente von  $\sim 100 - 1000 \text{ bp}$  Länge markiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden danach durch Zentrifugation ( $1000 \text{ xg}$ , 2 min) über eine 1 ml Sephadex G-50-Säule in TE-Puffer abgetrennt.

#### Sephadex G-50-Säule

30 g Sephadex G-50 wurden in 250 ml TE-Puffer (pH 8,0) gegeben. Zur Präparation einer Chromatographiesäule wurde Sephadex G-50 in eine 1 ml Einwegspritze, deren Auslassöffnung mit einem Pfropfen silanisierter Glaswolle verschlossen wurde, gegeben. Durch 2 min Zentrifugation bei  $1.000 \text{ xg}$  wurde der Puffer abgetrennt und die Säule fest gepackt. Insgesamt verwendet man so viel Sephadex G-50, bis das Volumen der gepackten Säule  $0,9 \text{ ml}$  beträgt. Die Säule wird sofort verwendet.

### 2.1.13 Isolierung von Gesamt-RNA aus Mausgewebe

Zur Isolierung von bis zu 100 µg sauberer Gesamt-RNA aus Gewebe, wurde das von der Firma Qiagen angebotene „RNeasy“-Kit benutzt. Es wurden max. 30 mg isolierter Epithelzellen/Gesamtdarm verwendet und aus diesem nach Angaben des Herstellers die RNA isoliert. Die RNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 2.1.14 Denaturierende Gelelektrophorese (Lehrach et al., 1977)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von RNA wurden Gele mit einer Endkonzentration von 1,2 % Agarose verwendet. Es wurde 0,9 g Agarose in 55 ml H<sub>2</sub>O DEPC in der Mikrowelle aufgekocht und auf etwa 65 °C abgekühlt. Dann wurden 7,5 ml 10x MOPS Puffer (pH 8,0) und 12 ml Formaldehydlösung (37 %) zugegeben. Das Gel wurde in eine horizontale Gel-Apparatur gegossen und nach Härtung mit Laufpuffer (1x MOPS pH 7,0) überschichtet. Etwa 10 µg RNA wurde mit 1 Volumen RNA Probenpuffer und 5 µl Farbmarker versetzt, 10 min bei 65 °C erhitzt und anschließend auf Eis gekühlt. Dann wurden die Proben auf das Agarosegel aufgetragen und bei einer Spannung von 6 V/cm Elektrodenabstand getrennt.

<u>10x MOPS Puffer</u>	<u>RNA Probenpuffer</u>	<u>10x Farbmarker</u>
200 mM MOPS	50 µl 10x MOPS	0,5 g RNase freie Saccharose (50 %)
50 mM NaAcetat	83 µl Formaldehyd (37 %)	0,1 g Bromphenolblau
10 mM EDTA	250 µl Formamid	H <sub>2</sub> O DEPC ad 1 ml
pH 8,0 mit NaOH		(1 µl Ethidiumbromid 100 mg/ml pro 20 µl Farbmarker)

### 2.1.15 Northern Blot

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der RNA im Agarosegel erfolgte der Transfer auf die Nylonmembran (Hybond-N, Amersham) ü.N. in 20x SSC Lösung (vgl. Southern Blot Analyse 2.1.11). Die Membran wurde nach dem Transfer in 2x SSC gewaschen und zweimal im UV-Crosslinker (2x 70 mJ/cm<sup>2</sup> UVC 500, Hoefer) bestrahlt. Zur Hybridisierung der filtergebundenen RNA siehe 2.1.18.

### 2.1.16 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die reverse Transkriptase (RT) ist ein Enzym, das RNA in DNA umschreiben kann. In dieser Arbeit wurde für die RT-Reaktion Gesamt-RNA eingesetzt. Für die Umschreibung in cDNA wurden randomisierte Hexanukleotide p(dN)<sub>6</sub> gewählt, die während der Reaktion an beliebigen Stellen der RNA binden und so die Synthese vieler cDNA-Stränge ermöglichen. Für den ersten Schritt der RT-Reaktion wurden 1-5 µg RNA eingesetzt, 2 µl p(dN)<sub>6</sub> Hexanukleotide zugefügt, auf 15 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> aufgefüllt und für 5 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurde die RNA in cDNA nach folgendem Protokoll umgeschrieben:

- 5 µl 5x Reaktionspuffer (250 mM Tris/HCl pH 8,3; 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT)
- 1,25 µl dNTP-Mix (10 mM)
- 1 µl RNAsin (40 U/µl)
- 1 µl M-MLV-Transkriptase (RNase H<sup>-</sup>)

1 h Inkubation bei 37 °C.

Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert. Zur Amplifikation wurde 5 µl dieser cDNA für die Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt.

### 2.1.17 Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Saiki et al., 1988)

Zur Synthese von DNA-Fragmenten wurde die Taq-Polymerase verwendet und die Reaktionen in einem programmierbaren „Thermocycler“ (MJ PTC 200, MJ Research) durchgeführt. Die Reaktionsparameter wurden den jeweiligen Bedingungen angepasst. Eine Standardreaktion umfasste ein Volumen von 20 µl und folgende Zusammensetzung:

- x µl Template-DNA (~100 ng Plasmid-DNA)
- 1 µl Oligonukleotid 5'-3' (10 pmol/ml)
- 1 µl Oligonukleotid 3'-5' (10 pmol/ml)
- 1 µl dNTP-Mix (jeweils 10 mM)
- 2 µl 10x PCR-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8,3; 500 mM KCl; 20 mM MgCl<sub>2</sub>)
- 1 µl Taq-Polymerase (3-4 U)

mit Wasser auf 20 µl auffüllen.



## 2.1.18 Hybridisierung radioaktiv markierter DNA Sonden mit filtergebundener DNA und RNA

Die Hybridisierung der auf die Nylonmembran transferierten DNA/RNA erfolgte in Anlehnung an die von Church und Glibert (Church und Gilbert, 1984) beschriebene Standardmethode. Danach wurde die Membran mit Hybridisierungslösung mindestens 2 h bei 65 °C rollend vorinkubiert. Anschließend wurde die hitzedenaturierte Sonde zugegeben und ü.N. bei 65 °C hybridisiert. Die Membran wurde mehrfach bei 65 °C in Waschlösung gespült. Bei Erreichen einer ausreichend geringen Hintergrundaktivität der Membran wurde diese in eine Autoradiographiekassette (inklusive Verstärkerfolien) mit Röntgenfilm (Hyperfilm™ MP, Amersham) eingelegt und bei –80 °C entsprechend ihrer Restaktivität exponiert.

### Hybridisierungslösung

500 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2  
7 % SDS  
1 % BSA  
1 mM EDTA  
100 µg/ml denaturiertes  
Heringssperma DNA

### Waschlösung

40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,15  
1 % SDS  
1 mM EDTA

## 2.2 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mit der Bicinchoninsäure-Methode (BCA)

Bei dieser Methode handelt es sich um eine Kombination der Biuret-Reaktion mit der selektiven Bicinchoninsäure-Komplexierung mit Cu<sup>+</sup>. Sie beruht auf der Reduktion von Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>+</sup>. BCA bildet spezifisch mit Cu<sup>+</sup> einen Farbkomplex. Dies ermöglicht einen sensitiven, kolorimetrischen Nachweis von Proteinen bei einer Wellenlänge von 562 nm, dem Absorptionsmaximum des Komplexes (Lottspeich und Zorbas, 1998). Die BCA wurde mit Hilfe des *BC Protein Assay Kit* (Pierce) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dabei werden zu einem Anteil Probe 20 Anteile einer frisch angesetzten Bicinchoninsäure/Kupfersulfatlösung gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Aus der Messung einer BSA-Konzentrationsreihe wurde nach linearer Regression eine Eichgerade ermittelt, aus der die Proteinkonzentration unbekannter Proben bestimmt werden konnte. Die Extinktionen wurden mit einem ELISA-Reader (PerkinElmer) bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen.

### 2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry (Lowry et al., 1951)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte auch durch Kupferkomplexbildung: 50 µl Probe bzw. Wasser wurden 10 min bei RT mit 1 ml Lösung I versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl Lösung II und eine weitere Inkubation von 30 min bei RT. Die Absorption der gebildeten Protein-Kupferkomplexe wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 660 nm gegen ebenfalls versetztes Wasser als Leerwert bestimmt. Anhand einer mit BSA aufgestellten Eichgeraden (1-20 µg) wurde aus den so erhaltenen Werten die Proteinkonzentration ermittelt.

#### Lösung I

0,8 ml 2 % CuSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O  
0,8 ml 4 % K-Na-Tartrat  
38,4 ml 3 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 0,1 N NaOH

#### Lösung II

1 Volumen 1,2-Naphthoquinone-4-  
Sulfonsäure Natriumsalz  
(Folinreagenz, Sigma)  
2 Volumen Wasser

### 2.2.3 Proteinexpression

Für die Expression rekombinanter Proteine unter der Kontrolle des durch IPTG induzierbaren tac- oder T5-Promotors wurden der *E. coli*-Stamm XL1-Blue verwendet. Übernachtskulturen der entsprechenden Transformanten wurden 1:100 in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin verdünnt, und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bzw. 0,7 unter Schütteln (250 UpM) inkubiert. Die Expression rekombinanter Proteine wurde zu diesem Zeitpunkt durch Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert, die Zellen wurden anschließend ü.N. bei 28 °C geschüttelt und nach der Ernte durch Zentrifugation (6.000 xg; 10 min) sedimentiert. Das Sediment wurde ggf. bei -20 °C gelagert.

## 2.2.4 Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine

Das Zellsediment einer 100 ml Bakterienkultur wurde in Lysispuffer (7 ml Puffer auf 1 g Pellet) resuspendiert und mit 1 mg/ml Lysozym versetzt. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurde das Lysat sonifiziert (80 % Amplitude, 7x 10 s, Ultraschallprozessor UP 200s, Dr. Hielscher). Anschließend wurde das Lysat mit Triton-X100 (0,5 % Endkonzentration) versetzt und 1 h rollend im Kühlraum inkubiert. Beide Schritte dienen dazu die Zellmembranen aufzuschließen. Es folgte eine Zentrifugation bei 25.000 xg und 4 °C für 1 h. Der Überstand wurde abgenommen und zu 150 µl Glutathion-Sepharose-Matrix (zuvor mit PBS äquilibriert; Amersham) gegeben und 2 h oder ü.N. bei 4 °C geschüttelt. Nach 5 min Zentrifugation bei 1.000 xg wurde mehrmals mit Waschpuffer gewaschen.

### Lysispuffer

50 mM Tris/HCl, pH 8,0  
300 mM NaCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
4 mM DTT  
1 mM PMSF  
1 mM Benzamidin  
Protease Inhibitor Cocktail (Sigma)

### Waschpuffer

50 mM Tris/HCl, pH 8,0  
1 M NaCl  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,5 % Triton-X100  
4 mM DTT  
1 mM PMSF  
1 mM Benzamidin  
Protease Inhibitor Cocktail (Sigma)

## 2.2.5 GST-Fusionsproteinpräparation und Copräzipitation

Um Proteininteraktionen *in vitro* nachweisen zu können, wurden GST-Kopräzipitationen (GST-*pull down*) durchgeführt. In *E. coli* wurde dazu I-Plastin als GST-Fusionsprotein oder nur GST als Kontrolle exprimiert und an Glutathion-Sepharose gekoppelt (2.2.4) und mit Zelllysaten inkubiert. Isolierte Epithelzellen (2.3.3) oder isolierte Bürstensaumpräparate (2.3.4) wurden abzentrifugiert (1000 xg, 8 min), in 1 ml Zelllysispuffer resuspendiert und 10 min rollend bei 4 °C inkubiert. Sofern F-Aktin durch Latrunculin A (Sigma) depolymerisiert werden sollte, wurden die Zellen für 20 min mit Zelllysispuffer in Anwesenheit von 10 µM Latrunculin A bei 4 °C lysiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 15 min (10.000 xg). 50 µl wurden zur späteren Kontrolle vom Überstand entnommen. Die restlichen Zelllysate wurden mit der, in Zelllysispuffer äquilibrierten, Glutathion-Sepharose-Matrix 2 h oder ü.N. bei 4 °C inkubiert (ggf. in Anwesenheit von 10 µM Latrunculin A).

Im nächsten Schritt wurden die Proben bei 1000 xg abzentrifugiert und dreimal 30 min bei 4 °C mit Zelllysispuffer (ggf. mit 300 mM NaCl Endkonzentration) gewaschen. Mit 50 µl SDS-Probenpuffer wurden die Proben eluiert, aufgeköcht und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert.

#### Zelllysispuffer

50 mM Tris/HCl, pH 8,0	1 mM PMSF
150 mM NaCl	1 mM Benzamidin
20 mM MgCl <sub>2</sub>	1 % Triton-X100
5 mM EGTA	1 % NP-40
Protease Inhibitor Cocktail (Sigma)	

### 2.2.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die aufzutrennenden Proteinlösungen wurden je nach Bedarf mit unterschiedlichen Mengen 2x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C inkubiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli, 1970) trennt Proteine durch den Siebeffekt nach ihren molaren Massen im konstanten elektrischen Feld. Negativ geladene SDS-Moleküle lagern sich in einem konstanten Verhältnis (1,4 g SDS / 1 g Protein) an die Proteine an. Die Mobilität der Proteine im Polyacrylamidgel ist weitgehend unabhängig von der räumlichen Struktur und der Nettoladung, da durch den SDS-Protein-Komplex die nicht kovalenten Wechselwirkungen unterbrochen werden und alle Proteine eine negative Ladung erhalten.

Die SDS-PAGE mit dem System der Firma Biorad wurde unter denaturierenden Bedingungen in 10-18 %igen Trenngelen oder 3-15 %igen Gradientengelen durchgeführt. Es wurde immer ein 4 %iges Sammelgel verwendet, an dessen Grenzschicht die Proteinlösung konzentriert wird und als scharfe Bande gleichmäßig ins Trenngel einwandert. Zuerst wurden die entsprechenden Trenngele gegossen und vorsichtig mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständigem Polymerisieren wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel gegossen. Die SDS-PAGE wurde bei konstanter Spannung (80 V) in 1x SDS-PAGE-Laufpuffer durchgeführt. Zur Abschätzung der Massen wurden zusätzlich Molekulargewichtsstandards aufgetragen.

#### Molekülmassenstandard:

LMW-Marker (Pharmacia):

94; 67; 43; 30; 20,1; 14,4 kDa

PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas):

250; 130; 100; 70; 55; 35; 27; 15; 10 kDa

MagicMark™ Western Protein Standard (Invitrogen):

220; 120; 100; 80; 60; 50; 40; 30; 20 kDa

2x SDS-Probenpuffer

1,2 ml 1 M Tris/HCl, pH 6,8  
 4,0 ml 10 % Natriumdodecylsulfat  
 2,0 ml Glycerin  
 1,0 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol  
 3,8 ml H<sub>2</sub>O  
 200  $\mu$ l 10 % Bromphenolblau

10x SDS-PAGE-Laufpuffer

0,25 M Tris  
 1,9 M Glycin  
 1 % Natriumdodecylsulfat

**Tabelle II-6: Lösungen zur Herstellung von Minigelen für SDS-PAGE.**

	<u>Trenngele</u>				<u>Sammelgel</u>
	10%	12%	15%	18%	5%
Acrylamid (30 %) [ml]	19,7	23,6	30	36	4,1
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) [ml]	16	16	16	16	-
0,5 M Tris/HCl (pH 6,8) [ml]	-	-	-	-	2,4
10%ige SDS-Lösung [ $\mu$ l]	590	590	590	590	240
deionisiertes H <sub>2</sub> O [ml]	23,5	19,6	13,2	7,2	17,2
TEMED [ $\mu$ l]	23	23	23	23	20
10% APS [ $\mu$ l]	240	240	240	240	360

## 2.2.7 Coomassie Blau Färbung

Nach der SDS-PAGE wurden Proteingele für 20 min in saurer, methanolischer Coomassie Lösung denaturiert, fixiert und gefärbt. Der nicht an Proteine gebundene Farbstoff wurde durch Schütteln in Entfärbelösung entfernt. Pro Bande liegt die Nachweisgrenze der Coomassie Blau Färbung bei etwa 0,5  $\mu$ g Protein. Die Gele wurden in 5 % Essigsäure aufbewahrt.

Färbelösung

0,1 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau R 250  
 50 % (v/v) Methanol  
 10 % (v/v) Essigsäure

Danach wird die Färbelösung filtriert.

Entfärbelösung

10 % (v/v) Ethanol  
 7 % (v/v) Essigsäure

## 2.2.8 Gel Trocknung

Coomassie gefärbte Gele wurden getrocknet, um sie haltbarer zu machen. Dazu wurde Zellglas (Einmach Fix, Bringmann) auf Gelgröße geschnitten in Trocknungslösung angefeuchtet und plan auf eine Plexiglasscheibe gelegt. Das Gel wurde erst in die Lösung getaucht, anschließend zwischen zwei Zellglasfolien gelegt und ü.N. getrocknet.

### Trocknungslösung

50 % Methanol  
5 % Glycerin  
H<sub>2</sub>O

## 2.2.9 Übertragung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (*Western Blot*, Towbin et al., 1979)

### 2.2.9.1 Transfer im Halbtrocken-Verfahren

Proteine wurden mit dem Semi-Dry-Transfer-Verfahren (Halbtrocken-Transfer) in einer Kammer der Firma Biorad auf Membranen übertragen. Dazu wurde das Gel auf eine mit Towbinpuffer befeuchtete Nitrozellulosemembran überführt und auf drei mit Towbinpuffer getränkte 3 MM Whatman-Filterpapiere gelegt. Der Stapel mit dem Gel wurde luftblasenfrei auf die Anode der Blotkammer gelegt. Der Stapel wurde mit drei weiteren in Towbinpuffer getränkten 3 MM Whatman-Filterpapier überschichtet. Dann wurde die Kammer mit der Kathode verschlossen und der Transfer über 20-60 min je nach Gelgröße bei 10 V bis 15 V durchgeführt.

### Towbinpuffer

39 mM Glycin  
48 mM Tris/HCl, pH 8,3  
20 % Methanol

### 2.2.9.2 Transfer im Nassverfahren

Besonders für große Proteine (>100 kDa) ist das Semi-Dry-Verfahren (2.2.9.1) nicht sehr effizient. Daher wurden größere Proteine im Nassverfahren transferiert. Der wie in 2.2.9.1 zusammengesetzte Blotstapel wurde zwischen zwei aus Drahtnetz bestehenden Elektroden gelegt. Um eine gleichmäßige Druckverteilung zwischen

Membran und Gel zu gewährleisten, wurde unmittelbar an den Elektroden je ein Schwamm mit eingebunden. Der Transfer erfolgte in einer mit Transferpuffer gefüllten Blotkammer über Nacht bei 4 °C und 10 V.

#### Transferpuffer

25 mM	Tris
192 mM	Glycin
10 %	SDS
20 %	Methanol

### 2.2.10 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Die Nitrozellulosemembran wurde nach dem *Western Blot* für 3 min bei RT in einer PonceauS Lösung (0,2 % in 0,1 % Essigsäure) schüttelnd inkubiert und dann kurz in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen. Die Nachweisgrenze der reversiblen Färbung liegt bei etwa 1-2 µg Protein. Banden der Standardproteine wurden markiert. Die PonceauS Färbung wurde vollständig mit NCP entfernt. Nach einer Stunde Blockieren mit 5 % Milchpulver in NCP wurden unspezifische Bindungsstellen der Membran abgesättigt. Anschließend wurde die Membran für mindestens 1 h mit einem spezifischen Primärantikörper inkubiert, der in optimaler Konzentration eingesetzt wurde. Nach Inkubation wurde die Membran 3x 10 min mit NCP gewaschen. Der sekundäre, an Peroxidase gekoppelte Antikörper (Tabelle II-5) wurde ebenfalls für 1 h mit der Membran inkubiert. Er erkennt den Fc-Teil des ersten Antikörpers und kann durch Chemilumineszenz detektiert werden. Abschließend wurde 3x 5 min mit NCP gewaschen und die Membran der Chemilumineszenz Detektionsmethode unterzogen.

### 2.2.11 Chemilumineszenz Detektion

Die an die Sekundärantikörper konjugierte Peroxidase katalysiert unter alkalischen Bedingungen die Oxidation von Luminol. Als direktes Reaktionsprodukt entsteht eine elektronisch angeregte Form des 3-Aminophthalats, das bei Relaxation in den elektronischen Grundzustand Strahlung emittiert. Diese reicht aus, um einen Röntgenfilm zu belichten. Die Membran wurde kurz in der Chemilumineszenz-Lösung inkubiert und ein Röntgenfilm (Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL, Amersham) für 5 s bis ü.N. exponiert. Alternativ wurde das „*SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat*“ Kit von der Firma Pierce nach Herstellerangaben verwendet.

### Chemilumineszenz-Lösung

2 ml	1 M Tris/HCl, pH 8,0
200 µl	Luminol (3-Aminonaphtylhydrazid; 0,25 M in DMSO)
89 µl	p-Cumarsäure (0,1 M in DMSO)
18 ml	Wasser
5,6 µl	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung (30 %)

## 2.2.12 Entfernung der Antikörper nach Immundetektion

Durch diese Methode werden primäre und sekundäre Antikörper von einer zuvor zur Immundetektion verwendeten *Western Blot* Membran entfernt. Dafür wurde die Membran 2x 5 min bei RT in 0,5 M NaOH geschüttelt und anschließend mehrmals mit NCP-Puffer ausgiebig gewaschen. Die Membran steht nun für eine erneute Immunmarkierung und Detektion von Proteinen (2.2.10, 2.2.11) zur Verfügung. Alternativ wurde das „*Western Blot Recycling Kit*“ der Firma Chemicon nach Herstellerangaben eingesetzt.

## 2.3 Mauspräparation

### 2.3.1 Präparation von Mäusen

Adulte Mäuse wurden durch Genickbruch getötet. Die Gewebe wurden unmittelbar entnommen und sofort weiterverarbeitet. Der Dünndarm (vom Magen bis zum Blinddarm) wurde in seiner Länge gemessen und in drei gleich lange Stücke geteilt. Diese entsprechen Duodenum, Jejunum und Ileum. Der Dickdarm wurde direkt am Blinddarm und distal nahe am Rektum entnommen. Alle Stücke wurden mit kaltem PBS gespült. Für die RNA Isolierung (~30 mg) oder Proteinextraktion (~1 cm) wurde das entsprechende Gewebe in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße oder Plastikröhrchen überführt, anschließend wurden sie in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert. Gewebe für histologische Analysen wurden in entsprechende Fixierlösungen überführt (2.5.1).

### 2.3.2 Herstellung von Gewebelysaten

Die Herstellung von Gewebelysaten erfolgte nach Fujita (Fujita et al., 2006). Zur biochemischen Analyse wurden alle Dünndarmsegmente mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 2 ml eiskaltem hypotonen NaHCO<sub>3</sub> Puffer (1 mM NaHCO<sub>3</sub>,



1 mM PMSF, pH 7,5) gelegt. Es erfolgte eine Sonifizierung für zweimal 10 s (100 % Amplitude, dauerhafte Beschallung; Ultraschallprozessor UP, Fa. Dr. Hielscher). Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde SDS-PAGE Probenpuffer hinzugegeben und 10 min bei 95 °C im Heizblock erhitzt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (3 min, 21000 xg, RT) und Auftrennung einer Probe mittels SDS-PAGE. Das Lysat wurde bei -20 °C gelagert.

#### 2x Probenpuffer für SDS-PAGE

100 mM Tris/HCl (pH 6,8)  
4 % SDS  
0,2 % Bromphenolblau  
20 % Glycerin  
10 %  $\beta$ -Mercaptoethanol

### 2.3.3 Isolierung von Darmepithelzellen (modifiziert n. Weiser (Weiser, 1973))

Zur Isolierung von Darmepithelzellen wurde das Lumen eines frisch entnommenen Dünndarms mit 154 mM NaCl und 1 mM DTT gespült und in drei gleich große Stücke geschnitten. Jeweils ein Ende wurde mit einem Faden verschlossen, so dass die Darmsegmente mit PBS gefüllt werden konnten. Nachdem die anderen Enden auch mit einem Faden verschlossen waren, wurden die Darmstücke in PBS gelegt und in einem Wasserbad für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Darmsegmente an einem Ende geöffnet und das PBS abgeschüttet. Sie wurden dann mit PBS, 1,5 mM EDTA und 0,5 mM DTT gefüllt und für 30 min bei 37 °C wie zuvor im Wasserbad inkubiert, so dass sich die Epithelzellen ablösen konnten. Die resultierende Suspension wurde in einem sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäß durch vorsichtiges Pressen des Dünndarmes gesammelt. Die Epithelzellen wurden durch Zentrifugation (900 xg, 5 min) sedimentiert. Eine Probe des resultierenden Sediments wurde zur Kontrolle mit Phasenkontrast mikroskopisch angesehen. Das Sediment wurde 2-3x mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend in PBS homogenisiert (Homogenisator, Braun).

## 2.3.4 Isolierung des Bürstensaums aus Darm

### 2.3.4.1 Methode 1 nach Ferrary (Ferrary et al., 1999)

Der Bürstensaum wurde aus dem gesamten mit PBS gewaschenen Dünndarm präpariert. Der Darm wurde längs geöffnet und die Mukosa mit Hilfe eines Deckgläschens bei 4 °C abgeschabt. Die Mukosa wurde in 10 Vol/mg Puffer A verdünnt und 1 h bei 4 °C auf einem Magnetrührer gerührt. Anschließend erfolgte ein mechanischer Zellaufschluss mittels Homogenisator (Braun). Das Homogenat wurde zentrifugiert (1000 xg, 10 min, 4 °C) und das resultierende Pellet dreimal mit 10 ml Puffer A gewaschen. Für eine bessere Isolierung wurde der Bürstensaum mit Hilfe eines Saccharosegradienten gereinigt. Das Pellet wurde mit Puffer B auf 5 ml aufgefüllt und mit einer Saccharoselösung (40 % Endkonzentration) gemischt. Diese Probe wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, das das gleiche Volumen mit 65 % Saccharose in Puffer B enthält. Nach einer anschließenden Zentrifugation (15.000 xg, 30 min 4 °C) befindet sich der aufgereinigte Bürstensaum in der Interphase (40 %:65 %) des Saccharosegradientens.

#### Puffer A

10 mM Imidazol, pH 7,4  
5 mM EDTA  
1 mM EGTA  
0,2 mM DTT  
Protease Inhibitor Cocktail (Sigma)

#### Puffer B

10 mM Imidazol, pH 7,4  
75 mM KCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM EGTA  
Protease Inhibitor Cocktail (Sigma)

### 2.3.4.2 Methode 2 modifiziert nach Mooseker sowie McConnell (Mooseker und Tilney, 1975; McConnell und Tyska, 2007)

Der Dünndarm von zwei adulten Mäusen (jeweils ~30 g) wurde isoliert, in drei Teile geschnitten und in eiskalte Salzlösung gegeben. Die Stücke wurden mit der Salzlösung gespült und anschließend der Länge nach geöffnet. Die resultierenden Segmente wurden in kleinere Stücke geschnitten (~2 cm) und in ein Becherglas mit 20 ml eisgekühlter Saccharose Dissoziationlösung (SDL) überführt. Im Kühlraum wurde dieses für 30 min gerührt. Der Epithelzellen enthaltene SDL Puffer wurde zentrifugiert (300 xg, 8 min) und währenddessen erneut 20 ml SDL Puffer zum Sediment in das Becherglas gegeben und gerührt. Die zweiten 20 ml wurden zu dem ersten Zellsediment gegeben. Die isolierten Epithelzellen wurden 3x mit SDL Puffer gewaschen und durch Zentrifugation (300 xg, 8 min, 4 °C) sedimentiert. Das

Zellsediment wurde in 20 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert und zweimal in einem elektrischen Homogenisator (2x 15 s, maximale Geschwindigkeit) homogenisiert. Der Homogenisator wurde einmal mit 20 ml Stabilisierungspuffer gewaschen und dies wurde mit den isolierten Epithelzellen gemischt. Anschließend wurde das Homogenat zentrifugiert (1000 xg, 8 min), um den Bürstensaum zu sedimentieren. Der sedimentierte Bürstensaum wurde 4x mit dem Stabilisierungspuffer (1000 xg, 8 min) gewaschen.

#### Salzlösung

2 mM Imidazol, pH 7,2  
150 mM NaCl

#### Saccharose Dissoziationslösung (SDL)

200 mM Saccharose  
12 mM EDTA  
19 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
78 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

#### Homogenisierungspuffer

10 mM Imidazol, pH 7,2  
4 mM EDTA  
1 mM EGTA  
1 mM DTT  
Protease Inhibitor Cocktail (Sigma)

#### Stabilisierungspuffer

10 mM Imidazol, pH 7,4  
75 mM KCl  
5 mM  $\text{MgCl}_2$   
1 mM EGTA  
1 mM DTT  
Protease Inhibitor Cocktail (Sigma)

### 2.3.5 Kontraktion des Bürstensaums (McConnell und Tyska, 2007)

Eine Durchströmungskammer wurde mit Hilfe eines Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen, das mit doppelseitigem Klebeband an einem Objektträger befestigt wurde, hergestellt. Zwei parallele Streifen des Klebebandes wurden an entgegengesetzten Seiten des Deckgläschens befestigt, so dass an den beiden anderen Seiten ein 5 mm breiter Spalt bestehen blieb. Auf Eis gehaltener isolierter Bürstensaum wurde in den Spalt eingespritzt und 5 min inkubiert, um ein Absetzen zu ermöglichen. Anschließend wurde intensiv mit Stabilisierungspuffer (2.3.4.2) gewaschen. Die Durchströmungskammer wurde dann unter ein Mikroskop (Epifluoreszenz Mikroskop, Leica DM 6000B) gestellt und der adhärente Bürstensaum mittels Interferenzmikroskopie betrachtet. Filme wurden erstellt, indem ein Bild alle 5 s für 15 min aufgenommen wurde. Nach ungefähr 3 min Aufnahme wurde Stabilisierungspuffer mit 200  $\mu\text{M}$  ATP mittels Pipette eingespritzt, um die ATP-freie Lösung zu ersetzen. Der Film wurde ohne weitere Manipulation aufgenommen. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe einer CCD Kamera (Roper CoolSnap HQ) gesteuert durch Metamorph Software am Institut Curie, Paris aufgenommen.

### 2.3.6 Gewinnung von Blutproben

Für die Gewinnung von Blutproben wurden die Mäuse über Nacht ohne Futterzugang gehalten. Nachdem eine Maus durch Genickbruch getötet worden ist, wurde der Brustkorb geöffnet und das Herz aufgeschnitten. Ein Tropfen Blut wurde auf einen Glukoseteststreifen gegeben und die Bestimmung des Blutglukosespiegels erfolgte in einem Glukosemessgerät (Accutrend®GCT, Roche). Für weitere klinisch biochemische Analysen wurde das restliche Blut in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für die Blutgerinnung 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das geronnene Blut zentrifugiert (10.000 xg, 10 min), das Serum (Überstand) vorsichtig abgenommen und in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Das Serum wurde bei -20 °C gelagert. Zur weiteren Analyse wurde das Serum 1:5 in PBS verdünnt und zur klinischen Chemie (Uniklinik Köln) gegeben.

Die Analysen erfolgten in einem Cobas Integra 700 Instrument (Roche Diagnostics) mit Roche Reaktionskits unter Messbedingungen definiert durch die „*International Federation of Clinical Chemistry*“ bei 37 °C.

## 2.4 *In vivo* Analysen

### 2.4.1 Messung von Körpergewicht und Länge

Das Körpergewicht wurde mit einer Feinwaage gemessen. Für die Messung der Körperlänge wurden die Mäuse nach Genickbruch mit angewinkelten Extremitäten auf den Bauch gelegt. Die Länge eines Tieres wurde von der Nasenspitze bis zum Anus erfasst.

### 2.4.2 Untersuchung der Nahrungsaufnahme und Kotabgabe

Adulte Tiere wurden 24 h nicht gefüttert bevor ihnen eine definierte Futtermenge in die dafür vorgesehene Käfighalterung gegeben worden ist. Nach 6 h Fütterung wurde der Kot aus jedem Käfig eingesammelt und abgewogen. Über 7 Tage wurde alle 24 h das verbliebene Futter gewogen und so die durchschnittlich aufgenommene Nahrungsmenge über einen Zeitraum von 24 h ermittelt. Der Versuch wurde dreimal mit unterschiedlichen Tiergruppen wiederholt, wobei alle immer in ähnlichem Alter und Anzahl verwendet worden sind. Die Tiere hatten jederzeit Zugang zu Trinkwasser.

### 2.4.3 Fasten mit anschließender Fütterung (*fasting and refeeding*, Ferrary et al., 1999)

Adulte Tiere wurden nach 24 h Nahrungskarenz oder nach anschließender 1 h Fütterung durch Genickbruch getötet. Der Dünndarm wurde wie unter 2.3.1 beschrieben entnommen und Proben des Jejunums für die histologische Analyse verwendet.

### 2.4.4 Basolaterale Infusion von Carbachol (Ferrary et al., 1999)

Zur Durchführung des pharmakologischen Experimentes wurden die Tiere mittels *intra peritonealen* Injektion von Ketavet narkotisiert. Für die basolaterale Infusion wurde eine Darmschleife vorsichtig herausgenommen und in eine Petrischale mit 1  $\mu$ M Carbachol (Sigma) in PBS (versetzt mit 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ) gelegt und 20 min inkubiert. Die Darmschleifen der Kontrolltiere wurde in PBS (1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ) gelegt. Das Experiment wurde wiederholt mit zwei Wildtyp und zwei I-Plastin defizienten Mäusen. Nach der Inkubation wurden die Tiere durch Genickbruch getötet und die Darmschleife für die histologische Analyse entnommen.

#### Ketavet

9 ml 0,9 % Kochsalzlösung  
1 ml Ketavet® (100 mg/ml)  
0,5 ml 2 % Rompun

### 2.4.5 Induktion einer Kolitis mittels DSS

Dextran Natrium Sulfat (DSS, 2,5 % wt/vol, Molekulargewicht wt 40000; ICN Biodmedical) wurde 29 Wildtyp und 29 I-Plastin defizienten Tieren für 13 Tage fortlaufend über das Trinkwasser verabreicht. Die Prozedur ist dafür bekannt, dass sie eine epitheliale Kolitis induziert (Mashimo et al., 1996). Die Tiere wurden alle 2 Tage gewogen. Das Überleben der Tiere wurde über einen Zeitraum von 13 Tagen beobachtet. Die Überlebenskurve wurde mittels Kaplan Meier analysiert. Am Tag 13 noch lebende Tiere wurden durch Genickbruch getötet und Darmproben zur histologischen Untersuchung entnommen.

### 2.4.6 Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Für die Infektion von adulten Mäusen wurde *Listeria monocytogenes* eingesetzt (Utermohlen et al., 2003). Die Mäuse wurden 24 h nicht gefüttert anschließend erfolgte die Infektion am Institut für Mikrobiologie der Medizinischen Fakultät (Universität Köln) unter Leitung von PD Dr. Olaf Utermohlen. Für die Infektion wurde der *L. monocytogenes* Stamm EGD, serotyp 1/2a verwendet. Bakterielle Einzelkolonien wurden in *brain-heart infusion* (BHI) Medium angeimpft und Aliquots von sich vermehrenden, in der log-Phase befindlichen, Bakterien wurden bei -80 °C gelagert. Für jedes Experiment wurde ein Aliquot frisch aufgetaut, ü.N. in BHI Medium inkubiert, in frischem BHI Medium resuspendiert und in der *mid-log*-Phase geerntet. Die Bakterien wurden 1x in PBS gewaschen und die Dichte (OD<sub>600</sub>) gemessen. Die *intra gastrale* (*i.g.*) Inokulation erfolgte mit 5x10<sup>9</sup> Bakterien. Verschiedene Verdünnungen des Inokulats wurden auf Blutagarplatten ausplattiert, um die *Colony Forming Units* (CFU) zu quantifizieren und somit die Konzentration der Bakterien zu bestimmen. Das Experiment wurde 5x durchgeführt und insgesamt wurden 24 Wildtyp und 26 I-Plastin defiziente Mäuse analysiert. Zur Bestimmung der aufgenommenen Bakterienmenge in der Leber wurden drei Mäusen je Genotyp 48 h nach der Infektion getötet. Die Leber wurde unter sterilen Bedingungen entnommen, in 0,05 % Triton X-100 homogenisiert, 5 min bei 4 °C sonifiziert und mit Hilfe eines Spiralplattengeräts auf Blutagarplatten ausplattiert.

### 2.4.7 Infektion mit *Shigella flexneri*

Die Infektion wurde am Institut für Mikrobiologie der Medizinischen Fakultät (Universität Köln) unter Leitung von PD Dr. Olaf Utermohlen durchgeführt. Die Methode wurde modifiziert nach Athman (Athman et al., 2005). Für die *in vivo* Analyse wurden zwei *S. flexneri* Stämme (zur Verfügung gestellt von P. Sansonetti; Institut Pasteur, Paris) verwendet: M90T, eine invasive Form, die dem serotyp 5a angehört und BS176, ein nicht-invasives Derivat. Beide Stämme wurden in *trypticase soy broth* (TCS, Diagnostics Pasteur, Marnes la Coquette, Frankreich) bei 37 °C und Luftzufuhr gehalten. Für eine *i.g.* Inokulation wurde eine Übernachtskultur auf Kongorotplatten gezogen und in Serum angeimpft, um eine bakterielle Suspension zu erhalten.

Für die Infektion wurden drei Tage alte Mäuse verwendet. Die Tiere wurden 2 h vorher von den Müttern getrennt und mit 50 ml Bakteriensuspension *i.g.* inokuliert. 2-3 h nach der Infektion wurde die Mutter wieder zu den Neugeborenen gesetzt, um sicherzustellen, dass sie nicht aufgrund von Unterkühlung sterben. Die Tiere wurden nach

der Inokulation beobachtet, um den Zeitpunkt des Todes festzustellen. Mäuse, die innerhalb der ersten drei Stunden nach der Infektion starben, wurden aus der Wertung genommen, da fehlerhafte Inokulation zum Tod führen kann. Der Versuch wurde je Genotyp 3x durchgeführt. Insgesamt wurden 21 Neugeborene Wildtyp und 30 Neugeborene I-Plastin defiziente Tiere verwendet.

## 2.5 Histologische Analysen

### 2.5.1 Präparation von Gefrier- und Paraffinschnitten

Zur Anfertigung von Gefrierschnitten wurden die entnommenen Gewebe kurz in PBS gewaschen, in Tissue-Tek-Einbettlösung (Sakura) auf Trockeneis eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die Blöcke wurden bei -20 °C in einem Kryostat (Leica, CM3050) mit einer Schnittdicke von ca. 7 µm geschnitten. Bis zur immunhistologischen Färbung wurden die Schnitte bei -20 °C aufbewahrt.

Zur besseren Erhaltung der Gewebestruktur wurde das Gewebe chemisch fixiert. Dazu wurde das Gewebe 2 h bei 4 °C in Afa (5 % Essigsäure, 75 % Ethanol, 2 % Formaldehyd von der Fa. VWR) inkubiert.

Zur Paraffineinbettung wurde das fixierte Gewebe vorab in PBS gewaschen. Anschließend wurden in einem Einbettautomaten (Citadell 1000, Shandon) folgende Schritte bei RT durchgeführt: Das Gewebe wurde in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert, in Xylol überführt, mit Paraffin (Richard-Allan Scientific) infiltriert und eingebettet.

Ethanolreihe: 1x 70 %, 80 %, 90 % und 96 sowie 3x 100 % jeweils 1 h RT

Xylol: 1x 45 min und 1x 30 min RT

Paraffin: Typ 3: 2 h 60 °C (Vakuum)

Typ 6: 3 h 60 °C (Vakuum)

Mittels Gießstation wurde anschließend das Gewebe in Plastikgussformen mit flüssigem Paraffin (Typ 9) übergossen, ausgerichtet und zur Aushärtung für 3 h auf einer Kühlplatte bei 4 °C inkubiert. Die Paraffinblöcke wurden bei 4 °C im Kühlraum gelagert.

Von dem in Paraffin eingebetteten Gewebe wurden 4 µm dicke Schnitte mit Hilfe eines Mikrotoms (Microtom GmbH) angefertigt. Die Schnitte wurden zur Streckung 2 min in einem 42 °C warmen Wasserbad inkubiert und anschließend auf Objektträger (SuperFrost®Plus, Roth) gezogen. Diese wurden über Nacht bei 37 °C auf einem Strecktisch getrocknet und dann bei 4 °C gelagert.

## 2.5.2 Entparaffinierung

Zur vollständigen Entparaffinierung wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten in folgenden Lösungen bei RT inkubiert:

Xylol:	2x 5 min
Isopropanol oder 100 % Ethanol:	2x 5 min
Ethanol-Reihe:	96%, 70%, 50% jeweils 3 min
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> :	2 min
PBS:	5 min

## 2.5.3 Hämatoxylin und Eosin (HE) Färbung

Als gebräuchlichste Übersichtsfärbung gilt die HE Färbung. Hämatoxylin (hier: Eisenlack) ist ein bei niedrigem pH Wert positiv geladener Farbstoff, welcher negativ geladene Strukturen anfärbt. Eosin ist ein negativ geladener Farbstoff und dient zur Gegenfärbung. Es wurden die entparaffinierten Schnitte zunächst für 7 min mit Hämatoxylin gefärbt, danach etwa 10 min unter fließendem Leitungswasser bis zum Auftreten einer Blaufärbung gewaschen und dann mit 0,5 % Eosin für 3 min gegengefärbt. Zur Entwässerung folgte jeweils eine 2 min Inkubation in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 96 %), Isopropanol sowie Xylol. Die Präparate wurden in *Permount (Histological Mounting Medium, Fisher Scientific)* eingedeckt. Durch die HE Färbung erscheinen die Zellkerne blau-schwarz, das Zytoplasma blassrot, das Muskelgewebe rot, und Bindegewebe rot bis blassrosa-rot.

## 2.5.4 Immunfluoreszenz und immunhistochemische Färbungen

Zur Detektion verschiedener Proteine in Geweben wurden die Paraffin- und Gefrierschnitte auf den Objektträgern zunächst mit einem Fettstift (Dako) umrandet. Bei den Paraffinschnitten wurden je nach Spezifität des gewählten Antikörpers die Epitope entweder mittels HIER (*heat induced epitope retrieval*: 2x 20 min bei 95 °C in



10 mM Citratpuffer, pH 6,0) oder Trypsin-Behandlung (10 min bei 37 °C in 0,1 % Trypsin/0,1 % CaCl<sub>2</sub>-Lösung, Stoppen der Reaktion mit Leitungswasser) zugänglich gemacht. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch Blockieren in 5 % FCS in PBS (20 min, RT) abgesättigt. Die Inkubation des Primärantikörpers, welcher in 5 % FCS/PBS Lösung verdünnt wurde, erfolgte für 1 h bei RT oder bei 4 °C ü.N. Die Präparate wurden dann 5x mit PBS gewaschen und je nach Färbemethode weiterbehandelt.

#### 2.5.4.1 Fluoreszenz

Die Paraffin- und Gefrierschnitte wurden mit an Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Sekundärantikörpern sowie ggf. mit DAPI (1:10.000 Verdünnung einer 5 mg/ml Lösung 4',6-Diamidino-2-phenylindole in Dimethylformamid, Sigma) oder Propidiumjodid (1:1000 Verdünnung einer 1 mg/ml Lösung, Fluka) im Dunkeln inkubiert (1 h, RT). Die Verdünnung des Sekundärantikörpers erfolgte in 5 % FCS/PBS.

Danach wurden die Schnitte 5x mit PBS gewaschen, die Eindeckelung erfolgte mit Eindeckmedium (Dako Mounting Medium) und die Schnitte wurden bis zur mikroskopischen Analyse bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

#### 2.5.4.2 Peroxidase

Nach Inkubation mit einem Primärantikörper wurde das „*Super Sensitive™ IHC Detection Kit*“ von BioGenex nach Herstellerangaben verwendet. Das Kit benutzt die Streptavidin-biotin Technologie, bei der der an den Primärantikörper gebundene biotinylierte Sekundärantikörper mit einem Enzym gelabelten Streptavidin reagiert und mittels Chromogen sichtbar gemacht wird.

#### 2.5.4.3 Phalloidinfärbung von Gefrierschnitten

Zur Detektion von F-Aktin in Gefrierschnitten wurde das Gewebe auf den Objektträgern zunächst mit einem Fettstift (Dako) umrandet. Anschließend folgte eine Fixierung mit 2-3 % PFA für 20 min bei RT. Das PFA wurde durch 2x waschen mit PBS für 5-10 min entfernt und die Schnitte für 10 min mit 20 mM NH<sub>4</sub>Cl/PBS inkubiert. Nach 2x 5 min waschen mit PBS wurde das Gewebe durch Inkubation mit 0,1 % Triton-X100 permeabilisiert. Anschließend wurde das Triton-X100 durch 2x waschen mit PBS entfernt und für 1 h mit 2 % BSA/PBS inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

Danach wurde nochmals 2x 5 min mit PBS gewaschen bevor F-Aktin durch FITC-Phalloidin gefärbt wurde (im Dunkeln für 30 min mit einer 1:200 Verdünnung der 1 mg/ml Lösung). Zum Schluss wurde 2x 5 min mit PBS gewaschen und mit Eindeckmedium (Dako Mounting Medium) eingedeckelt. Die Schnitte wurden bis zur mikroskopischen Analyse im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

### 2.5.5 TUNEL-Färbung (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling)

Die Detektion apoptotischer Zellen erfolgte mit dem DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega) nach Angaben des Herstellers. Diese Methode beruht auf der enzymatisch katalysierten Inkorporation von Fluorescein-12-dUTP an die 3' OH-Enden der fragmentierten DNA mittels der terminalen Deoxynukleotidyl Transferase (TdT) (Gavrieli et al., 1992). Für die Positivkontrolle wurden einige Paraffinschnitte mit DNaseI nach Herstellerangaben inkubiert, um eine DNA-Fragmentierung zu induzieren. In der Negativkontrolle wurde anstelle von der Transferase H<sub>2</sub>O verwendet.

### 2.5.6 BrdU-Färbung

Mittel der Wahl hierzu ist das seit den 70er Jahren benutzte Bromodesoxyuridin (BrdU), ein Analogon des Nukleinsäurebausteins Thymidin, das in die Kerne sich teilender Zellen, also in die Zellen der Krypten, eingebaut wird und durch geeignete Methoden nachgewiesen werden kann. Den adulten Mäusen wurde BrdU in einer Menge von 100 mg/kg Körpergewicht *intra peritoneal*, in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst in sterilem PBS, injiziert. Die Tiere wurden 2 h, 24 h bzw. 48 h nach Injektion durch Genickbruch getötet, der Darm entnommen und für die histologische Untersuchung verwendet. Für jeden Zeitpunkt wurden drei Tiere/Genotyp und drei Darmstücke des Jejunums untersucht. Die Wanderung der BrdU-positiven Kerne (Migrationsweite) wurde gemessen und in das Verhältnis zur Villuslänge gesetzt.

### 2.5.7 Färbung von isoliertem Bürstensaum des Darms

Um F-Aktin in dem isolierten Bürstensaum zu färben, wurden 100 µl Bürstensaum-suspension mit 0,5 µl FITC-Phalloidin (1 mg/ml in Methanol) für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (1000 xg 4 °C) wurde der Überstand verworfen und 3x mit Stabilisierungspuffer (2.3.4.2) gewaschen. Das resultierende Sediment wurde in 150 µl Stabilisierungspuffer aufgenommen und mikroskopisch analysiert.

## 2.6 Elektronenmikroskopie

Zur ultrastrukturellen Untersuchung der Darmepithelzellen wurden Darmsegmente sowohl mittels Transmissionselektronenmikroskopie als auch mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie analysiert. Diese Analysen wurden am Institut Curie und am Institut Pasteur (Paris in Kollaboration mit Dr. Sylvie Robine) durchgeführt.

### 2.6.1 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Kleine Darmgewebestücke (~1-2 mm) wurden für 2 h bei RT in 2,5 % Glutaraldehyd und 2 % PFA in Cacodylatpuffer (80 mM, pH 7,2, 0,05 %  $\text{CaCl}_2$ ) fixiert. Nachdem das Gewebe mit Cacodylatpuffer gewaschen worden ist, wurde es mit 1 %  $\text{OsO}_4$  und 1,5 % Kalium-Eisencyanid in Cacodylatpuffer (30 min, 4 °C) nachfixiert. Anschließend wurde das Gewebe 1 h bei RT mit 2 % Uranylacetat in 40 % Ethanol inkubiert. Das Gewebe wurde über einen Ethanolgradienten dehydriert und in Epon eingebettet bevor Ultradünnschnitte gemacht wurden. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe eines Philips CM120 Transmissionselektronenmikroskops (FEI) gemacht. Die Bearbeitung und Messungen erfolgten mittels iTEM Software.

### 2.6.2 TEM an isoliertem Bürstensaum

Isolierter Bürstensaum (2.3.4) wurde in Stabilisierungspuffer (mit 15 mM  $\text{MgCl}_2$ ) inkubiert. Zum Absetzen wurden sie für 1 h bei 4 °C auf Poly-L-Lysin beschichteten Glasdeckgläschen inkubiert. Die Deckgläschen wurden einmal gewaschen, bevor sie in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) mit 2 % Glutaraldehyd und 2 mg/ml Gerbsäure für 1 h fixiert wurden. Anschließend wurden sie mit PBS gewaschen, mit 1 %  $\text{OsO}_4$  in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 6,0) für 45 min nachfixiert und danach in 0,5 % Uranylacetat für 2 h inkubiert. Der Bürstensaum wurde über einen Ethanolgradienten dehydriert, in Epon eingebettet und Ultradünnschnitte hergestellt.

### 2.6.3 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Zur Analyse von Oberflächenstrukturen wurden 1 cm lange Darmstücke geöffnet und 2 h bei RT in 2,5 % Glutaraldehyd und 2 % PFA in Cacodylatpuffer (80 mM, pH 7,2, 0,05 %  $\text{CaCl}_2$ ) fixiert. Anschließend wurde mit Cacodylatpuffer gewaschen, mit 1 % Osmium und 1,5 % Kalium-Eisencyanid in Cacodylatpuffer (30 min, 4 °C) nachfixiert

und 1 h bei RT mit 2 % Uranylacetat in 40 % Ethanol inkubiert. Das Gewebe wurde über einen Ethanolgradienten dehydriert, am kritischen Punkt (mit Hilfe der flüssigen CO<sub>2</sub> Methode) getrocknet und mit Gold-Palladium beschichtet. Die Aufnahmen wurden mit einem JEOL 35CF Rasterelektronenmikroskop erstellt.

## 2.7 Auswertung

### 2.7.1 Mikroskopie

Für die normale Fluoreszenzmikroskopie wurde das Fluoreszenzlichtmikroskop DMR mit der Kamera DC 350 FX der Firma Leica benutzt und das Programm *irfanview* (<http://www.irfanview.de/>) für Aufnahmen verwendet. Für Durchlichtaufnahmen wurde dasselbe Mikroskop verwendet aber mit einer HV-C20A Hitachi Kamera und die Aufnahmen wurden mit Hilfe des Programmes Diskus (Hilgers) gemacht. Für die konfokale Lasermikroskopie wurde das von der Firma Leica entwickelte CLSM-SP Mikroskop benutzt, das optische Schnittebenen durch die Präparate erlaubt. Das Gerät ist mit einem Helium/Neon- und einem Argonlaser ausgestattet und ermöglicht eine Anregung bei unterschiedlichen Wellenlängen (488 nm, 568 nm und 647 nm). Die Daten wurden mit dem begleitenden Bildverarbeitungssystem der Firma Leica weiterverarbeitet. Es wurden immer Serienaufnahmen über verschiedene Schnittebenen aufgenommen und anschließend wurden alle Ebenen zu einer maximalen Projektion übereinandergelegt.

### 2.7.2 Bildbearbeitung

Die Bildinformationen der Mehrfach-Immunfluoreszenzaufnahmen aus der Mikroskopie wurden in dem Programm *Adobe Photoshop CS* (Adobe) erstellt. Histochemische Aufnahmen insbesondere von HE und BrdU Färbungen wurden mit dem Programm Diskus (Version 4.20, Hilgers) weiterverarbeitet und die Zelltypzählung (HE) sowie die Messungen (BrdU) konnten damit erstellt werden.

### 2.7.3 Datenbearbeitung

Die in dieser Arbeit dargestellten Graphen wurden mit Excel (*Microsoft Office* 2003) und mit CorelDraw 9 (Corel) erstellt. Für statistische Analysen wurden Excel, SigmaPlot 8 (Systat) und SPSS 15 (SPSS Inc.) verwendet. Sofern nicht anders angegeben wurde ein zweiseitiger ungepaarter Student t-Test durchgeführt und als signifikant gewertet, wenn mindestens  $P \leq 0,05$  war. Im Falle der Sterberaten wurde die Signifikanz mittels *log rank* in SPSS bestimmt und als signifikant gewertet, wenn mindestens  $P \leq 0,05$  war. Ein Standardfehler (SE) wurde wie folgt berechnet:  $SE = \text{Standardabweichung}/(\text{Wurzel aus } n)$ , mit  $n = \text{Probenanzahl}$ , Anzahl unabhängiger Versuche.