

## III Ergebnisse

### 1 Etablierung und Genotypisierung einer I-Plastin defizienten Mauslinie

Die Funktion des Darmes ist abhängig von der Anwesenheit dicht gepackter Mikrovilli. Im Inneren eines Mikrovillus werden die Aktinfilamente durch Villin, Espin und I-Plastin gebündelt. Die Proteinzusammensetzung ist schon seit langem bekannt, allerdings ist bis heute zum Teil nicht klar, welche Funktionen die einzelnen Proteine bei der Assemblierung der Mikrovilli besitzen. Um die Rolle des aktinbündelnden Proteins I-Plastin morphologisch und funktionell zu analysieren, wurde in unserer Arbeitsgruppe eine I-Plastin defiziente Mauslinie generiert. Der I-Plastin-Lokus (PLS1) liegt in der Maus auf Chromosom 9, während L- und T-Plastin sich auf Chromosom 14 bzw. X befinden. Zunächst erfolgte die vollständige Inaktivierung des I-Plastin-Gens in unserer Arbeitsgruppe und in dieser Arbeit wurde dies in der Maus verifiziert.

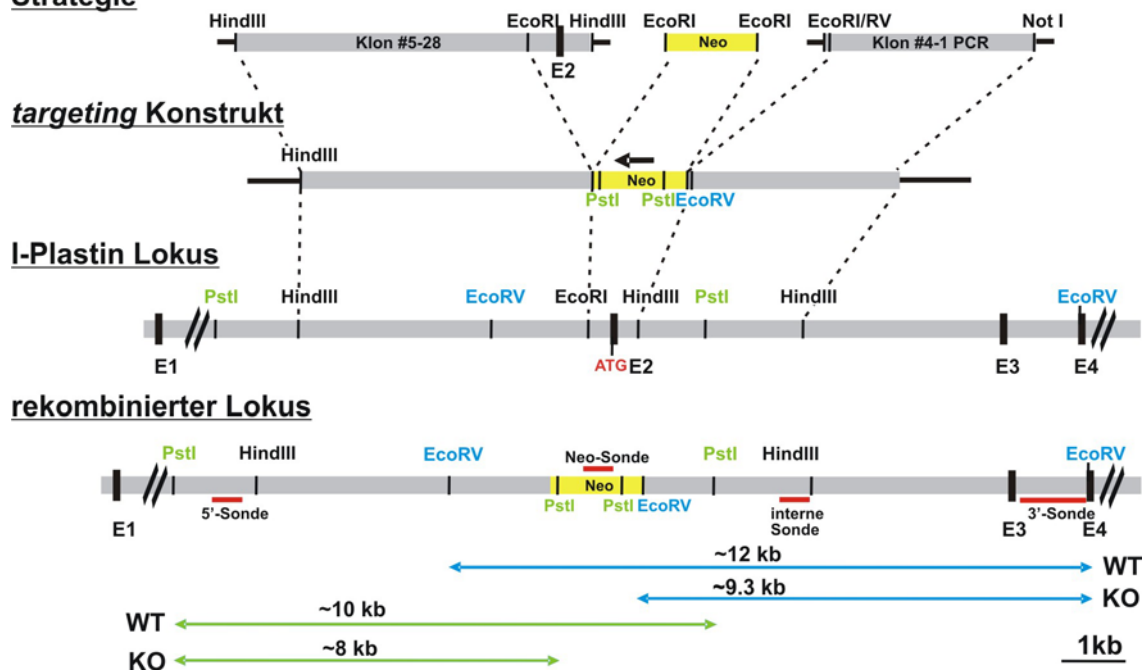
#### 1.1 I-Plastin-*knockout* Strategie

Um die Funktion von Proteinen zu ermitteln, wird im Genom so genannter *knockout*-Mäuse das jeweils entsprechende Gen inaktiviert. Dafür wird als erstes ein *targeting*-Konstrukt erstellt, das neben einem Teil der DNA des entsprechenden Gens auch eine Selektionskassette enthält. Die I-Plastin-*knockout* Strategie ist in Abbildung III-1 dargestellt. Mit Hilfe der homologen Rekombination wurde das erste codierende Exon (E2) des I-Plastin-Gens, welches das Startcodon enthält, durch die Neomycinkassette ersetzt. Zunächst wurde das Konstrukt mittels Klonierung hergestellt. Die 5'- und 3'-Arme des *targeting*-Konstrukts wurden aus einem künstlichen, bakteriellen Chromosom (BAC Klon), das in einer genomischen DNA-Bibliothek mit Hilfe einer I-Plastin-cDNA Sonde identifiziert worden ist, subkloniert. Der 5'-Arm (5,5 kb) war ein HindIII-Subklon, aus dem E2 durch eine EcoRI Restriktionsspaltung herausgeschnitten wurde. Der 3'-Arm (3,4 kb) war ursprünglich ein HindIII-Subklon, der als Matrize für eine PCR-Amplifikation mit eingebauten Restriktionsschnittstellen diente. Diese Schnittstellen wurden verwendet, um den 3'-Arm als ein EcoRI-NotI-Fragment in einen Vektor zu klonieren, der den 5'-Arm beinhaltet.

Unmittelbar hinter der EcoRI-Schnittstelle ist eine EcoRV-Schnittstelle, die für die spätere Genotypisierung eingefügt wurde. Die Neomycinkassette ist über die EcoRI-Schnittstelle zwischen die beiden genomischen DNA-Arme kloniert worden.

Zur Herstellung rekombinanter ES-Zellklone wurde der Vektor mit HindIII linearisiert und mittels Elektroporation in 129SV ES-Zellen transfiziert. Die Sonden für das *screening* und die Genotypisierung wurden durch PCR-Amplifikationen erstellt. Positive ES-Zellklone wurden durch *Southern Blot* Analysen identifiziert und drei unterschiedliche ES-Zellklone wurden in Blastozysten injiziert. Als Blastozystenspender wurde der Inzuchtstamm C57Bl/6 (Fellfarbe schwarz) verwendet. Männliche Chimäre wurden mit C57Bl/6-Weibchen verpaart, um heterozygote I-Plastin defiziente Mäuse zu erhalten. Der I-Plastin defiziente Stamm wurde für acht Generationen mit C57Bl/6 zurückgekreuzt, um einen einheitlichen genetischen Hintergrund zu erhalten.

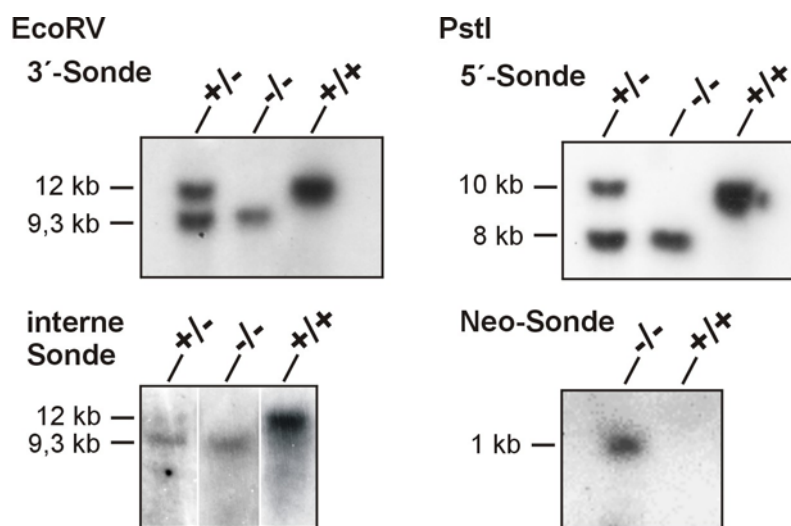
### Strategie



**Abbildung III-1: Generierung der I-Plastin defizienten Mauslinie.** Dargestellt ist der genomische Bereich des I-Plastin-Gens, der zur Generierung des *targeting*-Konstrukts verwendet wurde, die Klonierung des Konstrukts, die relevanten Sonden und Schnittstellen sowie der rekombinierte Lokus. Die Restriktionsschnittstellen wurden wie folgt genutzt: EcoRI: Insertion der Neomycinkassette; PstI: Überprüfung der Orientierung der Neomycinkassette im Konstrukt sowie Analyse der homologen Rekombination mit Hilfe der externen 5'-Sonde und der Neo-Sonde; EcoRV: Ausschließen einer heterologen Integration eines zusätzlichen Konstrukts mit der internen Sonde, Analyse der homologen Rekombination und Genotypisierung in der Routine mit Hilfe der externen 3'-Sonde. Die durch eine PstI- bzw. EcoRV-Restriktionsanalyse resultierenden Fragmentgrößen für den Wildtyp bzw. *knockout* sind abgebildet. E1-E4: Exon 1-4; Neo: Neomycinselektionskassette; ATG: Startcodon im zweiten Exon; WT: Wildtyp; KO: *knockout*.

## 1.2 Genotypisierung

Der Genotyp der Mäuse wurde grundsätzlich über das *Southern Blot* Verfahren bestimmt, das eine sichere Methode darstellt im Gegensatz zur Genotypisierung mittels PCR. Die genomische DNA wurde aus den Schwanzspitzen der Mäuse gewonnen. Die Restriktionsspaltung der genomischen DNA erfolgte entweder mit PstI oder EcoRV. Anschließend wurde mit Hilfe der *Southern Blot* Analyse der Genotyp bestimmt. Die Positionen der Sonden und die aus der Restriktionsanalyse resultierenden Fragmentgrößen sind in Abbildung III-1 dargestellt. Mit Hilfe der externen 3'- und 5'-Sonden wurde die homologe Rekombination bestätigt. Nach einer Restriktionsspaltung mit EcoRV ergibt sich für das Wildtypallel ein 12 kb und für das mutierte Allel ein 9,3 kb langes Fragment. Die Fragmente wurden nach Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten 3'-Sonde (1,2 kb) detektiert (Abbildung III-2). Durch Verwendung einer internen Sonde (462 bp) konnte eine heterologe Integration eines zusätzlichen Konstrukts ausgeschlossen werden. Die EcoRV Restriktionsanalyse mit der 3'-Sonde wurde für die Genotypisierung der Mäuse in der Routine verwendet. Aus einer Restriktionsspaltung mit PstI resultierten für den Wildtyp ein 10 kb Fragment und für den *knockout* ein 8 kb großes Fragment, die mit der 5'-Sonde (565 bp) detektiert wurden. Durch Hybridisierung mit der Neo-Sonde wurde die Neomycinkassette in I-Plastin defizienten Mäusen bestätigt.



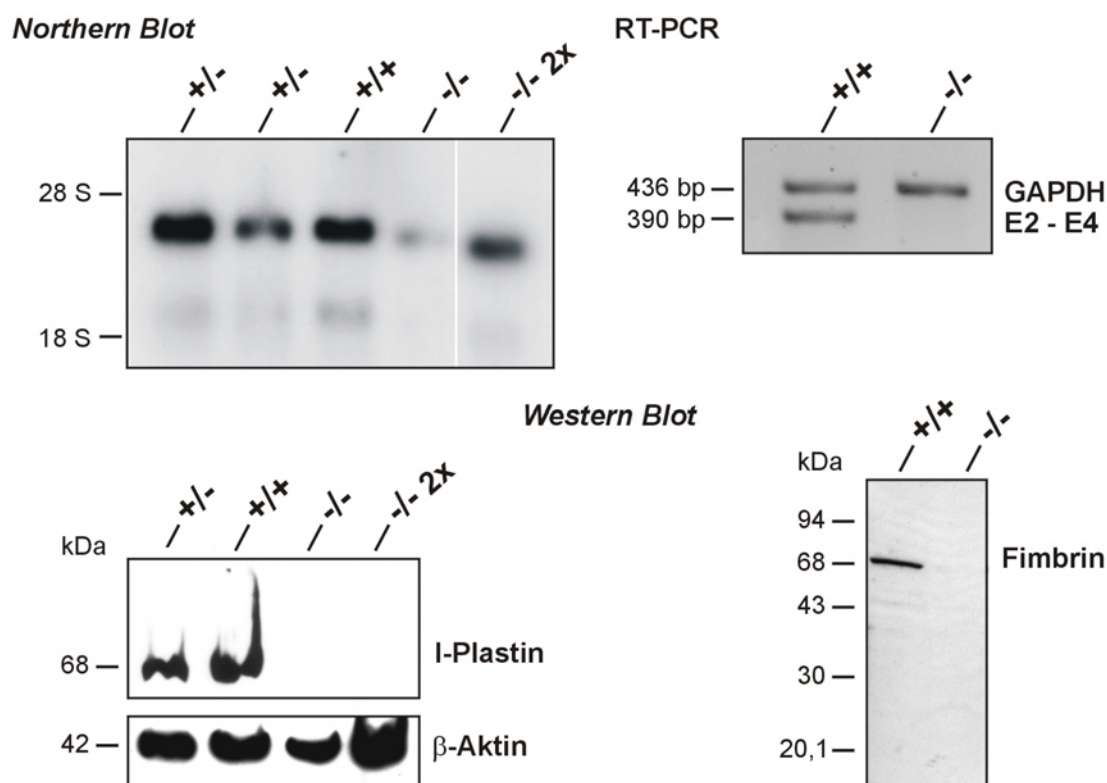
**Abbildung III-2: Genotypisierung der I-Plastin defizienten Mäuse anhand von Southern Blot Analysen an Schwanzspitzenbiopsien.** Die genomische DNA wurde entweder mit EcoRV oder mit PstI geschnitten und im 0,75 %igen TAE Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Nach dem Transfer wurde die Nylonmembran mit spezifischen radioaktiven Sonden (vgl. Abbildung III-1) hybridisiert. Die mittels Autoradiographie detektierten Banden entsprachen den

errechneten Fragmentgrößen wie sie in Abbildung III-1 angegeben wurden. EcoRV: Die 3'-Sonde sowie die interne Sonde erkennen ein 12 kb Fragment im Wildtypallel und ein 9,3 kb Fragment beim mutierten Allel. PstI: Die 5'-Sonde erkennt ein 10 kb Fragment beim Wildtyp und ein 8 kb Fragment beim mutierten Allel. Die Neo-Sonde liefert nur im mutierten Allel ein Signal in Höhe von 1 kb.

### 1.3 Analyse der I-Plastin defizienten Mauslinie auf RNA- und Proteinebene

Die Transkription des I-Plastin Wildtyp- und des mutierten Gens in Darmepithelzellen wurde sowohl durch *Northern Blot* Analyse als auch durch RT-PCR untersucht (Abbildung III-3). In beiden Fällen wurde die Qualität der isolierten RNA über eine denaturierende Agarosegelelektrophorese sowie über die Bestimmung der optischen Dichten bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm überprüft. Für die Analyse der I-Plastin-Expression wurden je Genotyp 10 µg isolierte RNA aus Darmepithelzellen verwendet. Die RNA wurde mittels denaturierender Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe des *Northern Blot* Verfahrens auf eine Nylonmembran transferiert. In einer Spur wurde zur Kontrolle die doppelte Menge RNA aus I-Plastin defizienten Mäusen aufgetragen. Nach Hybridisierung des *Northern Blots* mit einer radioaktiv markierten I-Plastin-cDNA-Sonde ist in Wildtyp- und heterozygoten Mäusen deutlich die I-Plastin-mRNA zu erkennen (Abbildung III-3, *Northern Blot*). Bei homozygoten Mäusen ist eine geringere Menge einer verkürzten mRNA zu erkennen. Die erfolgreiche homologe Rekombination des verwendeten Konstrukts sollte jedoch in einer Deletion des zweiten Exons, das auch das Startcodon enthält, resultieren.

Um daher sicherzustellen, dass E2 in I-Plastin defizienten Mäusen nicht transkribiert wird, wurde eine RT-PCR durchgeführt (Abbildung III-3, RT-PCR). Für die reverse Transkription wurde Gesamt-RNA aus dem Darm von Wildtyp- und I-Plastin defizienten Mäusen verwendet. Das I-Plastin spezifische Primerpaar wurde so gewählt, dass im Wildtyp ein PCR-Produkt entstand, das bei E2 startet und bei E4 endet. Da E2 im *knockout* durch die Neomycinkassette ersetzt worden ist, sollte mit dem Primerpaar nur im Wildtyp ein PCR-Produkt von 390 bp entstehen. Mittels RT-PCR wurde gezeigt, dass den I-Plastin defizienten Mäusen E2 mit dem Startcodon fehlt, was die vorhandene, verkürzte mRNA erklärt. Stromabwärts der deletierten Region befinden sich in den unterschiedlichen Leserastern potenzielle neue Startcodons. Dadurch kann entweder kein Translationsprodukt oder durch Leserasterverschiebung instabile oder *nonsens* Produkte entstehen,.



**Abbildung III-3: Bestätigung der Abwesenheit von I-Plastin auf RNA- und Proteinebene.**  
*Northern Blot:* 10 µg Gesamt-RNA aus intestinalen Epithelzellen wurden in einer denaturierenden Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Nach dem Transfer auf die Nylonmembran wurde die Membran mit einer I-Plastin-cDNA-Sonde hybridisiert. In einer Spur ist die doppelte Menge an RNA aufgetragen worden. Im *knockout* ist eine geringe Menge einer verkürzten mRNA erkennbar. 28S/18S: große und kleine Untereinheit der ribosomalen RNA.  
*RT-PCR:* I-Plastin spezifische Primerpaare wurden so gewählt, dass ein PCR-Produkt von 390 bp entsteht, das von E2 bis E4 reicht. Die RNA aus Gesamtdarm von I-Plastin defizienten Mäusen führt zu keinem Produkt. Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als interne Kontrolle amplifiziert. GAPDH ist ein sogenanntes „housekeeping“-Gen, das in allen Geweben exprimiert wird.  
*Western Blot:* In einer SDS-PAGE wurden Gesamtdarmlysate aufgetragen und im *Western Blot* Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. In einer Spur wurde die doppelte Menge Protein aufgetragen. I-Plastin konnte nur in Wildtyp- und heterozygoten Mäusen nachgewiesen werden (linker Blot). Als Ladekontrolle diente Aktin. Um sicherzustellen, dass kein verkürztes Protein existiert, wurde ein polyklonaler Fimbrinantikörper verwendet (rechter Blot).

Auf Proteinebene wurde daher neben einem N-terminal gerichteten I-Plastinantikörper auch ein polyklonaler Fimbrinantikörper in *Western Blot* Analysen verwendet. Polyklonale Antikörper zeigen hierbei den Vorteil, dass sie nicht spezifisch für einen Teil des Proteins, sondern gegen verschiedene Epitope gerichtet sind. Für die Analyse wurden Proteine aus dem Darm von Wildtyp- und heterozygoten bzw. homozygoten Mäusen extrahiert. Zur Detektion von I-Plastin wurde zunächst der I-Plastin spezifische Antikörper eingesetzt. Im *Western Blot* waren nur im Wildtyp und heterozygoten Proben spezifische Signale mit der erwarteten Größe von 68 kDa für I-Plastin

detektierbar (Abbildung III-3, *Western Blot*). Mit dem polyklonalen Fimbrinantikörper wurden keine Translationsprodukte nachgewiesen. Aus diesem Grund sind mögliche Proteine in ihrer Primärsequenz grundlegend abweichend vom Wildtyp und werden deswegen nicht durch den polyklonalen Antikörper nachgewiesen. Oder es existieren möglicherweise kurze oder instabile Peptidketten oder es entsteht gar kein Protein. Sicherergestellt ist somit, dass die detektierte, verkürzte mRNA nicht zu I-Plastin translatiert werden kann. Die verwendete Mauslinie weist folglich eine vollständige Defizienz für I-Plastin auf und ist daher für die folgenden Analysen bestens geeignet.

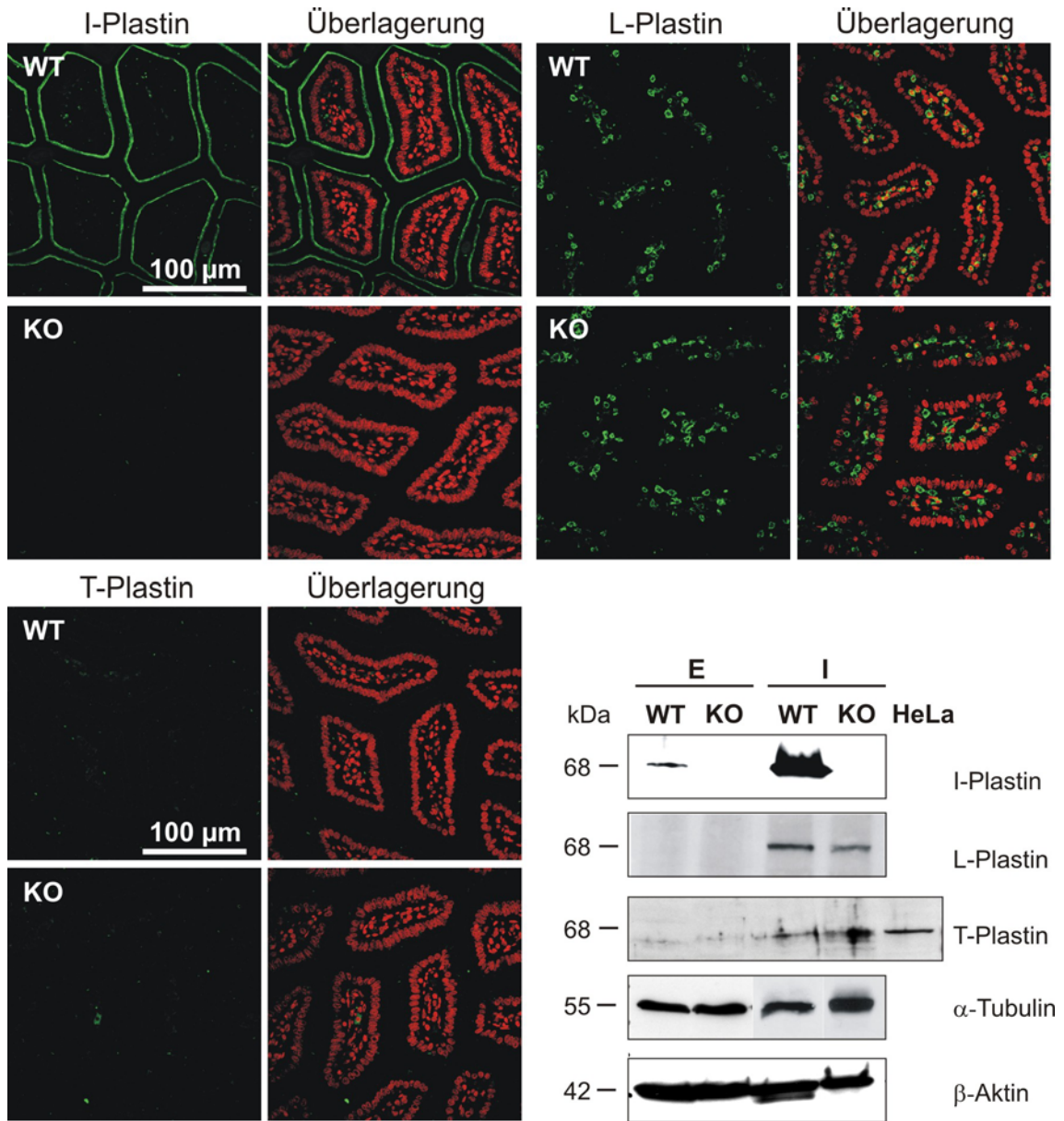
## 2 Analyse der I-Plastin defizienten Mauslinie

### 2.1 Lokalisationsanalyse von L- und T-Plastin im Darm

Bei Plastin handelt es sich um eine Genfamilie, die aus drei verschiedenen Mitgliedern besteht, welche gewebespezifisch exprimiert werden und teilweise funktionelle Unterschiede aufweisen. Um dennoch auszuschließen, dass weder L- noch T-Plastin das Fehlen von I-Plastin kompensiert, wurden Immunfluoreszenzstudien sowie *Western Blot* Analysen durchgeführt (Abbildung III-4). Es wurden Paraffinschnitte von Dünndarmgewebe (Jejunum) angefertigt und mit Isoform-spezifischen Antikörpern inkubiert. Mit einem Antikörper gegen I-Plastin, wurde das charakteristische apikale Signal am Bürstensaum nur im Wildtyp detektiert, nicht aber in I-Plastin defizienten Mäusen. Die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen, dass L-Plastin sowohl im Wildtyp als auch im *knockout* nur in der *Lamina propria*, in der sich u.a. Lymphozyten und Makrophagen befinden (Welsch, 2005), lokalisiert. T-Plastin konnte weder im Wildtyp- noch in I-Plastin defizienten Mäusen in Darmschnitten nachgewiesen werden.

Zur Bestätigung der Immunfluoreszenzanalysen wurden *Western Blot* Analysen mit Lysaten aus dem Gesamtdarm und isolierten intestinalen Epithelzellen durchgeführt. Die Detektion nach der SDS-PAGE und dem *Western Blot* erfolgte hier ebenfalls mit den affinitätsgereinigten isoformspezifischen Antiseren. Im Gesamtdarmlysat und Epithelzellextrakt aus Wildtypmäusen wurde I-Plastin nachgewiesen, wohingegen es erwartungsgemäß in I-Plastin defizienten Mäusen nicht detektiert werden konnte. L-Plastin Signale wurden in vergleichbaren Mengen nur im Gesamtdarmlysat aus Wildtyp- und I-Plastin defizienten Mäusen beobachtet. Im Epithelzellextrakt konnte auch im *knockout* kein Signal detektiert werden. T-Plastin wird im Darm, wie die Immunfluoreszenzen zeigen, nur sehr schwach exprimiert. Aus diesem Grund wurden

HeLa-Zellen als Positivkontrolle verwendet. Wie bereits bei L-Plastin wurde auch bei T-Plastin keine veränderte Expression bzw. Neusynthese in die Epithelzellen beobachtet. Die Ergebnisse zeigen, dass das Fehlen von I-Plastin nicht durch eine der anderen beiden Isoformen kompensiert werden kann.



**Abbildung III-4 (vorherige Seite): Untersuchung einer möglichen Kompensierung des I-Plastin-Verlusts durch T- oder L-Plastin.** Paraffinschnitte vom Dünndarm (Jejunum) aus Wildtyp- und I-Plastin defizienten Mäusen wurden mit isoformspezifischen Plastinantiseren inkubiert. Die Kerne wurden mittels Propidiumjodid angefärbt. Die Fluoreszenz des Alexa488-gekoppelten Sekundärantikörpers (grün) und die von Propidiumjodid (rot) wurde an einem konfokalen Lasermikroskop mit einem 40x-Objektiv aufgenommen und überlagert. I-Plastin lokalisiert apikal im Wildtyp und fehlt im *knockout*. L-Plastin ist sowohl im Wildtyp- als auch in I-Plastin defizienten Mäusen nur in Lymphozyten der *Lamina propria* zu erkennen. T-Plastin kann in Darmschnitten nicht detektiert werden. Die Funktionalität des Antikörpers wurde in Paraffinschnitten der Lunge (Abbildung II-2) gezeigt, wo T-Plastin mit Aktin kolokalisiert. Gesamtdarmlysate (I) und intestinale Epithelzellextrakte (E) sowie HeLa-Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. unten rechts). Nach dem *Western Blot* Verfahren erfolgte die Immundetektion mit den spezifischen Antiseren bzw. Antikörpern.  $\alpha$ -Tubulin und  $\beta$ -Aktin dienten als Ladekontrollen. I-Plastin ist nur im Gesamtdarmlysate und Epithelzellextrakt des Wildtyps detektierbar. L- und T-Plastin sind nur im Gesamtdarmlysate nachweisbar. Es wurde keine Kompensierung durch andere Plastinproteine festgestellt. WT: Wildtyp; KO: *knockout*.

## 2.2 Eigenschaften der I-Plastin defizienten Maus

Die I-Plastin defizienten Mäuse waren fertil und brachten eine normale Anzahl von Nachkommen hervor (~ 6-10 Mäuse pro Wurf). Die Verteilung der Geschlechter bei *knockout*-Nachkommen war mit 52 % Männchen und 48 % Weibchen ähnlich dem Wildtyp (51 % Männchen, 49 % Weibchen). Der Lebenszyklus I-Plastin defizienter Mäuse verlief normal und die Lebenserwartung einer normalen Labormaus (unter optimalen Bedingungen 2 Jahre) wurde erreicht. Die Vererbung des rekombinierten Allels entsprach mit 24 % : 53 % : 23 % (1:2:1) den Mendelschen Regeln. Die I-Plastin defizienten Tiere zeigten keine motorischen Auffälligkeiten. Die in dieser Arbeit gezeigten Untersuchungen wurden mit adulten Mäusen (8-12 Wochen alt) durchgeführt, sofern nicht ausdrücklich darauf hingewiesen wird, dass die Tiere ein anderes Alter aufwiesen.

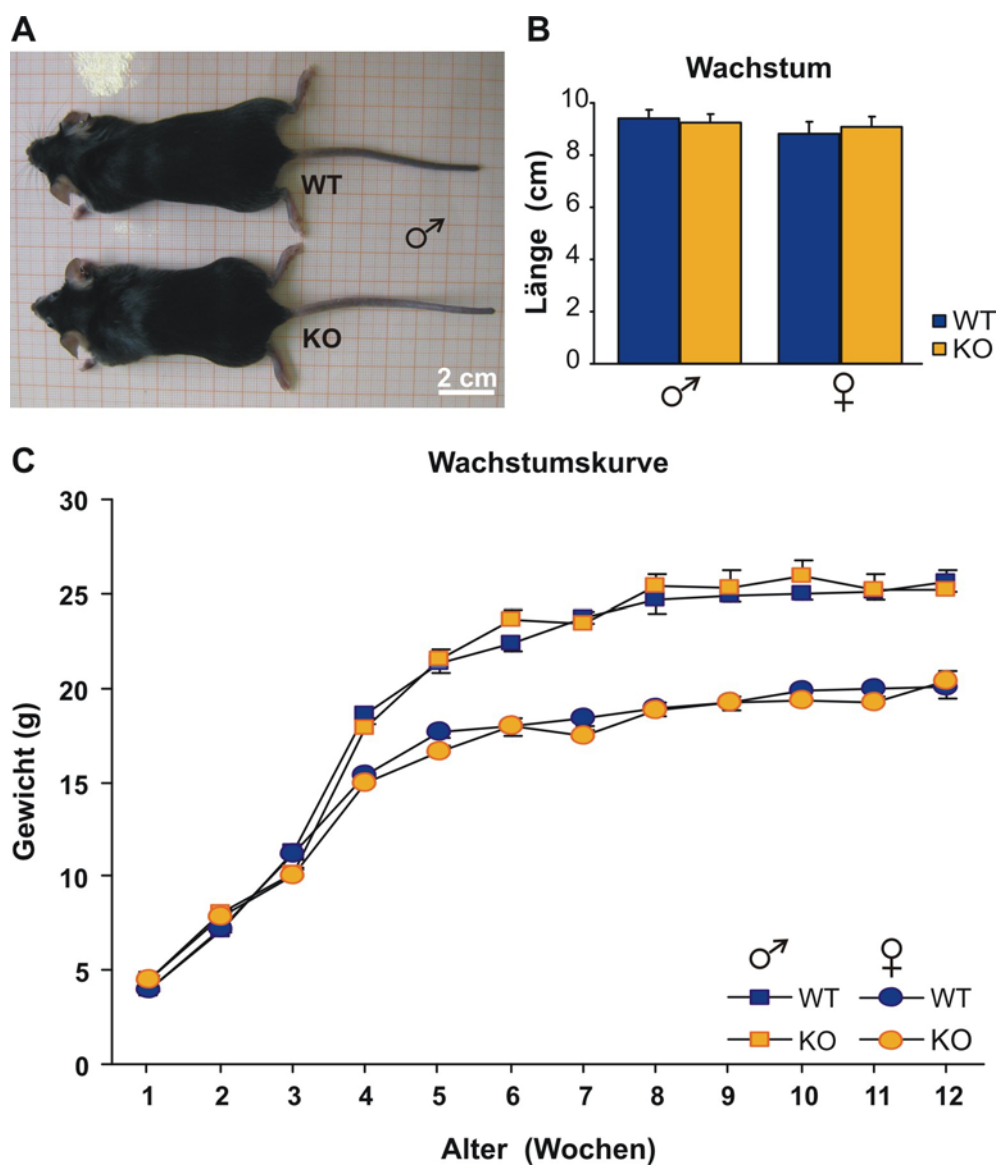
## 2.3 Morphometrische und Makroskopische Analysen

Die Aufgabe des Darms besteht darin, die Nahrung zu verdauen, sie zu durchmischen, weiterzutransportieren und Nahrungsbestandteile zu resorbieren. Die Resorption ist auf bestimmte Bereiche des Verdauungstraktes beschränkt. Im Dünndarm werden Nährstoffe, Ionen und Wasser, im Dickdarm hingegen nur Ionen und Wasser resorbiert (Klinke und Silbernagl, 1996). Für die Resorption stehen die Darmepithelzellen zur Verfügung. Diese vergrößern mit ihren apikalen Mikrovilli die Oberfläche, so dass ausreichend Nährstoffe aufgenommen werden können. Um die Auswirkungen des fehlenden I-Plastins auf diese Aspekte zu untersuchen, wurden verschiedene Analysen durchgeführt.



### 2.3.1 Länge und Körpergewicht

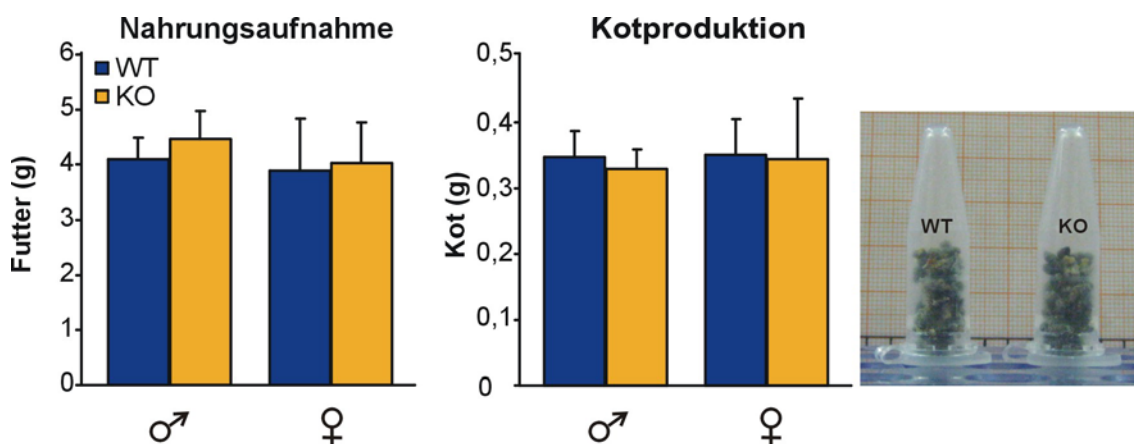
Zur Untersuchung potenzieller Veränderungen wurden die Körperlängen und Körpergewichte sowohl von Wildtyp- als auch von I-Plastin defizienten Mäusen analysiert und geschlechtsspezifisch verglichen (Abbildung III-5). Die Körperlängen adulter Mäuse unterschieden sich weder bei den Männchen noch bei den Weibchen signifikant. Auch die Körperform war normal. Wie die Wachstumskurve zeigt, wurde kein Gewichtsunterschied zwischen gleichgeschlechtlichen I-Plastin defizienten Mäusen und Wildtypmäusen festgestellt.



**Abbildung III-5 (vorherige Seite): Morphologie und Wachstum von I-Plastin defizienten und Wildtypmäusen.** **A:** Im äußeren Erscheinungsbild unterscheiden sich zwei 10 Wochen alte männliche Geschwister nicht. **B:** Körperlänge von adulten Wildtyp- und I-Plastin defizienten Mäusen. Die Anzahl der Mäuse betrug  $n = 28$  für männliche und  $n = 20$  für weibliche Kontrolltiere, sowie  $n = 22$  für männliche und  $n = 22$  für weibliche *knockout*-Mäuse. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert mit Standardfehler. Es wurde kein Unterschied in der Körperlänge festgestellt. **C:** Für die Wachstumskurve wurde für die entsprechenden Zeitpunkte jeweils ein Mittelwert gebildet und mit Standardfehler dargestellt. Bis zu einem Alter von 3 Wochen sind Gewichte von männlichen und weiblichen Tieren eines Genotyps zusammengefasst. Für den Wildtyp wurden 90 männliche bzw. 61 weibliche Mäuse und für den I-Plastin defizienten Stamm wurden 42 männliche und 44 weibliche Mäuse gewogen. Die Mäuse dieser Genotypen unterscheiden sich nicht in ihrem Gewicht. WT: Wildtyp; KO: *knockout*.

### 2.3.2 Nahrungsaufnahme und Kotproduktion

Bei I-Plastin defizienten Mäusen wurden weder Unterschiede in der Körperlänge noch bei der Körpergröße im Vergleich zum Wildtyp festgestellt. Um zu überprüfen, ob die Mäuse eine verringerte Resorption durch eine erhöhte Nahrungsaufnahme oder verringerte Kotproduktion kompensieren, wurden diese Aspekte untersucht. Zur Sicherstellung, dass Mäuse beider Genotypen die gleichen Startbedingungen hatten, wurden die Mäuse 24 Stunden nicht gefüttert, bevor sie eine abgewogene Futtermenge erhielten.

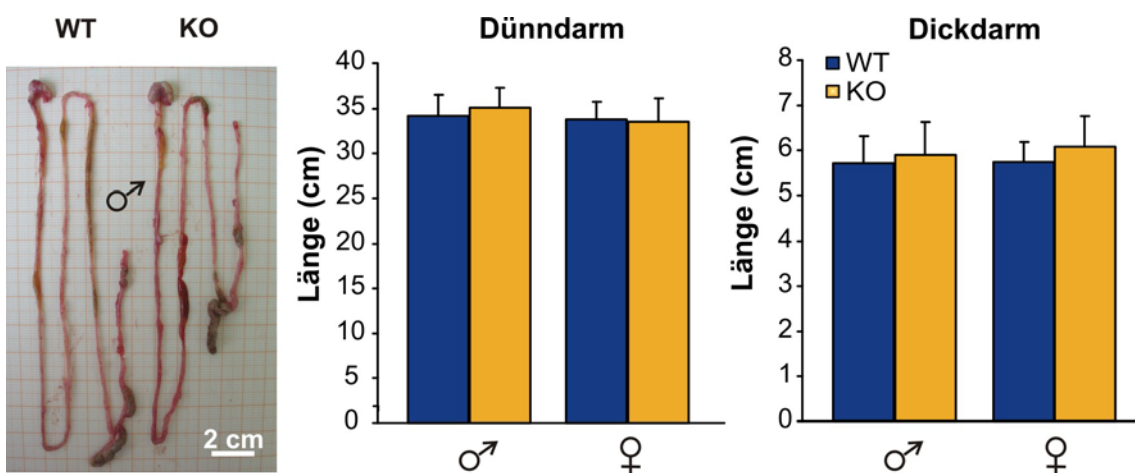


**Abbildung III-6: Nahrungsaufnahme und Kotproduktion.** Um die durchschnittlich aufgenommene Nahrungsmenge pro Tag zu ermitteln, wurde die in 24 Stunden aufgenommene Nahrung über sieben Tage berechnet. Der in sechs Stunden nach Fütterungsbeginn produzierte Kot wurde gesammelt, gewogen und ein Mittelwert berechnet. Die Graphen sind jeweils mit Standardfehler dargestellt. Der Versuch wurde dreimal mit unterschiedlichen Mäusen in ähnlichem Alter und ähnlicher Anzahl wiederholt und führte immer zu vergleichbaren Ergebnissen. Wildtyp (WT)  $n = 20$  Männchen und  $n = 13$  Weibchen; *knockout* (KO)  $n = 18$  Männchen und  $n = 13$  Weibchen. Abgebildet ist repräsentativer Kot von Wildtyp- und I-Plastin defizienten Mäusen. Es wurde kein signifikanter Unterschied in der aufgenommenen Nahrungsmenge sowie in der Kotproduktion und Konsistenz festgestellt.

Die aufgenommene Nahrungsmenge wurde jeweils nach 24 Stunden über einen Zeitraum von sieben Tagen überprüft und so die durchschnittlich aufgenommene Nahrungsmenge ermittelt (Abbildung III-6). Männliche Wildtypmäuse nahmen durchschnittlich 4 g und weibliche 3,9 g Nahrung pro Tag zu sich. I-Plastin defiziente Tiere zeigten mit 4,4 g bzw. 4 g aufgenommener Nahrung keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp. Parallel wurde die Kotproduktion über einen Zeitraum von sechs Stunden beobachtet. Wildtypmäuse produzierten im Mittel 0,35 g Kot (Männchen und Weibchen) und I-Plastin defiziente Mäuse 0,33 g (Männchen) bzw. 0,34 g (Weibchen) Kot (Abbildung III-6). Es wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt. Auch die Konsistenz unterschied sich nicht von der im Wildtyp.

### 2.3.3 Länge des Dün- und Dickdarmes

Die bisherigen Beobachtungen führten zu der Frage, ob ein verlängerter Dün- oder Dickdarm eine mögliche Beeinträchtigung der Resorption von Nahrung kompensiert. Um diese Möglichkeit zu überprüfen wurde die Länge des Dün- und Dickdarmes gemessen. Die Länge des Darms von I-Plastin defizienten Mäusen war vergleichbar mit der von Wildtypmäusen (Abbildung III-7). In Präparationen wurde festgestellt, dass die Darmwand leichter riss. Makroskopische Untersuchungen anderer Organe, wie z.B. der Niere, zeigten keine Abnormalitäten.



**Abbildung III-7: Messungen der Dün- und Dickdarmlänge.** Abgebildet ist der Magen-Darm-Trakt (Magen, Dünndarm, Blinddarm und Dickdarm) zweier adulten Männchen. Wildtyp (WT) bzw. *knockout* (KO). Der Dünndarm wurde vom Magen bis zum Blinddarm gemessen. Die Dickdarmlänge wurde vom Blinddarm bis zum Rektum gemessen. Dün- und Dickdarm wurden für den Wildtyp von 24 männlichen bzw. 20 weiblichen Mäusen und für den I-Plastin defizienten Stamm bei 21 männlichen und 22 weiblichen Mäusen in der Länge gemessen. Die Graphen sind jeweils mit Standardfehler dargestellt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

### 2.3.4 Blutserumspiegel einiger biochemischer Parameter

Zur Analyse der möglichen Auswirkungen des fehlenden I-Plastins auf die Konzentration von absorbierten Stoffen im Blut wurden diese untersucht. Wildtyp- und I-Plastin defiziente Mäuse wurden für die Untersuchung 24 Stunden ohne Futter gehalten und anschließend das Gesamtblut oder Serum analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle III-1 zusammengefasst. Mit Ausnahme von leicht erhöhten Cholesterinwerten waren alle gemessenen Parameter in I-Plastin defizienten Mäusen in geringerer Konzentration im Blut vorhanden. Die Abweichungen waren jedoch nicht signifikant.

**Tabelle III-1: Analyse von Blutparametern.**

Konzentration [mg/dl]	Wildtyp		<i>knockout</i>	
	♂	♀	♂	♀
Glukose	185,9 ± 8,3	163,3 ± 6,0	169,6 ± 7,7	163,8 ± 13,1
Triglyceride	128,1 ± 7,3	104,5 ± 8,4	124,2 ± 6,2	97,4 ± 6,0
Cholesterin	92,0 ± 4,1	77,7 ± 3,2	96,0 ± 4,1	83,8 ± 4,1
Natrium	866,7 ± 20,4	864,2 ± 2,7	857,6 ± 9,7	853,2 ± 8,1
Kreatinin	0,55 ± 0,06	0,50 ± 0,07	0,39 ± 0,05	0,39 ± 0,05

Zur Bestimmung der Blutserumspiegel einiger biochemischer Parameter wurden die Mäusen vor der Messung für 24 Stunden nicht gefüttert. Die Glukosemessung im Blut erfolgte mit Teststreifen, die mit Hilfe eines Glukosemessgerätes analysiert wurden. Es wurden bei jedem Tier zwei unabhängige Messungen durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Die anderen Parameter wurden aus verdünntem Blutserum bestimmt. Alle Werte sind als Mittelwerte mit dem entsprechenden Standardfehler angegeben. Für den Wildtyp wurden n = 28 Männchen und n = 20 Weibchen und für den *knockout* n = 23 Männchen und n = 22 Weibchen analysiert.

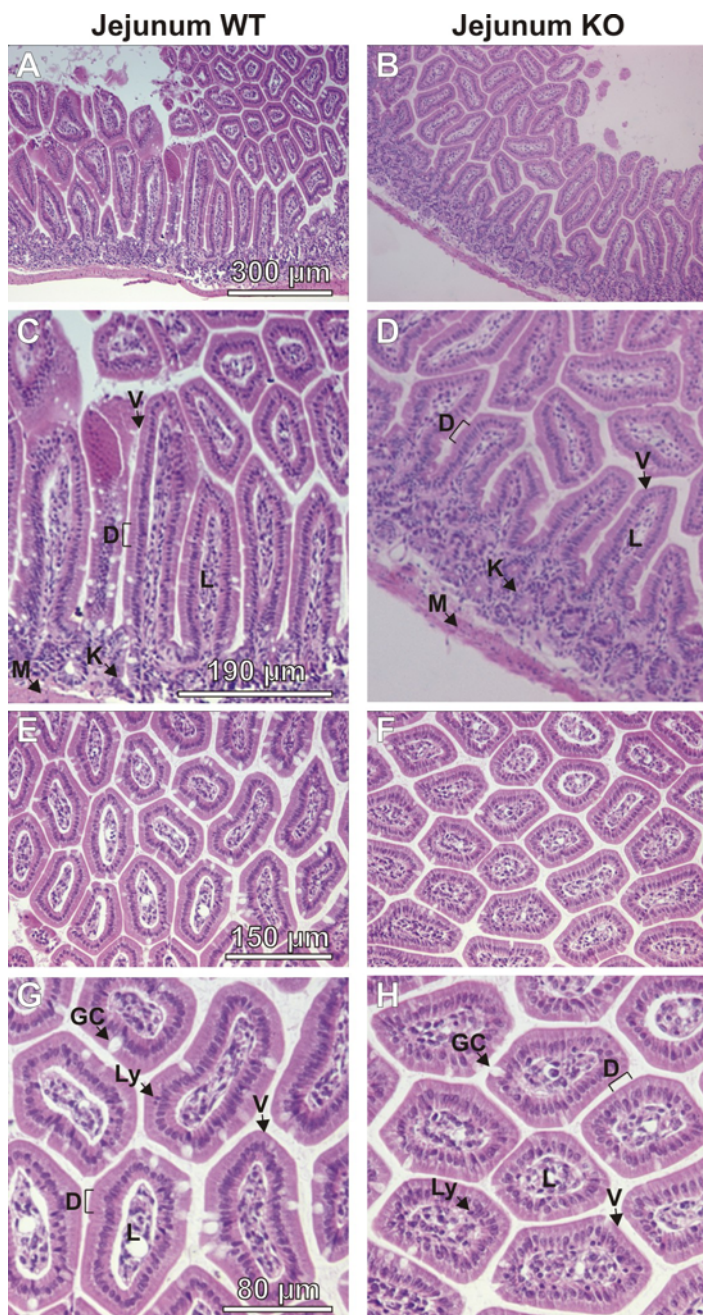
## 3 Histologische und morphologische Analysen

Nach der makroskopischen Untersuchung der I-Plastin defizienten Mäuse, erfolgte anschließend die histologische und morphologische Analyse des Darms anhand von Gefrier- und Paraffinschnitten sowie an Ultradünnschnitten.

### 3.1 Mikroanatomie

#### 3.1.1 Übersichtsfärbung

Um einen ersten Eindruck von der Morphologie des Darmes von I-Plastin defizienten Mäusen zu gewinnen, wurden 4 µm dicke Paraffinschnitte mit Hematoxylin und Eosin (HE Färbung) angefärbt. Bei dieser Übersichtsfärbung erscheinen die Zellkerne blau-schwarz, das Zytoplasma blassrot, das Muskelgewebe rot und Bindegewebe rot bis blassrosa-rot. Jeder Villus besteht aus verschiedenen Zelltypen, wobei die resorbierenden Epithelzellen (Enterozyten) den größten Anteil stellen. Zur Vereinfachung werden diese Zellen nachfolgend nur als intestinale Epithelzellen oder Darmepithelzellen bezeichnet. Daneben existieren vor allem Becherzellen, aber auch endokrine Zellen und M-Zellen. In den abgebildeten HE Färbungen (Abbildung III-8) sind deutlich die resorbierenden Epithelzellen, die Becherzellen (weiß), Zellen der *Lamina propria* (u.a. Lymphozyten und Makrophagen) sowie intraepitheliale Lymphozyten im mittleren Dünndarmabschnitt (Jejunum) zu erkennen. Des Weiteren wurde die Morphologie mit Hilfe von HE Färbungen im vorderen Dünndarmabschnitt (Duodenum), im hinteren Dünndarmsegment (Ileum) sowie im Dickdarm (Colon) untersucht (Anhang Abbildung A-1). Auf diesem Vergrößerungsgrad wurden weder im Dünndarm noch im Dickdarm morphologische Abnormalitäten festgestellt.



**Abbildung III-8: Hematoxylin und Eosin Färbung vom Dünndarm (Jejunum).** Dargestellt sind Längs- (A-D) und Querschnitte (E-H) des Dünndarms (Jejunum) aus Wildtyp- und I-Plastin defizienten Mäusen. Die Becherzellen (GC) erscheinen weiß. Zwischen den intestinalen Epithelzellen (D) sind teilweise eingewanderte intraepitheliale Lymphozyten (Ly) erkennbar. Zudem sind Zellen in der *Lamina propria* (L) deutlich zu sehen. In den Längsschnitten sind neben den Villi (V) auch Krypten (K) sowie die Submukosa und *Muscularis* (M) sichtbar. Unterschiede in den Villigrößen resultieren aus der Schnittebene. Mit dieser Methode konnten keine morphologischen Unterschiede zwischen Wildtyp- (WT) und I-Plastin defizienten Mäusen (KO) festgestellt werden.

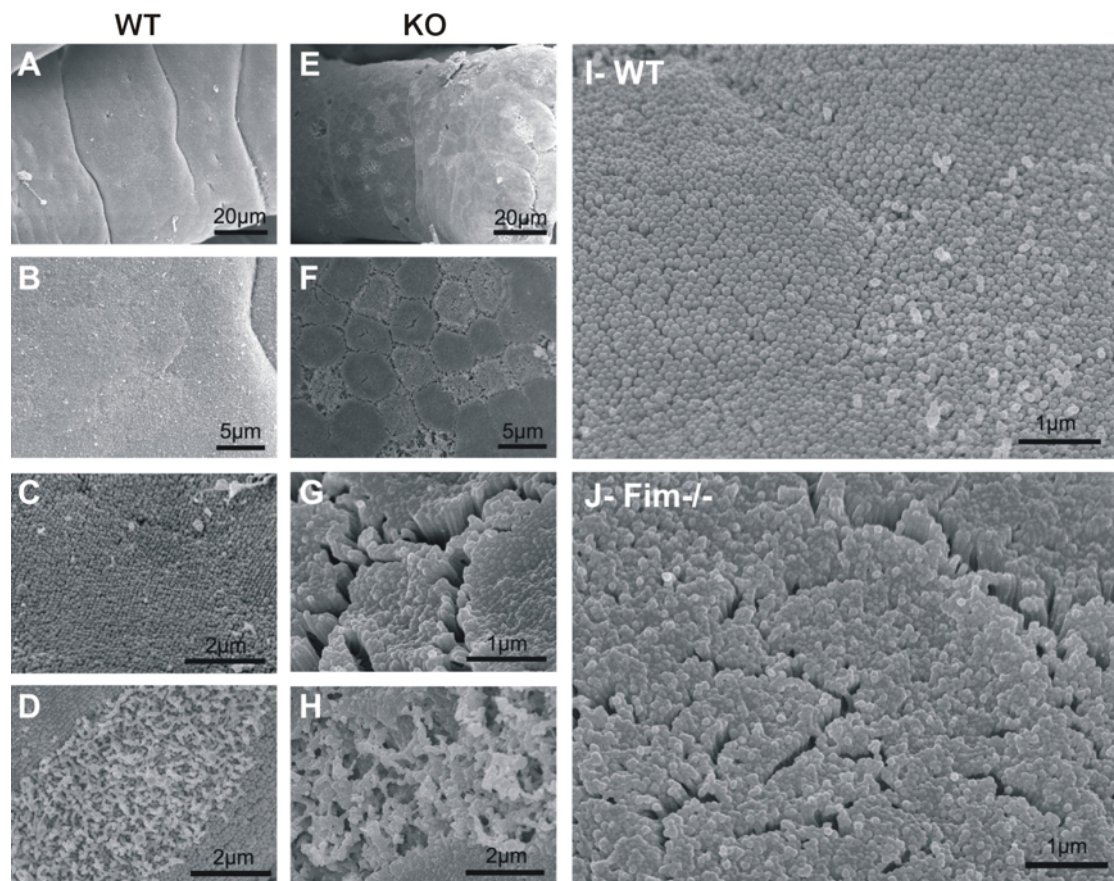
Im Dünndarm wurde die Zelltypenverteilung von intestinalen Epithelzellen, Becherzellen und intraepithelialen Lymphozyten ermittelt (Anhang Abbildung A-1). Das Verhältnis von Becherzellen sowie von intraepithelialen Lymphozyten zu den intestinalen Epithelzellen unterschied sich in I-Plastin defizienten Mäusen nicht signifikant von dem in Wildtypmäusen.

### 3.1.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Mit lichtmikroskopischen Methoden konnten morphologische Veränderungen nicht beobachtet werden. Daher wurde zur weiteren Analyse auf elektronenmikroskopische Verfahren zurückgegriffen.

#### 3.1.2.1 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Zur Analyse der Oberfläche von intestinalen Epithelzellen wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen in Kooperation mit Dr. Sylvie Robine und Dr. Sophie Kernéis am Institut Curie bzw. Pasteur in Paris angefertigt. In I-Plastin defizienten Mäusen wurde eine heterogenere Oberfläche im Vergleich zum Wildtyp beobachtet (Abbildung III-9). In Proben von *knockout*-Mäusen erschien im Allgemeinen die apikale Oberfläche „rauer“ und die Zellgrenzen waren deutlicher zu erkennen. Letzteres führte zu einer wabenartigen Struktur. Außerdem wurden Spalten zwischen den Mikrovilli innerhalb einer Zelle festgestellt (vergleiche Abbildung III-9 A-C, I für den Wildtyp und E-G, J für den *knockout*). Des Weiteren wurden in Proben von I-Plastin defizienten Mäusen (n = 3) wesentlich häufiger Zellen mit fusionierten bzw. geschädigten Mikrovilli beobachtet als im Wildtyp (n = 3). Vermutlich handelt es sich um apoptotische Zellen (vgl. Abschnitt 5.1).

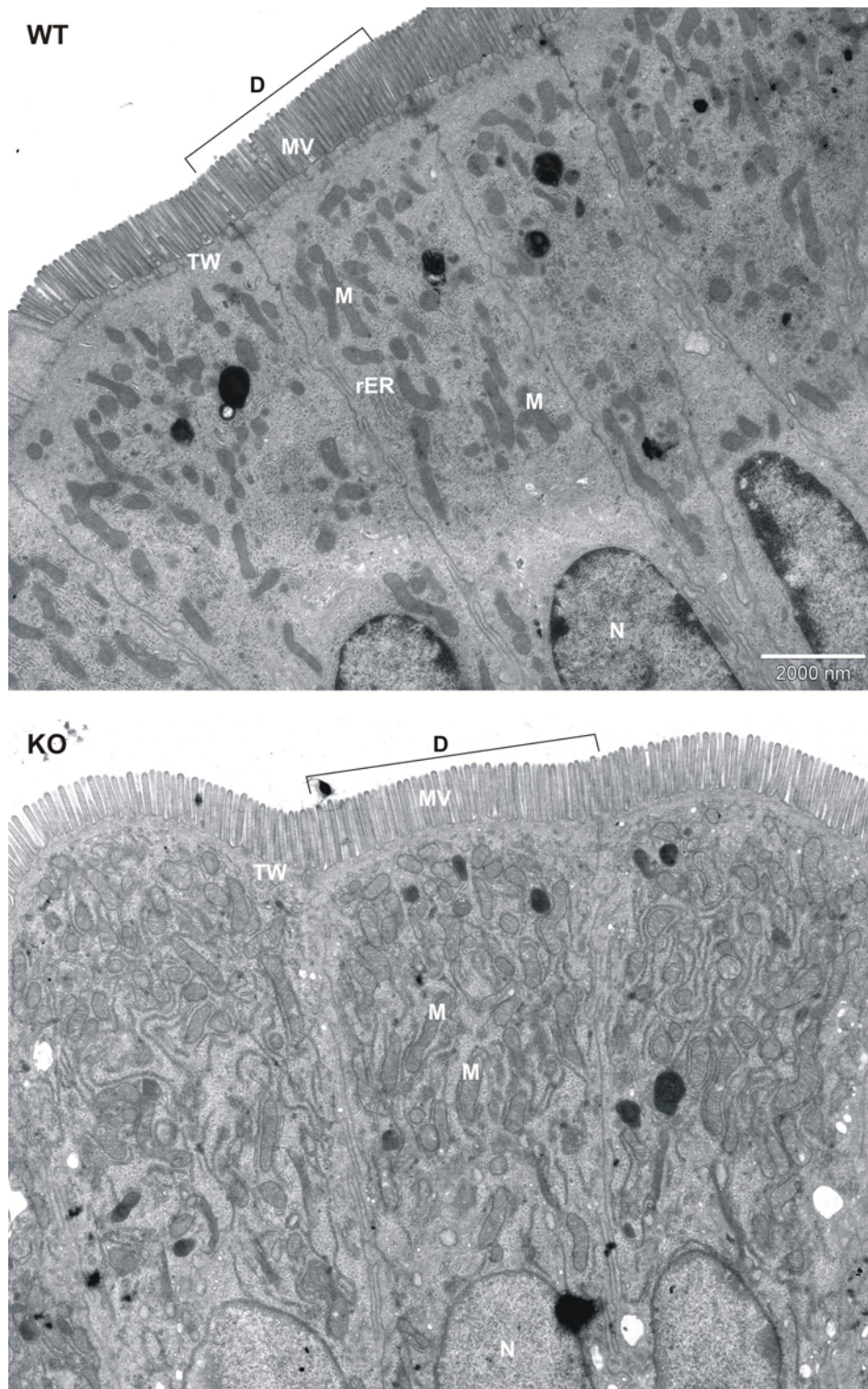


**Abbildung III-9: Ultrastrukturelle Veränderungen der epithelialen Oberfläche.** Raster-elektronenmikroskopische Aufnahmen des Dünndarms von Wildtyp (WT: **A-D,I**) und I-Plastin defizienten Mäusen (KO: **E-H, J**). Die Darmoberfläche von Mäusen, denen I-Plastin fehlt, zeigt ein raueres Erscheinungsbild. Zudem ist eine größere Anzahl an Spalten (vgl. **C** und **G**) erkennbar. Die Zellgrenzen sind im Vergleich zum Wildtyp deutlicher zu erkennen, so dass die Darmoberfläche der *knockout*-Mäuse wabenartig erscheint. Häufig wurden Zellen mit beschädigten Mikrovilli beobachtet (**H**), die im Wildtyp (**D**) auch, jedoch wesentlich seltener, vorkamen. *Fim*<sup>-/-</sup>: I-Plastin defizient.

### 3.1.2.2 Apikale ultrastrukturelle Veränderungen in I-Plastin defizienten Mäusen

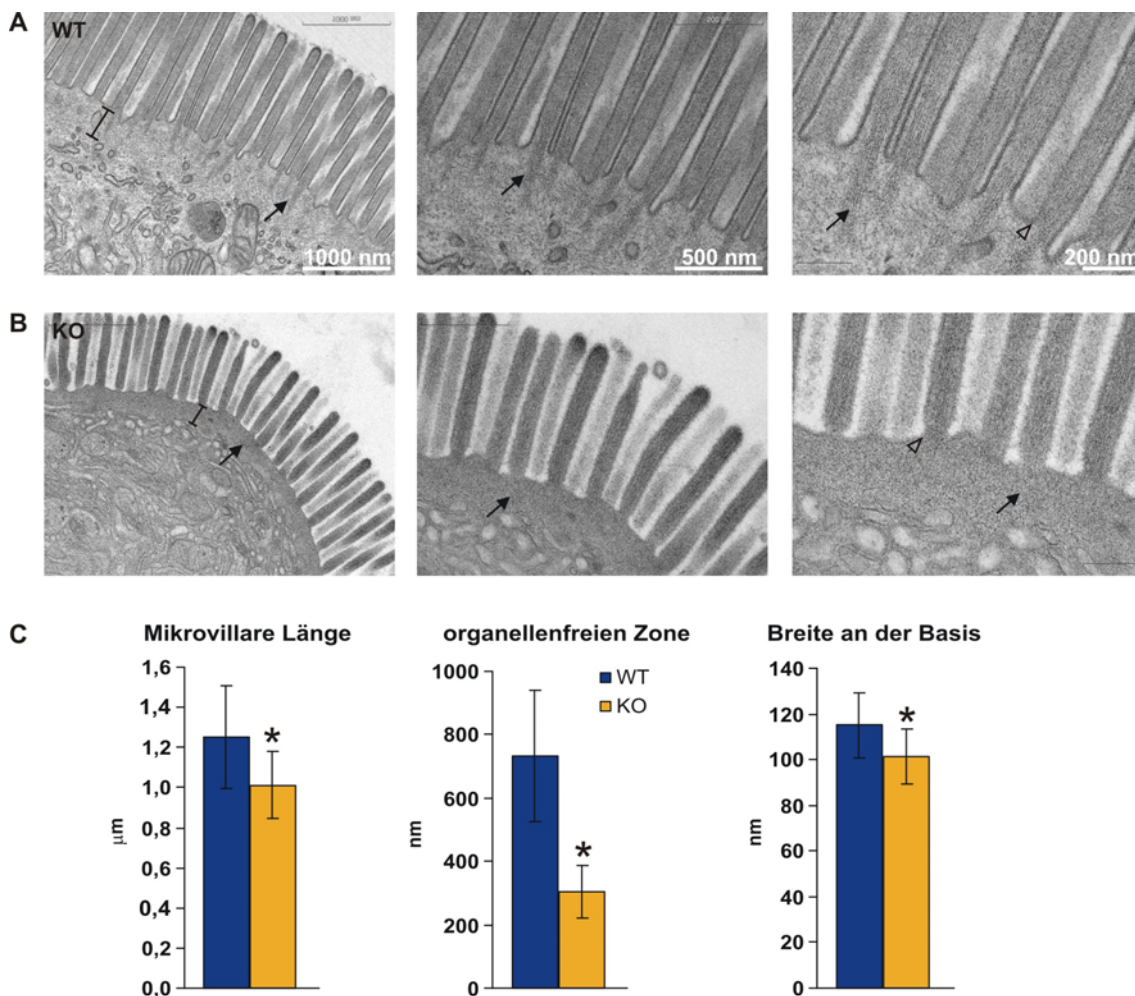
Die Struktur der Darmepithelzellen in Wildtyp- und I-Plastin defizienten Mäusen wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) in Kooperation mit Dr. Sylvie Robine am Institut Curie in Paris detailliert untersucht. TEM-Aufnahmen mit geringerer Vergrößerung zeigten, dass das einschichtige Zylinderepithel auch in I-Plastin defizienten Mäusen geordnet ist und apikale Mikrovilli aufweist (Abbildung III-10). Auffällig war eine erhöhte Anzahl von Vesikeln und tubulären Strukturen, die im Zytoplasma akkumulierten. Die Länge der Mikrovilli wird durch die Stabilität der Aktinfilamentbündel, die der Unterstützung dienen, bestimmt.





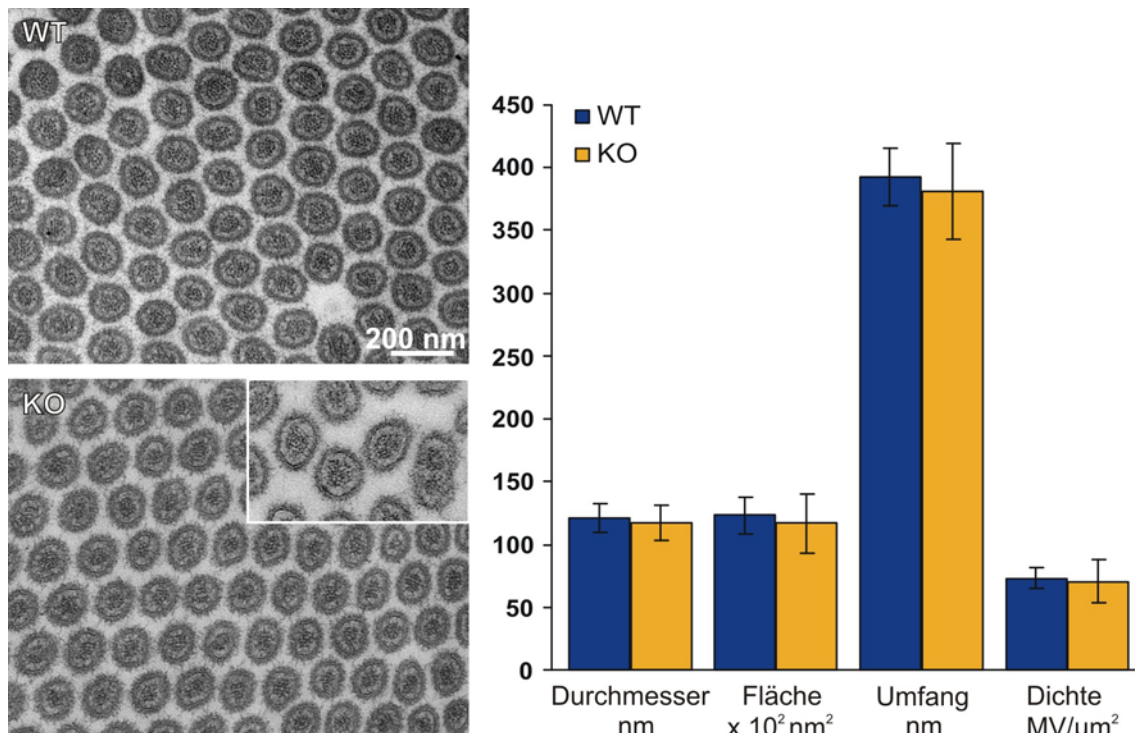
**Abbildung III-10: Apikale Mikrovilli sind in I-Plastin defizienten Mäusen vorhanden.** Gezeigt sind TEM-Aufnahmen vom einschichtigen Zylinderepithel des Dünndarms von Wildtyp- (WT) und I-Plastin defizienten Mäusen (KO). In beiden Genotypen sind deutlich die apikalen Mikrovilli (MV) zu erkennen. Im *knockout* ist eine erhöhte Anzahl von Vesikeln und tubulären Strukturen zu verzeichnen. D: resorbierende Darmepithelzelle; M: Mitochondrien; N: Nukleus/Zellkern; rER: raues Endoplasmatisches Retikulum; TW: terminales Netz.

Die Stabilität dieser Filamente wird durch aktinbündelnde Proteine erhöht. Sowohl Villin (Ferrary et al., 1999) als auch Espin (persönliche Mitteilung von S. Robine) defiziente Mäuse zeigen keine Reduktion der Mikrovillillänge. In I-Plastin defizienten Mäusen wurde dagegen auf TEM-Ebene in höheren Vergrößerungen deutliche Veränderungen im Bereich der apikalen Mikrovilli und dem terminalen Netz sichtbar (Abbildung III-11). Die mikrovillare Länge wurde durch Ausschalten des I-Plastin-Gens um 20 % signifikant verkürzt (WT:  $1,25 \pm 0,26 \mu\text{m}$ ,  $n = 86$ ; KO:  $1,01 \pm 0,16 \mu\text{m}$ ,  $n = 194$ ; t-Test  $P < 0,0001$ ). Die Aktinfilamente innerhalb der Mikrovilli reichen im Wildtyp bis ins terminale Netz hinein (Aktinwurzel), wo sie durch die bisher bekannten Interaktionen mit Spektrin und Myosin IIa verankert sind (Alberts et al., 2004). Der Bereich des terminalen Netzes zeichnete sich in I-Plastin defizienten Mäusen besonders dadurch aus, dass die Aktinwurzeln fehlten. Es wurde zudem festgestellt, dass die Breite der organellenfreien Zone signifikant um 60 % reduziert war (WT:  $731 \pm 206 \text{ nm}$ ,  $n = 17$  und KO:  $304 \pm 83 \text{ nm}$ ,  $n = 26$ ; t-Test  $P < 0,0001$ ). Zusätzlich wurde beobachtet, dass die Breite der Mikrovilli an der Basis im Vergleich zum Wildtyp deutlich verringert war (WT:  $115 \pm 14 \text{ nm}$ ,  $n = 142$  und KO:  $101 \pm 11 \text{ nm}$ ,  $n = 146$ ; t-Test  $P < 0,0001$ ).



**Abbildung III-11 (vorherige Seite): Veränderungen der apikalen Organisation in I-Plastin defizienten Mäusen.** Abgebildet sind longitudinale TEM Aufnahmen von Darmepithelzellen mit ihren Mikrovilli aus dem Jejunum von Wildtypmäusen (WT, **A**) und I-Plastin defizienten Mäusen (KO, **B**) sowie die statistische Auswertung (**C**). Die Graphen zeigen Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung. Die Länge der Mikrovilli ist in I-Plastin defizienten Mäusen signifikant um 20 % reduziert. Auffallend ist auch, dass im *knockout* die in das terminale Netz reichende Aktinwurzel (Pfeile) fehlt. Die Breite der organellenfreien Zone ( $\dashv$ ) ist um 60 % verringert. Die Basis der Mikrovilli ist in I-Plastin defizienten Mäusen verengt (offene Pfeilköpfe). Sterne markieren Signifikanzunterschiede, die mit Hilfe des Students t-Test ermittelt wurden (\*  $P < 0,0001$ ).

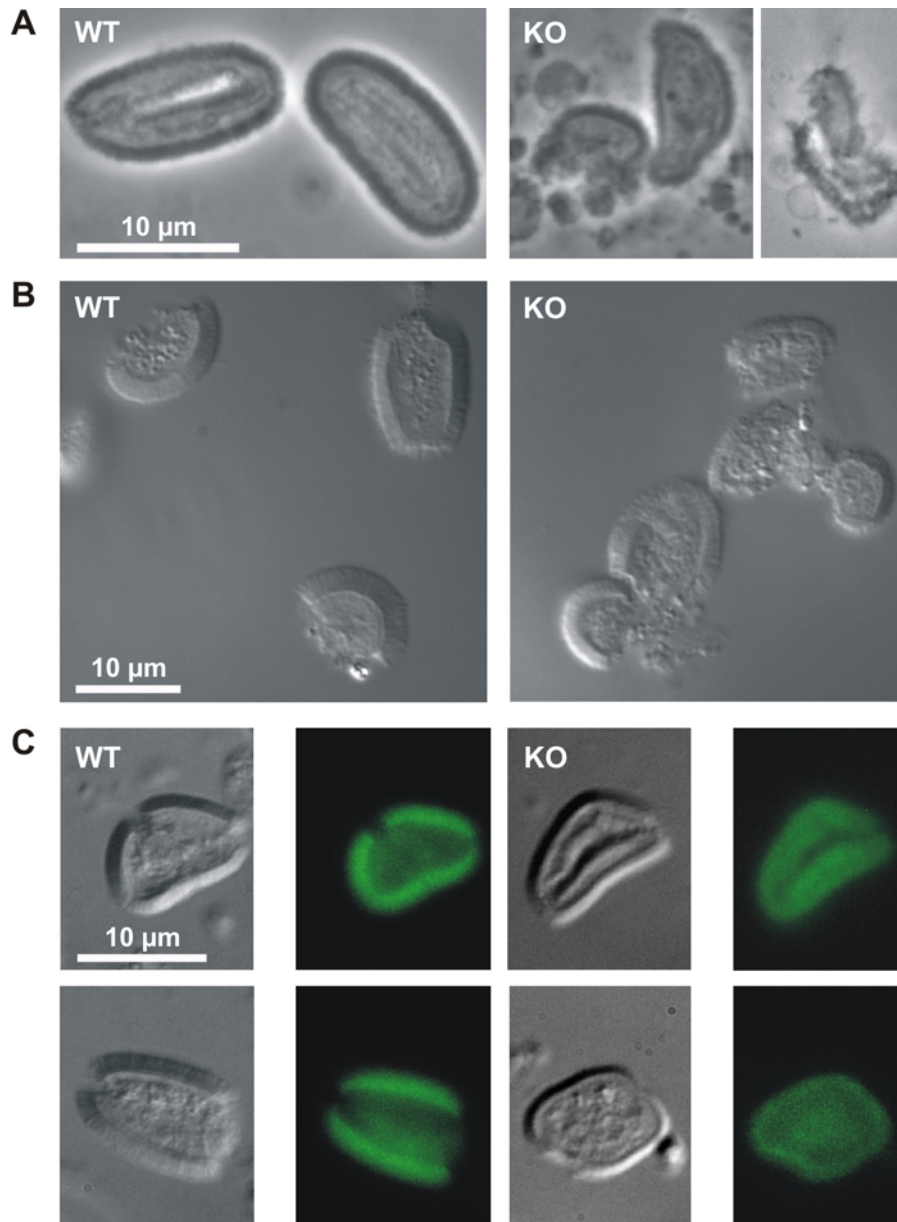
Neben den longitudinalen Aufnahmen wurden auch Querschnitte näher betrachtet, um zu überprüfen, wie die Mikrovilli in I-Plastin defizienten Mäusen geformt und gepackt sind (Abbildung III-12). Im Wildtyp war die Verteilung der Mikrovilli gleichmäßig, während in I-Plastin defizienten Mäusen neben den gleichmäßig geordneten Mikrovilli auch deformierte, fusionierte und ungeordnete Mikrovilli beobachtet wurden. In einer statistischen Analyse wurde der Durchmesser, die Fläche und der Umfang eines Mikrovillus sowie die Dichte der Mikrovilli gemessen. Dabei wurden im Mittel keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Der Durchmesser eines Mikrovillus betrug im Wildtyp  $121 \pm 11$  nm ( $n = 113$ ) und im *knockout*  $117 \pm 13$  nm ( $n = 147$ ). Im Mittel wurde die Fläche eines Mikrovillus mit  $123 \pm 14 \times 10^2 \text{ nm}^2$  ( $n = 135$ ) im Wildtyp und  $116 \pm 23 \times 10^2 \text{ nm}^2$  ( $n = 139$ ) in I-Plastin defizienten Mäusen ermittelt. Der Mikrovillusumfang im *knockout* war mit  $381 \pm 38$  nm ( $n = 139$ ) im Vergleich zum Wildtyp ( $392 \pm 22$  nm,  $n = 135$ ) leicht reduziert.



**Abbildung III-12: Anordnung und Form der Mikrovilli.** Gezeigt sind Querschnitte durch die Mikrovilli von Wildtyp- (WT) und I-Plastin defizienten (KO) Mäusen. Der kleine Ausschnitt im KO zeigt, deformierte bzw. fusionierte Mikrovilli sowie eine geringe Dichte der Mikrovilli, wie sie vereinzelt in Schnitten von I-Plastin defizienten Mäusen gefunden worden sind. Im Graphen sind die Mittelwerte der Messungen mit ihren Standardabweichungen dargestellt. Alle untersuchten Parameter wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. MV: Mikrovilli.

### 3.1.3 Studien an isoliertem Bürstensaum

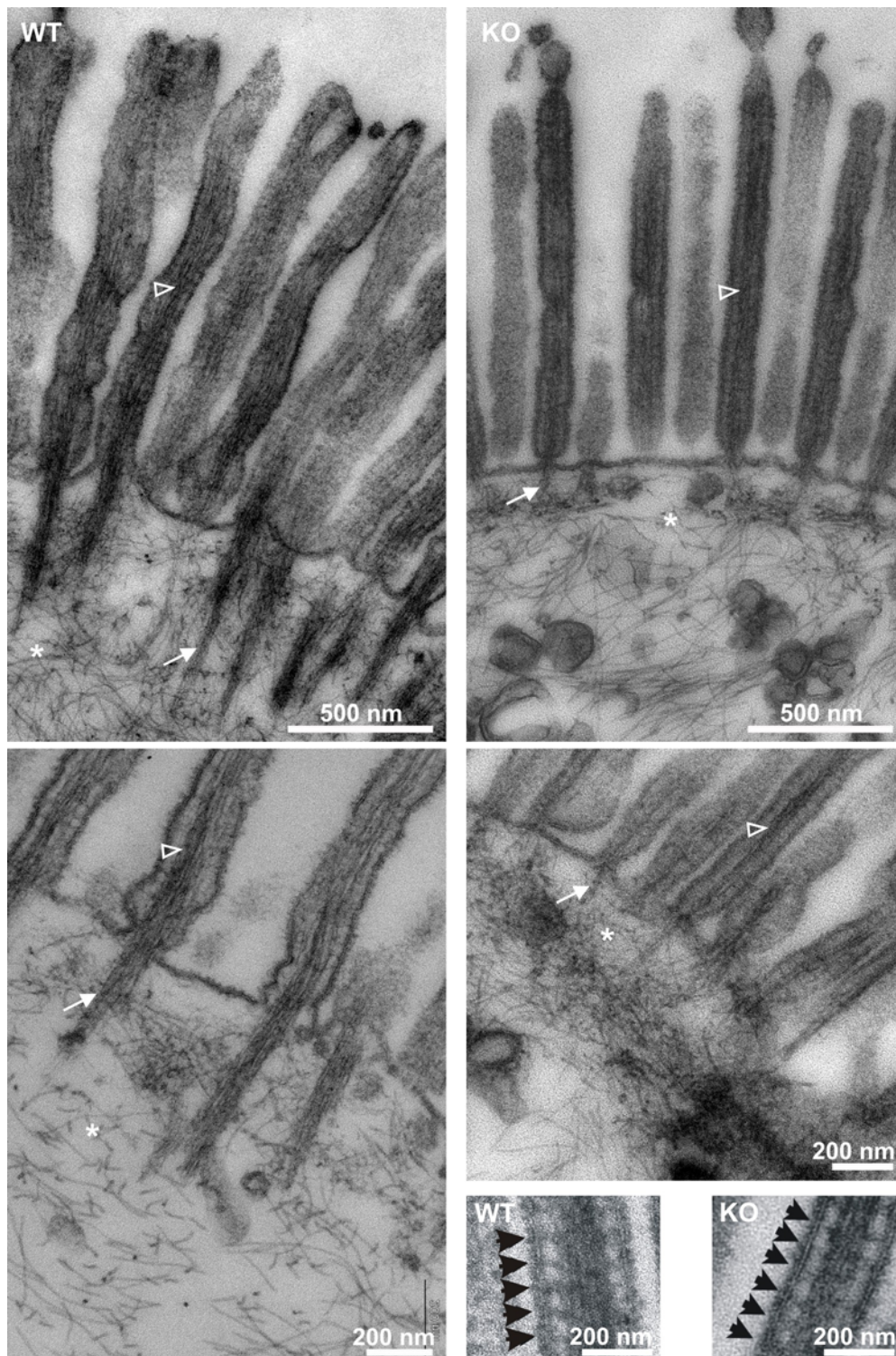
Zur weiteren Analyse der epithelialen Oberfläche wurde der Bürstensaum isoliert. Dazu wurde zunächst eine klassische Methode nach Ferrary angewandt (Ferrary et al., 1999). Bei dieser Methode wird die Mukosa mechanisch vom Darm gelöst, in einer hypotonischen Lösung inkubiert und anschließend erfolgt ein mechanischer Zellaufschluss. Auf diese Weise wurde im Wildtyp der Bürstensaum erwartungsgemäß isoliert. In Präparaten von I-Plastin defizienten Mäusen wurden dagegen zerstörte und degradierte Bürstensaumfragmente isoliert (Abbildung III-13 A). Aus diesem Grund wurde eine modifizierte Methode nach Mooseker bzw. McConnell angewandt (Mooseker und Tilney, 1975; McConnell und Tyska, 2007). Diese Methode basiert auf der Tatsache, dass der Bürstensaum durch vorsichtige Homogenisierung der Mukosa unter isotonischen Bedingungen intakt bleibt und bei einer milden Zentrifugation schneller als die Zellkerne sedimentiert. Zusätzlich wurden die Aktinfilamente durch einen F-Aktin-stabilisierenden Puffer unterstützt.



**Abbildung III-13: Isolierte Bürstensäume aus *knockout*-Mäusen sind fragiler, weisen aber ein Aktinzytoskelett auf.** Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen isolierter Bürstensäume aus Wildtyp- (WT) und I-Plastin defizienten (KO) Mäusen. Die Phasenkontrastaufnahmen (**A**) zeigen die gut erhaltenen Bürstensäume aus dem Wildtyp und zerstörte, degradierte Bürstensäume aus *knockout*-Mäusen. Erst mit Hilfe einer mildereren Aufreinigungsmethode wurden sowohl aus dem Wildtyp- als auch aus I-Plastin defizienten Mäusen Bürstensäume isoliert (**B**). Diese zeigten mit Hilfe einer FITC-Phalloidin färbung (**C**) F-Aktin auf.

Mit dieser Methode wurde es möglich, auch aus I-Plastin defizienten Mäusen gut erhaltene Bürstensaumpräparate zu isolieren (Abbildung III-13 B). Der Bürstensaum aus *knockout*-Mäusen ist somit fragiler als der von Wildtypmäusen. Isolierte Bürstensäume wurden mittels FITC-Phalloidin gefärbt, um das Aktinzytoskelett zu untersuchen (Abbildung III-13 C). Alle Wildtyp- und die meisten *knockout*-Bürstensäume zeigten eine F-Aktinfärbung. Die Aufreinigung selektiert allerdings die eher robusten Bürstensäume, daher können Unterschiede, die *in vivo* bestehen könnten, hier unterrepräsentiert sein.

Die Struktur der Bürstensäume wurde mit Hilfe der TEM detaillierter untersucht. Auf dieser Ebene hat sich bestätigt, dass die Aktinwurzel in I-Plastin defizienten Mäusen nicht existiert oder nur rudimentär vorliegt (Abbildung III-14). In Bürstensäumen aus *knockout*-Mäusen sind durch Villin und Espin gebündelte Aktinfilamente erkennbar. In höheren Vergrößerungen ist die Verknüpfung der Aktinfilamente über Myosin Ia mit der Plasmamembran sowohl in Wildtyp als auch in I-Plastin defizienten Präparaten deutlich erkennbar. Zudem liegen die Intermediärfilamente (hier Keratinfilamente) in *knockout*-Präparaten näher an den Mikrovilli.



**Abbildung III-14: TEM-Untersuchungen an isoliertem Bürstensaum.** Die repräsentativen TEM-Aufnahmen bestätigen die fehlenden Aktinwurzeln in I-Plastin defizienten Mäusen (KO) (Pfeile). Die Kontrolltiere (WT) wie auch die *knockout*-Tiere zeigen Aktinfilamente in den Mikrovilli (weiße Pfeilköpfe). In höheren Vergrößerungen sind die Verknüpfungen der Aktinfilamente mit der Plasmamembran über Myosin Ia (schwarze Pfeilköpfe) erkennbar. Die Keratinfilamente sind durch Sterne gekennzeichnet.

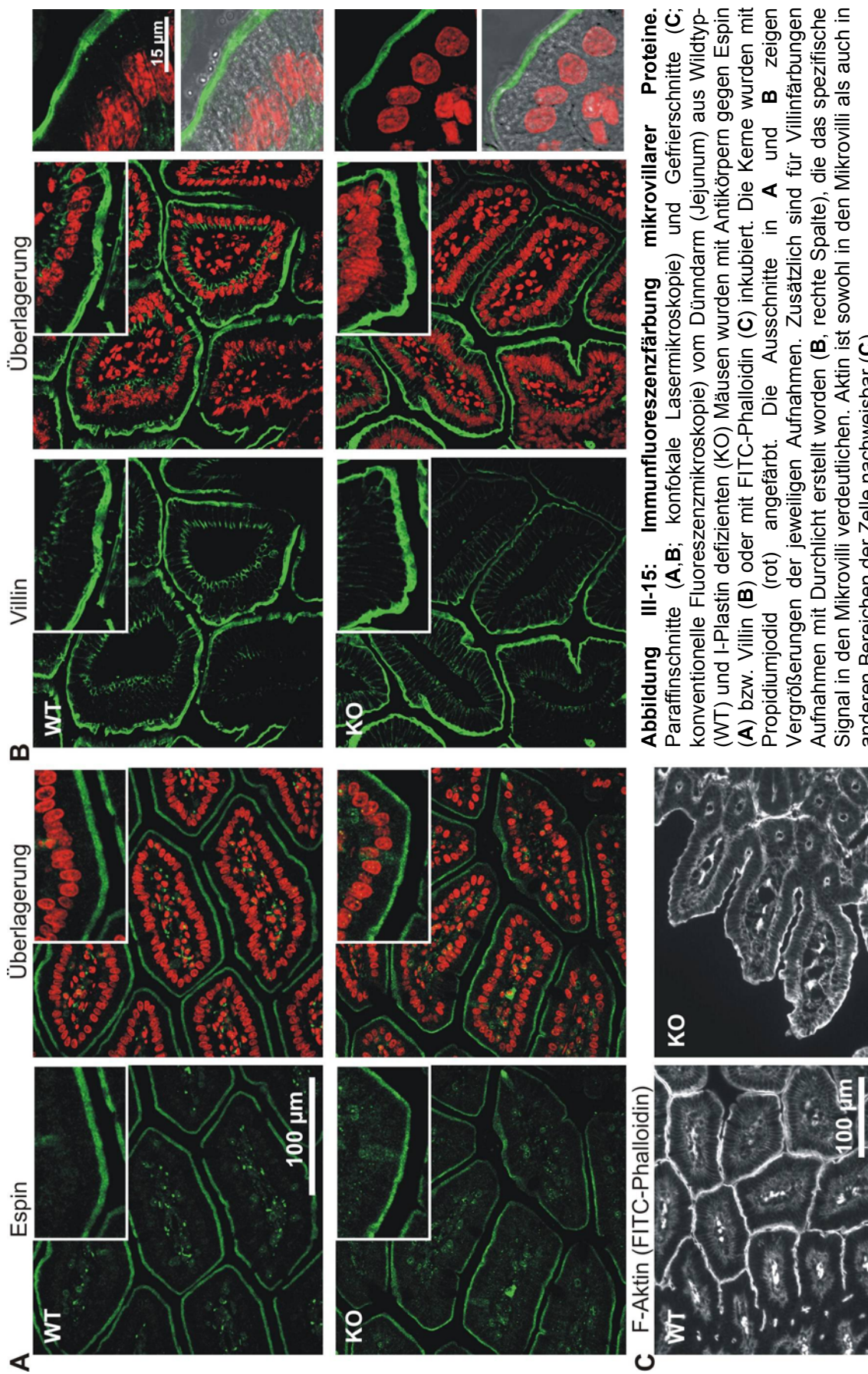
## 3.2 Lokalisation apikaler Markerproteine

Nachdem die Morphologie analysiert worden war, wurden die Auswirkungen des Fehlens von I-Plastin auf die Lokalisation verschiedener Proteine mit Hilfe von Immunfluoreszenzstudien oder histochemischen Studien untersucht. Dazu wurden Paraffinschnitte von Dünndarmgewebe aus Wildtyp- und I-Plastin defizienten Mäusen mit einer Dicke von 4  $\mu\text{m}$  angefertigt. Von besonderem Interesse war dabei der apikale Bereich der Darmepithelzellen. Dieser kann in verschiedene Mikrodomänen mit spezifischen Proteinen unterteilt werden (siehe Abbildung I-4). Dies sind die Mikrovilli, das terminale Netzwerk, die Zell-Zellkontakte und der intermikrovillare Bereich.

### 3.2.1 Lokalisation von mikrovillaren Bestandteilen

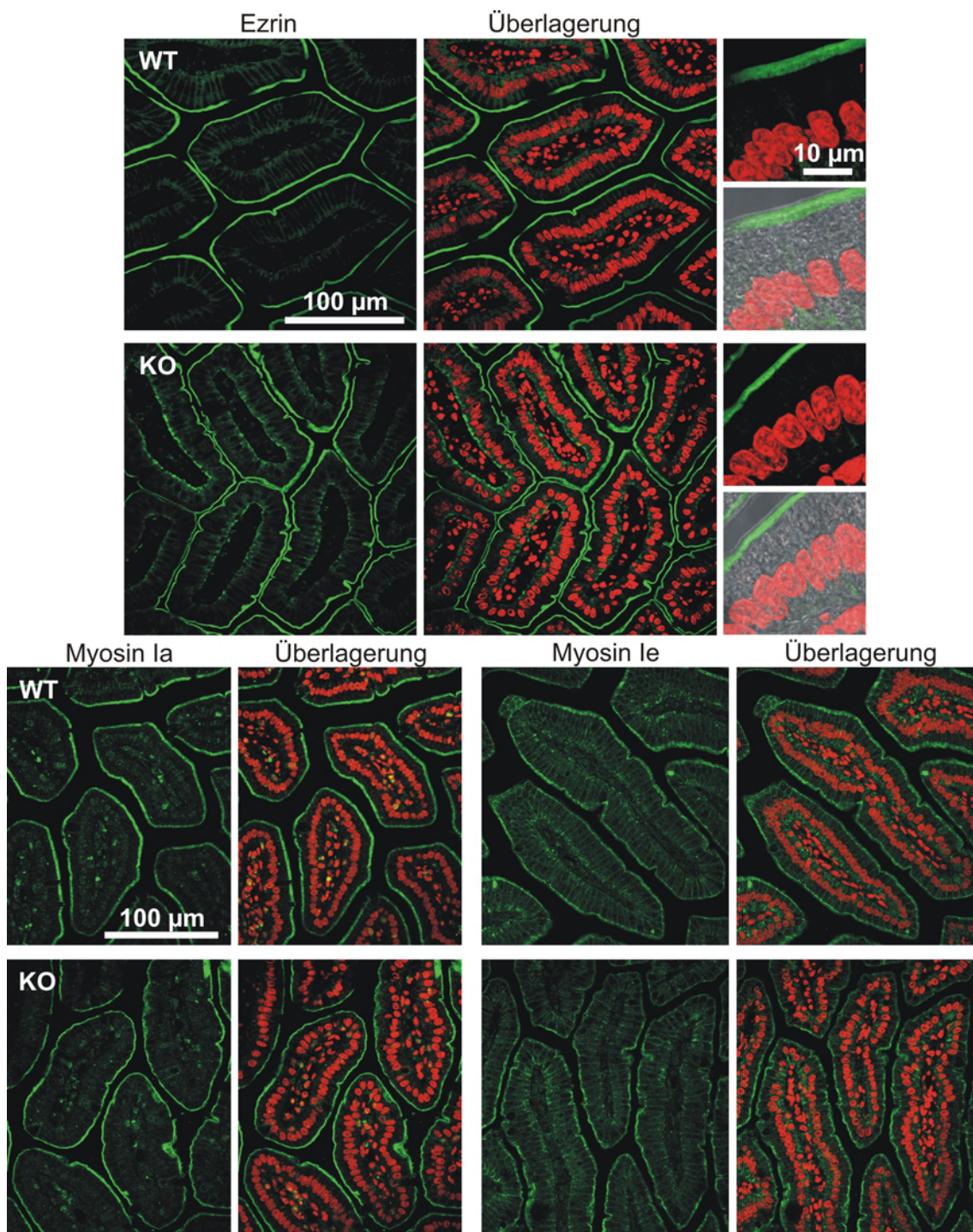
Villin, Espin und I-Plastin lokalisieren in den Mikrovilli, wo sie die F-Aktinfilamente bündeln. Von Villin und I-Plastin ist bekannt, dass sie F-Aktin auch in der Aktinwurzel bündeln (Drenckhahn et al., 1983; Drenckhahn und Dermietzel, 1988). Die gebündelten Filamente werden mit der Plasmamembran über Ezrin, Myosin Ia und Myosin Ic verknüpft (Matsudaira und Burgess, 1982; Bretscher, 1983). Für die Immunfluoreszenzanalyse von F-Aktin wurden Gefrierschnitte von 7  $\mu\text{m}$  Dicke angefertigt und mit FITC-Phalloidin angefärbt. Es wurde keine Veränderungen in der Färbung festgestellt (Abbildung III-15 C). Die Lokalisation von I-Plastin im Wildtyp und die Abwesenheit im *knockout* ist bereits gezeigt worden (Abbildung III-4). Mit spezifischen Antikörpern gegen Villin und Espin wurden sowohl im Wildtyp als auch in I-Plastin defizienten Mäusen die charakteristischen Signale im apikalen Bereich der Darmepithelzellen detektiert (Abbildung III-15 A,B). Die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen somit, dass die Abwesenheit von I-Plastin zu keiner veränderten Expression oder Lokalisation von F-Aktin und den anderen aktinbündelnden Proteinen führt.





**Abbildung III-15: Immunfluoreszenzfärbung mikrovillärer Proteine.** Paraffinschnitte (A,B; konfokale Lasermikroskopie) und Gefrierschnitte (C; konventionelle Fluoreszenzmikroskopie) vom Dünndarm (Jejunum) aus Wildtyp- (WT) und I-Plastin defizienten (KO) Mäusen wurden mit Antikörpern gegen Espin (A) bzw. Villin (B) oder mit FITC-Phalloidin (C) inkubiert. Die Kerne wurden mit Propidiumjodid (rot) angefärbt. Die Ausschnitte in A und B zeigen Vergrößerungen der jeweiligen Aufnahmen. Zusätzlich sind für Villinfärbungen Aufnahmen mit Durchlicht erstellt worden (B, rechte Spalte), die das spezifische Signal in den Mikrovilli verdeutlichen. Aktin ist sowohl in den Mikrovilli als auch in anderen Bereichen der Zelle nachweisbar (C).

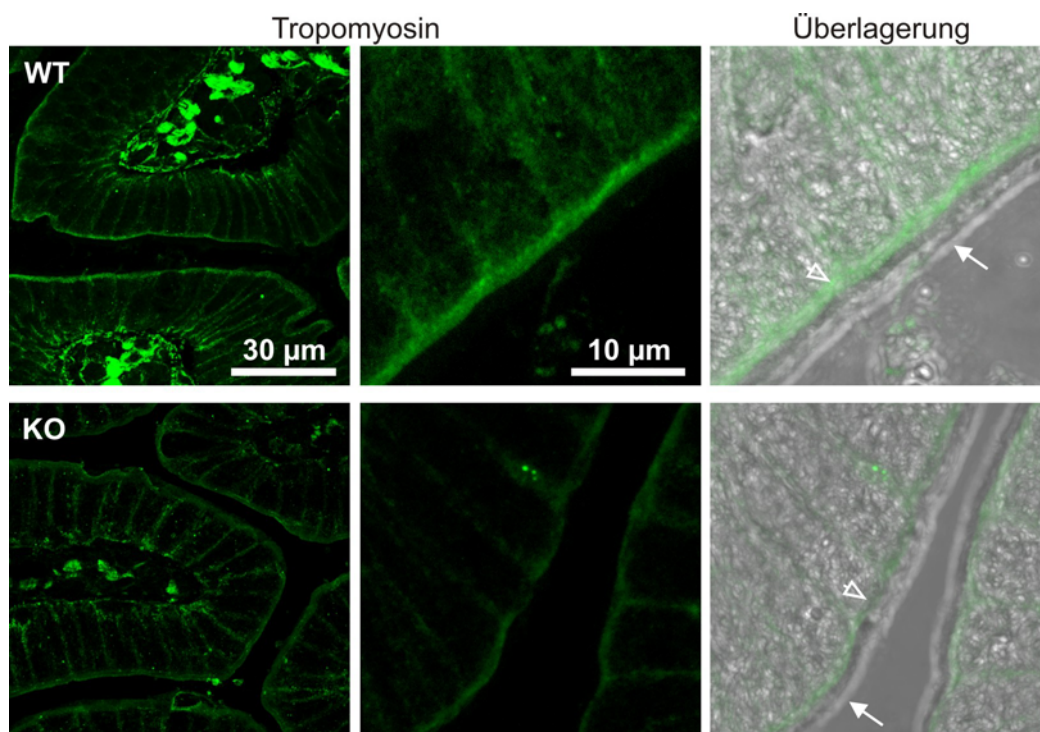
Immunfluoreszenzanalysen mit Antikörpern gegen Proteine, die die Aktinfilamente mit der Plasmamembran verknüpfen (Ezrin, Myosin Ia und Myosin Ie), zeigten ebenfalls keine Auswirkungen durch die I-Plastin-Defizienz (Abbildung III-16).



**Abbildung III-16: Die Immunlokalisation mikrovillärer Proteine ist unverändert.** Dünndarmquerschnitte von Wildtyp- (WT) und *knockout*-Mäusen (KO) wurden mit Antikörpern gegen Ezrin, Myosin Ia und Myosin Ie inkubiert. Die Fluoreszenz des Alexa488-gekoppelten Sekundäntikörpers (grün) wurde am konfokalen Lasermikroskop visualisiert. Die Zellkerne wurden mit Propidiumjodid (rot) angefärbt. Das Gewebe ist bei der Ezrinfärbung zusätzlich mit Durchlicht aufgenommen worden (kleine Abbildungen). Es sind keine Veränderungen im *knockout* im Vergleich zum Wildtyp in den Färbungen zu erkennen.

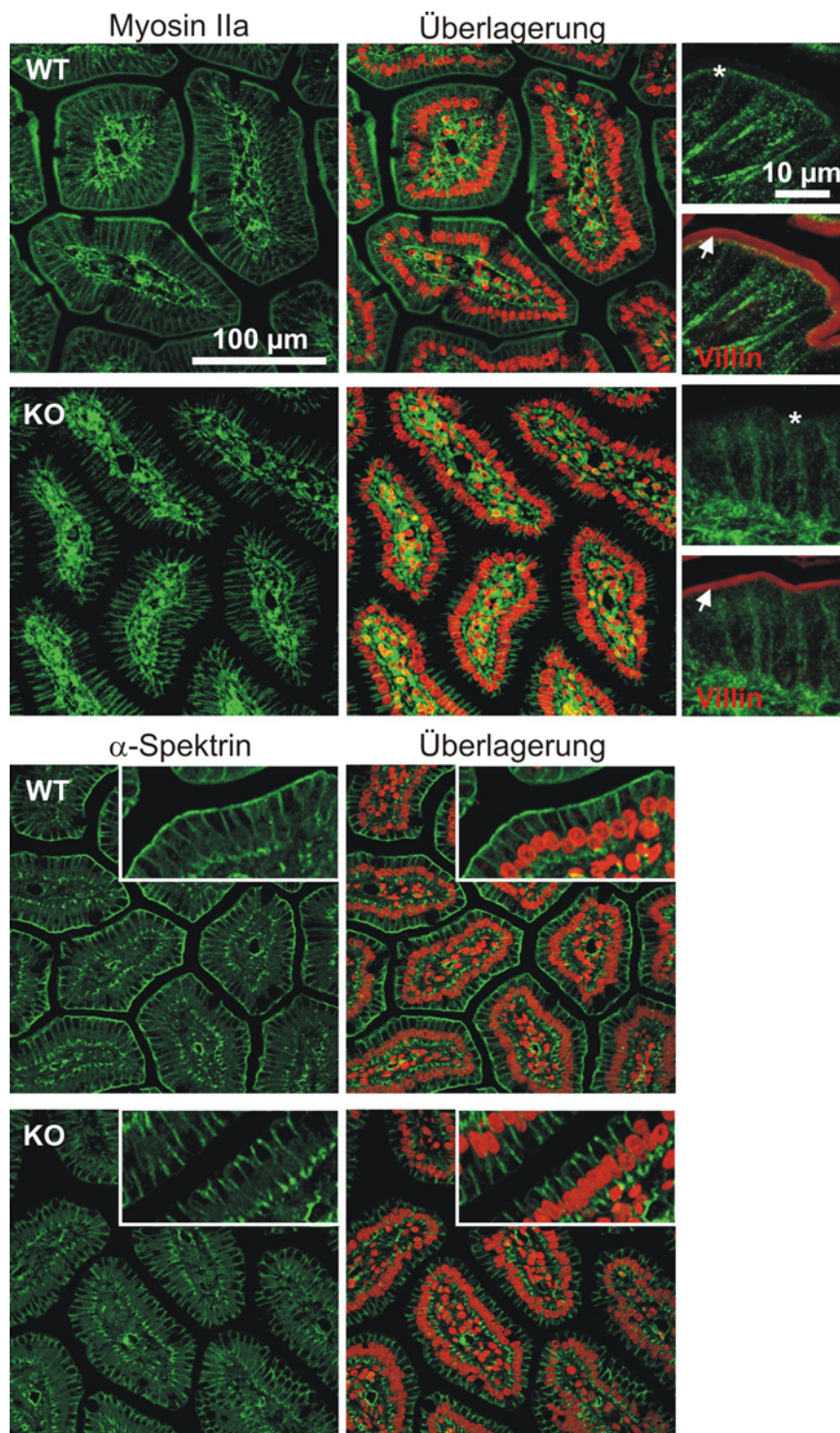
### 3.2.2 Die Lokalisation von Proteinen des terminalen Netzes ist beeinträchtigt

Die beschriebenen morphologischen Veränderungen im Bereich des terminalen Netzes und der Verlust der Aktinwurzel (3.1.2.2 und 3.1.3) führten zu der Frage, ob es in diesem Bereich zu Fehllokalisationen von Proteinen in I-Plastin defizienten Mäusen kommt. Eine wichtige Komponente von Mikrofilamenten sind Tropomyosine. Die Mitglieder dieser Genfamilie sind stabförmige *coiled coil* Dimere, die kontinuierliche Polymere an der helikalen Achse der Aktinfilamente bilden (Phillips et al., 1986). Darmepithelzellen weisen eine polarisierte Verteilung intrazellulärer Tropomyosine auf (Percival et al., 2000). Sie befinden sich lediglich im terminalen Netz an der Aktinwurzel, nicht aber an den Aktinfilamenten innerhalb der Mikrovilli (Bretscher und Weber, 1978). Tropomyosine stabilisieren die Filamente und rekrutieren weiter aktinregulatorische Proteine wie Myosine (Fanning et al., 1994). Tropomyosin 5a und 5b lokalisieren apikal in Epithelzellen (Dalby-Payne et al., 2003). Immunfluoreszenzanalysen zeigen im Wildtyp die Lokalisation unmittelbar unterhalb der Mikrovilli im terminalen Netz (Abbildung III-17). In I-Plastin defizienten Mäusen ist ein schwächeres Signal für Tropomyosin zu erkennen, da die Aktinwurzel fehlt.



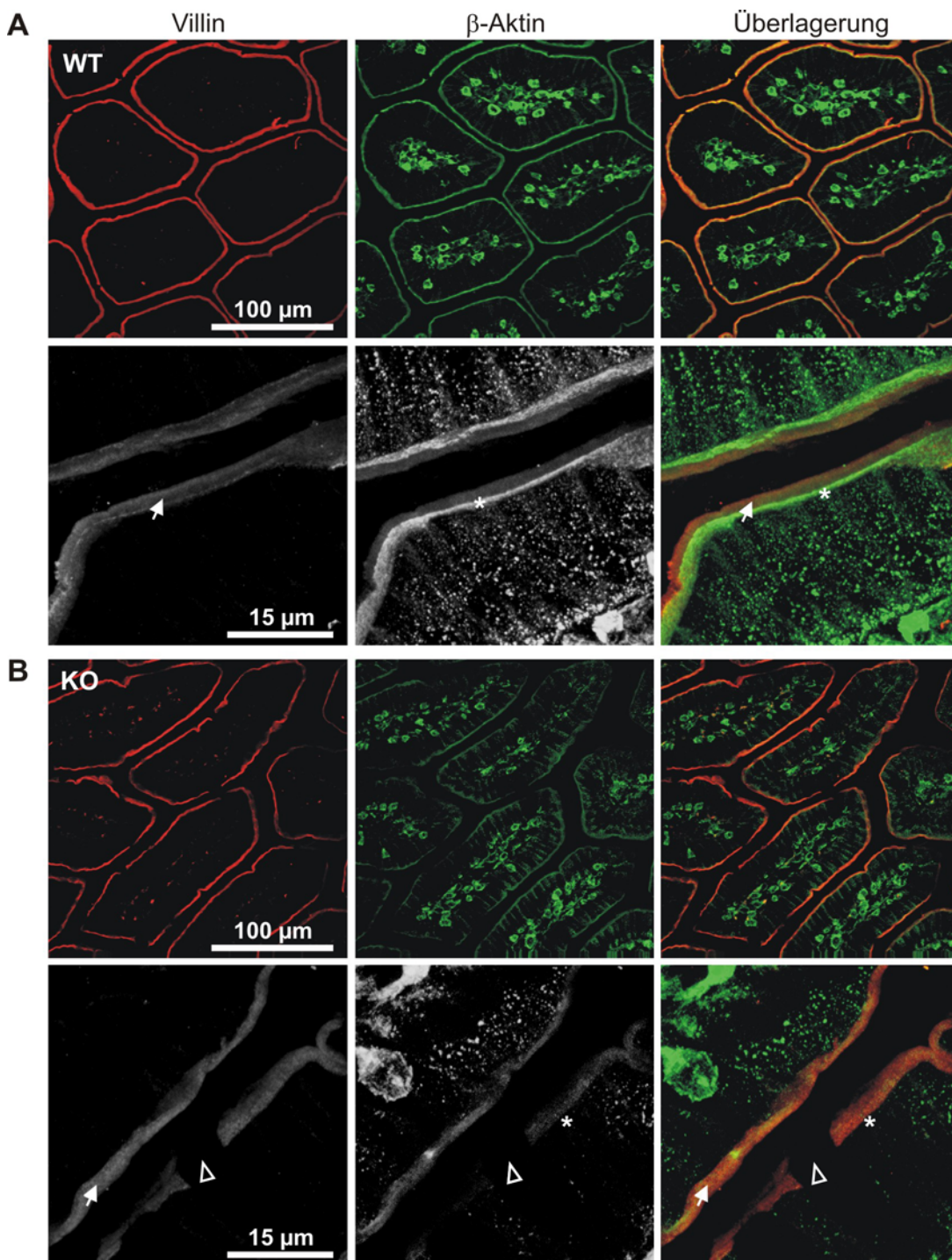
**Abbildung III-17 (vorherige Seite): Tropomyosin zeigt eine verringerte apikale Lokalisation.** Paraffinschnitte des Dünndarms wurden mit einem Antikörper gegen Tropomyosin inkubiert. Die Fluoreszenz des Alexa488-gekoppelten Sekundärantikörpers (grün) wurde mit einem konfokalen Lasermikroskop aufgenommen. Gezeigt ist zudem die Überlagerung der Fluoreszenz- mit einer Durchlichtaufnahme. Die Färbung in I-Plastin defizienten Mäusen (KO) ist im Vergleich zum Wildtyp (WT) reduziert. Die Pfeile zeigen auf die Mikrovilli und die offenen Pfeilköpfe weisen auf das terminale Netz.

Die Aktinfilamente der Mikrovilli interagieren im Bereich des terminalen Netzes mit Spektrin und Myosin IIa (Bretscher und Weber, 1978; Mooseker et al., 1978; Glenney und Glenney, 1983; Hirokawa et al., 1983). Die genaue Lokalisation dieser Komponenten wurde bereits mit Hilfe des Schockgefrierfahrens detailliert untersucht (Hirokawa et al., 1982). Spektrin ist ein aktinquervernetzendes Protein, das Calmodulin bindet (Glenney et al., 1982a). Myosin IIa ist dafür bekannt, dass es zum einen die Aktinbündel der Aktinwurzeln verknüpft (Mooseker, 1985) und zum anderen mit den Aktinfilamentbündeln der Adhäsionsverbindungen assoziiert ist (Hirokawa et al., 1982). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Lokalisation dieser Proteine mit Hilfe der Immunfluoreszenz untersucht. Es zeigte sich, dass der Verlust von I-Plastin zu starken Veränderungen in ihrer Lokalisation führt (Abbildung III-18). Sowohl Spektrin als auch Myosin IIa sind in *knockout*-Mäusen im Bereich des terminalen Netzes nicht mehr detektierbar. Beide lokalisieren allerdings auch weiterhin basolateral. Eine Kofärbung von Myosin IIa und Villin zeigt, dass die Veränderung sich nur auf den Bereich des terminalen Netzes bezieht.



**Abbildung III-18: Im terminalen Netz sind Spektrin und Myosin IIa reduziert.** Paraffinschnitte des Dünndarms wurden mit Antikörpern gegen Spektrin und Myosin IIa (beide in grün) inkubiert. Im Wildtyp (WT) lokalisieren beide sowohl im terminalen Netz als auch basolateral. In I-Plastin defizienten Mäusen (KO) wurden beide Proteine im terminalen Netz nicht mehr detektiert. Eine Kofärbung von Myosin IIa und Villin zeigt, dass die Mikro villi (Pfeile) intakt sind (Sterne kennzeichnen das terminale Netz). Die Zellkerne wurden mit Propidiumjodid (rot) gefärbt. Die kleinen Kästchen innerhalb der Spektrinbilder zeigen Vergrößerungen der dargestellten Aufnahmen.

Bei Wirbeltieren sind drei Aktinegene bekannt, die mit  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  bezeichnet werden und sich in ihrer Aminosäuresequenz geringfügig unterscheiden. In nicht muskulären Zellen treten hauptsächlich  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aktin auf (Vandekerckhove und Weber, 1978; Hofer et al., 1997). Es ist bekannt, dass parietale Zellen des Magens eine differenzielle Verteilung von Isoformen dieser Aktine aufweisen.  $\beta$ -Aktin ist in diesen Zellen vornehmlich apikal lokalisiert (Yao et al., 1995). In einer epithelialen Zelllinie aus der Niere ist  $\beta$ -Aktin ebenfalls vermehrt an der Peripherie zu finden, während  $\gamma$ -Aktin überwiegend im Zytoplasma lokalisiert (Korrapati et al., 2007). Im Bürstensaum der Darmepithelzellen sind spezielle Aktinisoformen entdeckt worden, die N-terminal den zytoplasmatischen Isoformen ähneln, zusätzlich aber ein Epitop besitzen, welches diesen fehlt und nur in muskulären Isoformen vorkommt (Sawtell et al., 1988). In der vorliegenden Arbeit wurde neben der F-Aktin-Färbung durch Phalloidin (Abbildung III-15) ein  $\beta$ -Aktin spezifischer Antikörper in Immunfluoreszenzanalysen an Paraffinschnitten verwendet. Im Wildtyp wurde mit diesem Antikörper neben einer punktierten zytoplasmatischen Verteilung ein schwaches mikrovilläres Signal und eine Anreicherung im terminalen Netz detektiert, wie die Kofärbung mit Villin zeigte (Abbildung III-19 A). In I-Plastin defizienten Mäusen wurden mit Hilfe dieser Kofärbung die Defekte im terminalen Netz bestätigt (Abbildung III-19 B). Die  $\beta$ -Aktin-Anreicherung im terminalen Netz fehlte, während  $\beta$ -Aktin im Zytoplasma und in den Mikrovilli noch nachweisbar war.

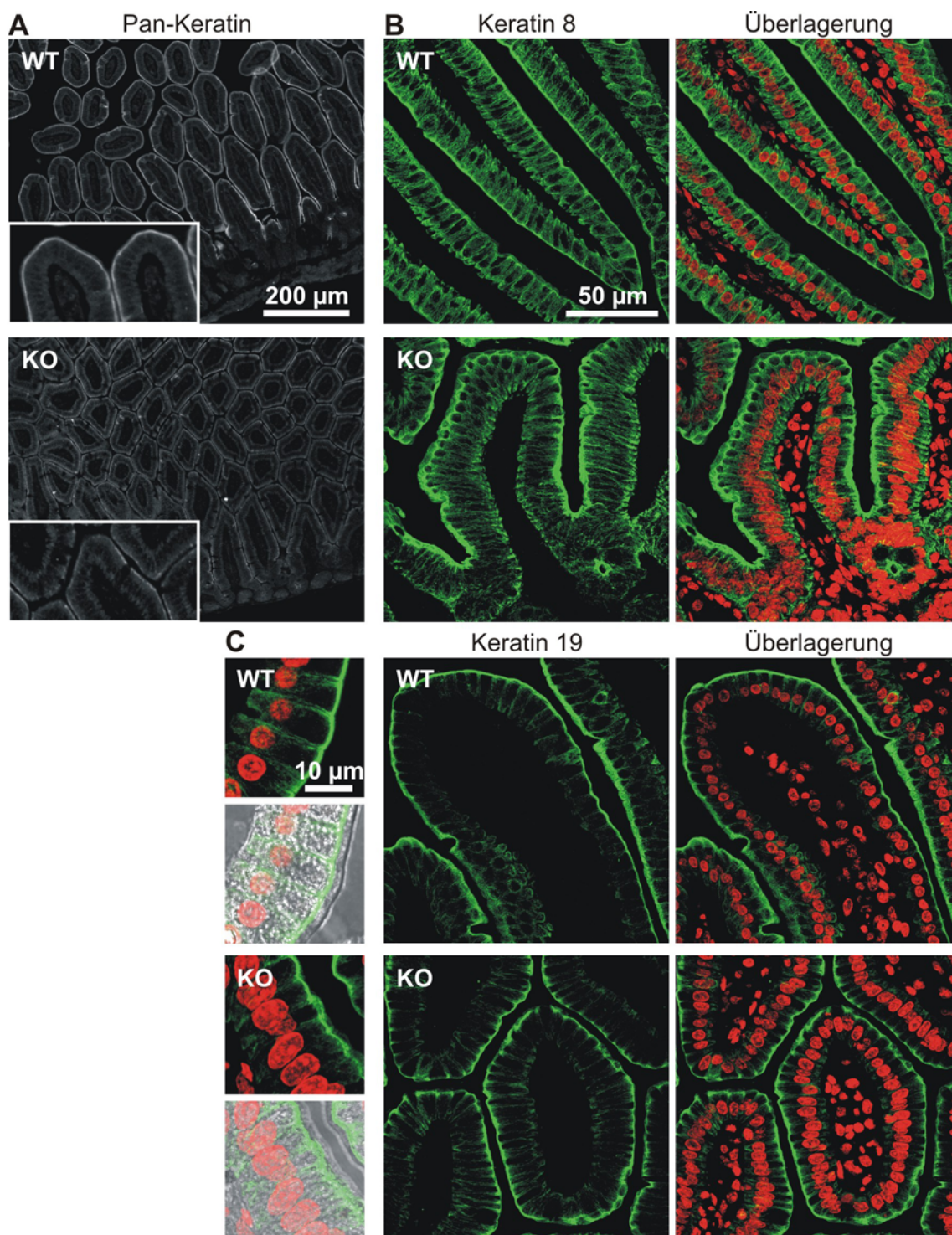


**Abbildung III-19: In I-Plastin defizienten Mäusen ist die Lokalisation von  $\beta$ -Aktin verändert.** Paraffinschnitte des Dünndarms (Jejunum) von Wildtyp- (WT; **A**) und *knockout*- (KO; **B**) Mäusen wurden mit Antikörpern gegen Villin und  $\beta$ -Aktin inkubiert. Die Fluoreszenz der Alexa488- (grün) und Alexa568- (rot) gekoppelten Sekundärantikörper wurden am konfokalen Lasermikroskop aufgenommen. Die höhere Vergrößerung (**A**, in schwarz-weiß dargestellt) im Wildtyp zeigt deutlich, dass  $\beta$ -Aktin im terminalen Netz angereichert ist, aber auch in den Mikrovilli und im Zytoplasma detektiert werden kann. In der gleichen Vergrößerung von Darmepithelzellen mit I-Plastin-Defizienz ist keine Anreicherung im terminalen Netz zu erkennen (**B**). Die „Lücke“ (offener Pfeilkopf in **B**) in der Villin- wie auch in der  $\beta$ -Aktin-Färbung im KO resultiert aus einer Becherzelle. Somit wurden auch mit dieser Färbung Defekte unterhalb der Mikrovilli bestätigt. Die Pfeile weisen auf die Mikrovilli, während Sterne das terminale Netz kennzeichnen.

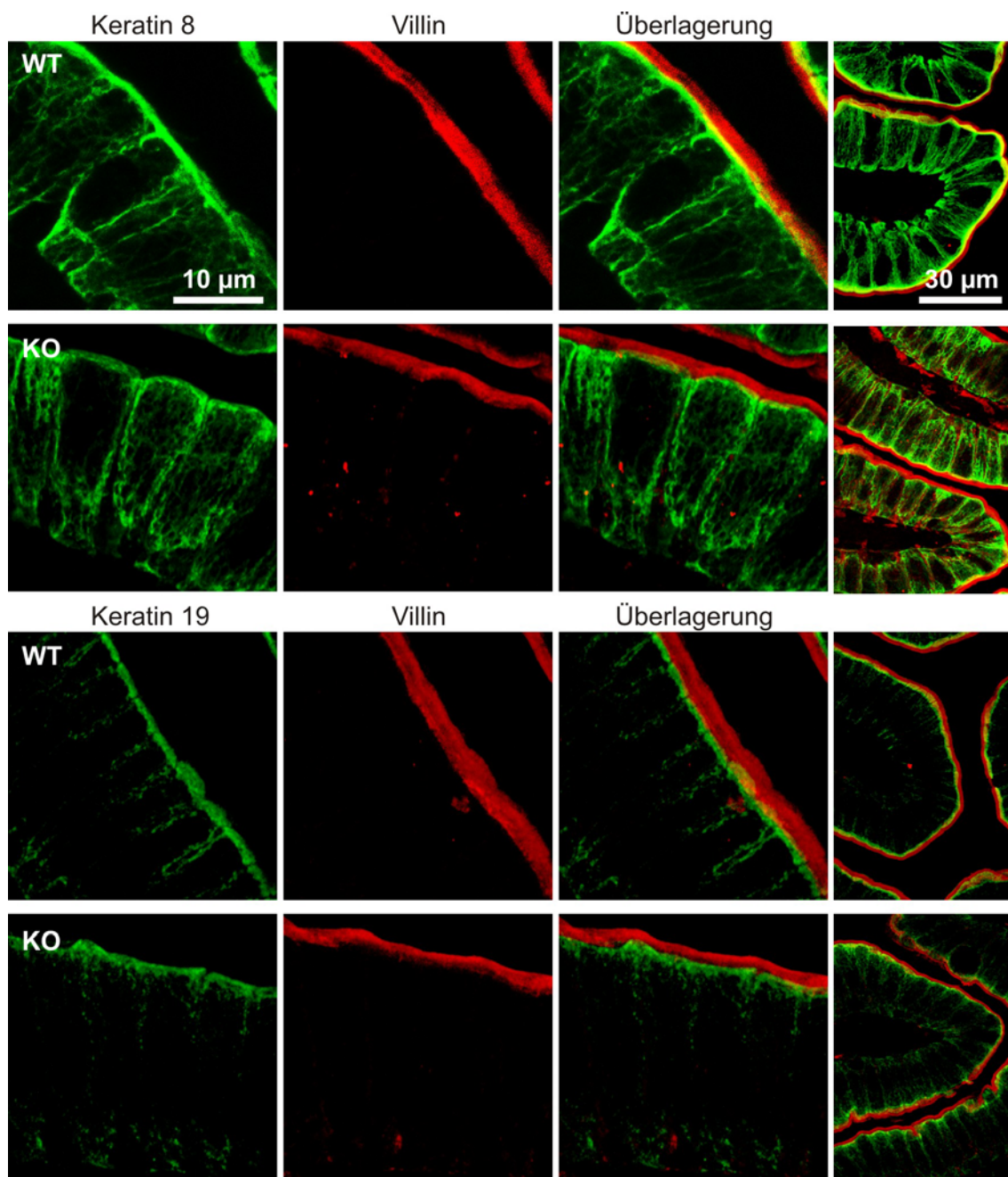
Im unteren Bereich und unterhalb des terminalen Netzes sind die Intermediärfilamente lokalisiert (vgl. Abbildung I-4). In den Epithelzellen sind dies verschiedene Keratinarten, die zu einem Netzwerk kopolymerisieren. In Darmepithelzellen werden die Keratine 8 (Typ II) sowie die Keratine 18, 19 und 20 (Typ I) exprimiert.

Es ist hier gezeigt worden, dass die I-Plastin-Defizienz große Auswirkungen auf die Lokalisation von Proteinen im terminalen Netz hat. Aus diesem Grund sollte mit Hilfe eines polyklonalen Keratinantikörpers, der mehrere Keratine erkennt, überprüft werden, ob die Intermediärfilamente ebenfalls betroffen sind. In Immunfluoreszenzstudien zeigte sich auch hier ein deutlich vermindertes Signal (Abbildung III-20 A). Sowohl spezifische Färbungen von Keratin 8 bzw. 19 alleine (Abbildung III-20 B und C) als auch nähere Betrachtungen von Kofärbungen mit Villin (Abbildung III-21) konnten dies nicht bestätigen. Die Auflösung ist zu gering, um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die Keratinfilamente mehr apikal liegen. Dies zeigen TEM-Aufnahmen (Abbildung III-11) mit der verkleinerten organellenfreien Zone sowie die TEM-Aufnahmen von isolierten Bürstensäumen (Abbildung III-14). Die mit dem polyklonalen Antikörper detektierten Defekte in I-Plastin defizienten Mäusen können aus Fehllokalisationen anderer Keratinen resultieren.





**Abbildung III-20: Immunfluoreszenzanalyse der Keratinfilamente.** Die Lokalisation der Keratine wurde in Paraffinschnitten des Dünndarms analysiert. Zunächst wurden Paraffinschnitte mit einem polyklonalen Keratinantikörper (Pan-Keratin; **A**), der mehrere Keratine erkennt, inkubiert und die Fluoreszenz eines Alexa488-gekoppelten Sekundäntikörpers mittels konventioneller Fluoreszenzmikroskopie untersucht. In I-Plastin defizienten Mäusen (KO) wurde im terminalen Netz ein deutlich schwächeres Signal als im Wildtyp (WT) detektiert. Ausschnitte innerhalb der Abbildungen zeigen Bereiche bei höherer Vergrößerung. Konfokale Aufnahmen der Immunlokalisation von Keratin 8 (**B**) und 19 (**C**) zeigen keine sichtbaren Veränderungen. Die Kerne wurden mit Propidiumjodid (rot) angefärbt. Für Keratin 19 sind zusätzlich höhere Vergrößerungen mit Durchlicht dargestellt.



**Abbildung III-21: Kofärbung verschiedener Keratine mit Villin.** Paraffinschnitte vom Dünndarm (Jejunum) aus Wildtyp- (WT) und I-Plastin defizienten Mäusen (KO) wurden mit Antikörpern gegen Keratin 8 bzw. 19 und Villin inkubiert. Die Fluoreszenzen von Alexa488- (grün) und Alexa568- (rot) gekoppelten Sekundäntikörpern wurden am konfokalen Laser-mikroskop aufgenommen. Bei dieser Vergrößerung wurden keine Veränderungen zwischen Wildtyp und *knockout* festgestellt.

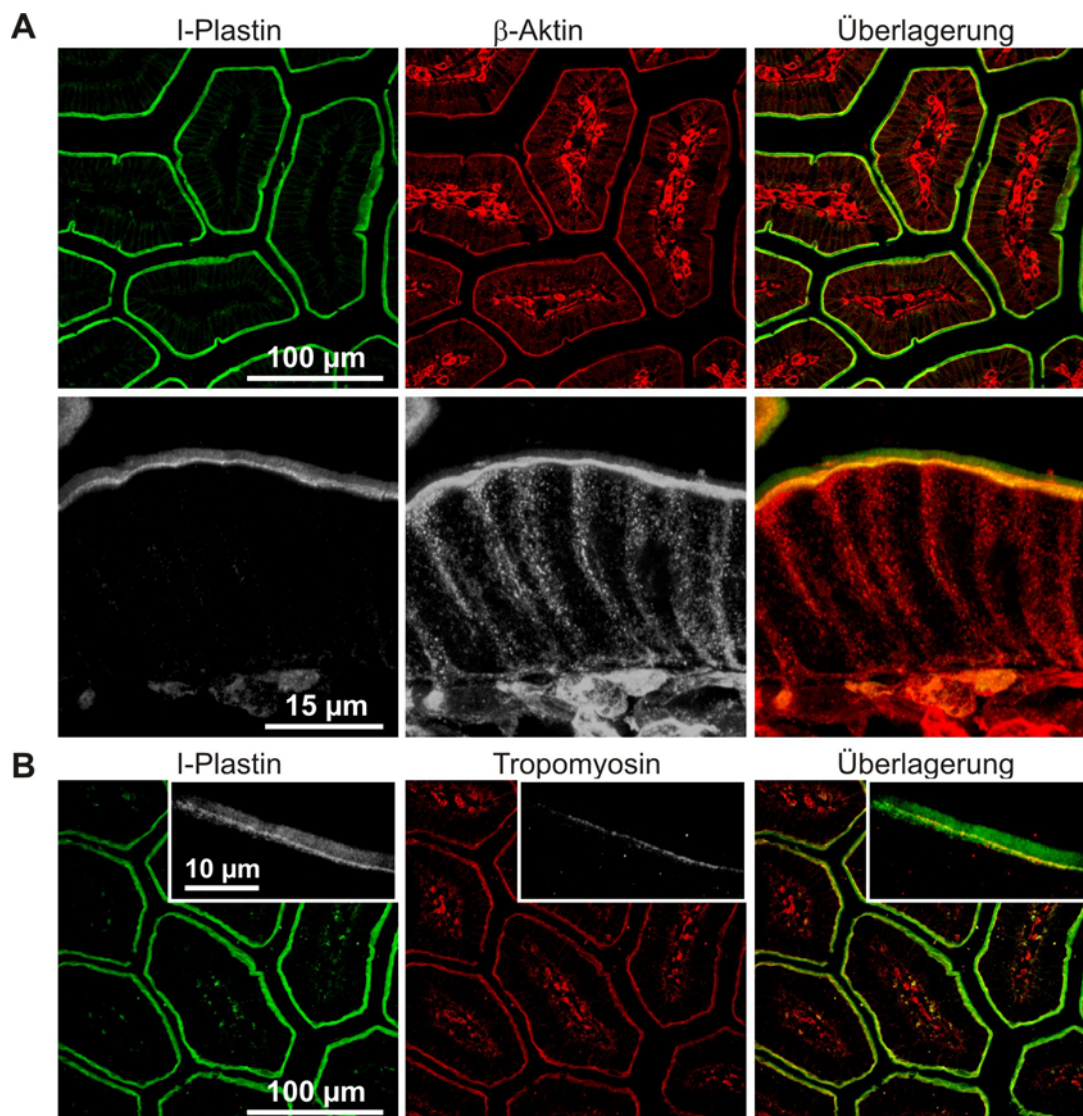
Um zu überprüfen, ob es weitere Veränderungen in den Aktin-, Intermediärfilamenten und/oder bei den Mikrotubuli gibt, wurde die Lokalisation von zwei Mitgliedern der Plakinfamilie mittels Immunfluoreszenz untersucht. Zu der Plakinfamilie gehören die Plektine, die mit allen drei Netzwerken assoziieren (Seifert et al., 1992; Svitkina et al., 1996). Sie sind wichtige Organisatoren und Linkerelemente des Zytoskeletts und

weisen eine subapikale Lokalisation in Darmepithelzellen auf (Wiche et al., 1983). Es ist bekannt, dass Plektin unter anderem mit Keratin 8/19 assoziiert. MACF1, das in fast allen Geweben exprimiert wird, gehört ebenfalls zu der Plakinfamilie und interagiert mit Mikrotubuli und Aktinfilamenten (Kodama et al., 2003; Sonnenberg und Liem, 2007).

Für die Immunfluoreszenzanalyse wurden Paraffinschnitte mit einem polyklonalen Plektinantikörper oder mit einem MACF1iso3 Antikörper inkubiert (Anhang Abbildung A-2). Plektin und MACF1 lokalisierten sowohl in I-Plastin defizienten Mäusen als auch im Wildtyp vorwiegend subapikal. Eine mögliche apikalere Verlagerung konnte mit dieser Methode nicht gezeigt werden.

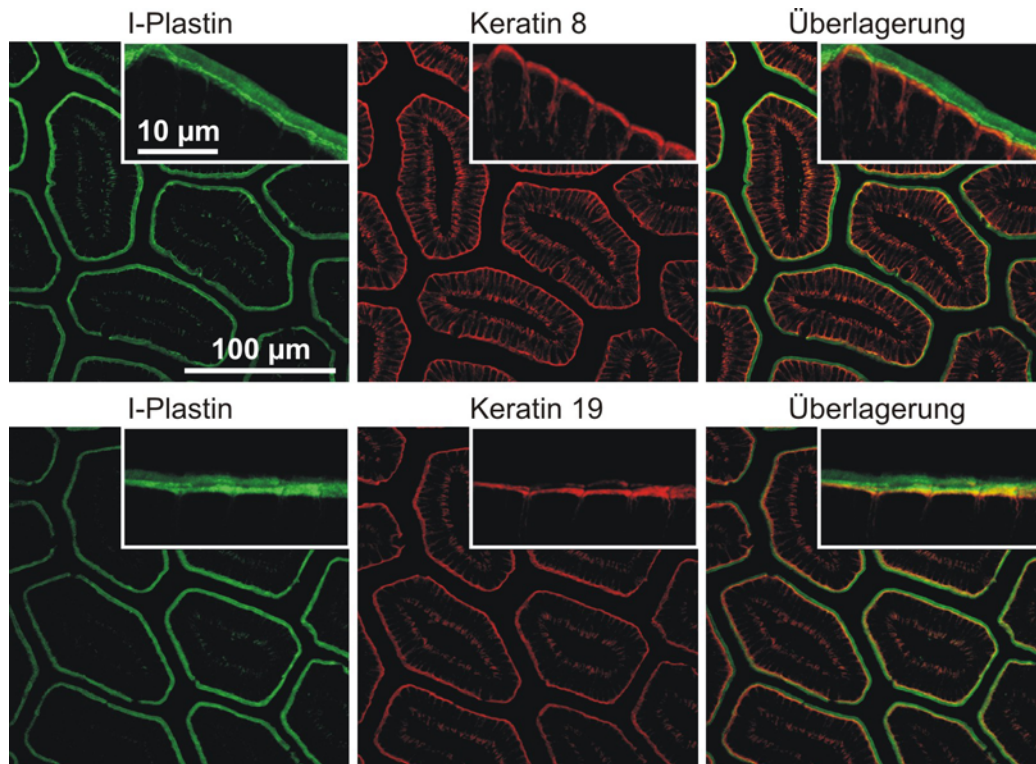
### 3.3 I-Plastin ist im terminalen Netz angereichert

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die I-Plastin-Defizienz wesentliche Auswirkungen auf die Struktur und die Proteinkomposition des terminalen Netzes hat. Villin defiziente Mäuse zeigen keinen solchen Defekt (Ferrary et al., 1999), obwohl die Aktinfilamente der Aktinwurzel von Villin und I-Plastin gebündelt werden. Aus diesem Grund wurde die Immunlokalisation dieser Proteine näher betrachtet. Dabei zeigte sich, dass Villin bei jeder Vergrößerung gleichmäßig verteilt in den Aktinfilamenten der Mikrovilli lokalisiert (vgl. Abbildung III-15, III-19 und III-21). Dagegen wurde für I-Plastin in höherer Vergrößerung gezeigt, dass es im Vergleich zur mikrovillaren Färbung im terminalen Netz angereichert ist. Um darzulegen, dass es sich bei diesen Bereich um das terminale Netz handelt, wurden Paraffinschnitte des Dünndarms aus Wildtypmäusen sowohl mit I-Plastin als auch mit  $\beta$ -Aktin oder Tropomyosin als Marker des terminalen Netzes kogefärbt (Abbildung III-22 A und B). Beide Färbungen zeigen durch Kolo-kalisation, dass die Anreicherung von I-Plastin im Bereich des terminalen Netzes vorliegt. Zudem legen die Defekte im terminalen Netz bei I-Plastin-Defizienz eine spezifische Funktion von I-Plastin in dieser Domäne nahe.



**Abbildung III-22: I-Plastin ist im terminalen Netz angereichert.** Paraffinschnitte vom Dünndarm (Jejunum) aus Wildtypmäusen wurden mit Antikörpern gegen I-Plastin (grün) und  $\beta$ -Aktin (rot; **A**) bzw. Tropomyosin (rot; **B**) inkubiert. Die Fluoreszenz der Alexa488- (grün) und Alexa568- (rot) gekoppelten Sekundärantikörper wurden am konfokalen Lasermikroskop aufgenommen. In den I-Plastin-Färbungen ist deutlich die apikale Lokalisation sowie die Anreicherung zu erkennen. Die Anreicherung von I-Plastin befindet sich im Bereich des terminalen Netzes, wie die Kolokalisationen mit den Markern zeigen.

Um die Lokalisation von I-Plastin im terminalen Netz weiter zu untersuchen, wurden Doppelfärbungen mit den Keratinen 8 bzw. 19 angefertigt. Dies sollte zeigen, ob I-Plastin auch weiter unterhalb der Mikrovilli lokalisiert. In den Doppelfärbungen von I-Plastin mit den Keratinen wurde teilweise eine Kolokalisation nachgewiesen (Abbildung III-23).

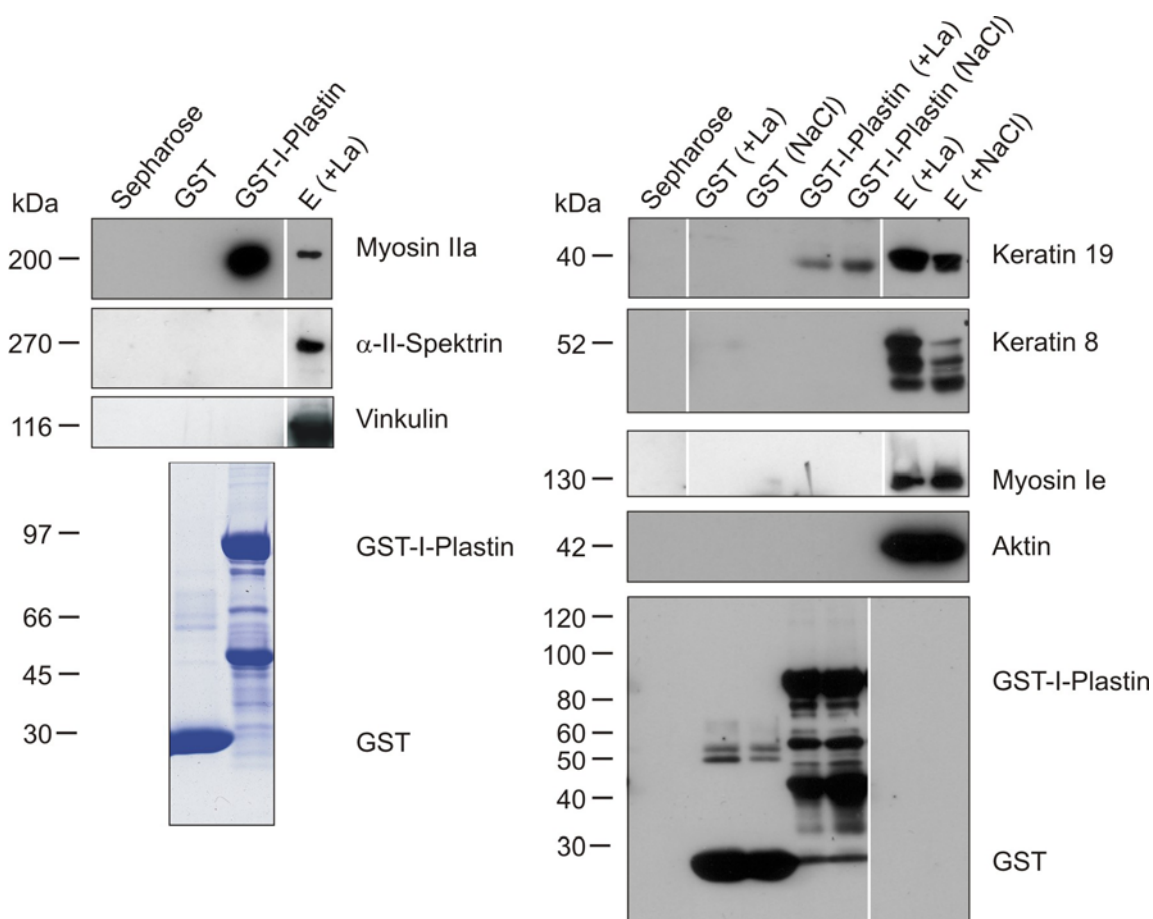


**Abbildung III-23: I-Plastin kolokalisiert mit Keratinfilamenten.** Dargestellt sind Paraffinschnitte vom Dünndarm (Jejunum) aus Wildtypmäusen. Die Schnitte wurden mit Antikörpern gegen I-Plastin (grün) und Keratin 8 bzw. 19 (rot) inkubiert. Die Fluoreszenzen der Alexa488- (grün) und Alexa568- (rot) gekoppelten Sekundäntikörper wurden am konfokalen Lasermikroskop aufgenommen. I-Plastin kolokalisiert sowohl mit Keratin 8 als auch Keratin 19.

### 3.4 I-Plastin bindet an Komponenten des terminalen Netzes

Ein besonders auffallendes Merkmal I-Plastin defizienter Mäuse ist die fehlende Aktinwurzel, die von den Mikrovilli in das terminale Netz reicht. Bisher ist bekannt, dass die Aktinfilamente der Mikrovilli im terminalen Netzwerk über Spektrin und Myosin IIa verankert sind. Es stellte sich nun aber die Frage, welche Rolle I-Plastin bei dieser Verankerung hat. Für andere aktinbindende Proteine wie Dystrophin und Supervillin ist bekannt, dass sie neben Aktin auch an Keratine bzw. Myosin II binden (Chen et al., 2003b; Stone et al., 2005). I-Plastin bindet zudem in Makrophagen an Vimentin (Correia et al., 1999). Um zu überprüfen, ob I-Plastin mit Proteinen im terminalen Netz interagiert, wo es vermehrt vorkommt (Abbildung III-22 und III-23) wurden GST-Kopräzipitationen durchgeführt. Rekombinantes GST-I-Plastin wurde mit Lysaten aus Epithelzellen und isolierten Bürstensäumen sowohl ohne als auch in Anwesenheit von Latrunkulin A inkubiert. Sofern kein Latrunkulin A eingesetzt wurde, ist mit einer erhöhten Salzkonzentration gewaschen worden. Durch Zugabe von Latrunkulin kann eine indirekte Bindung über F-Aktin ausgeschlossen werden. Nach Auftrennung der

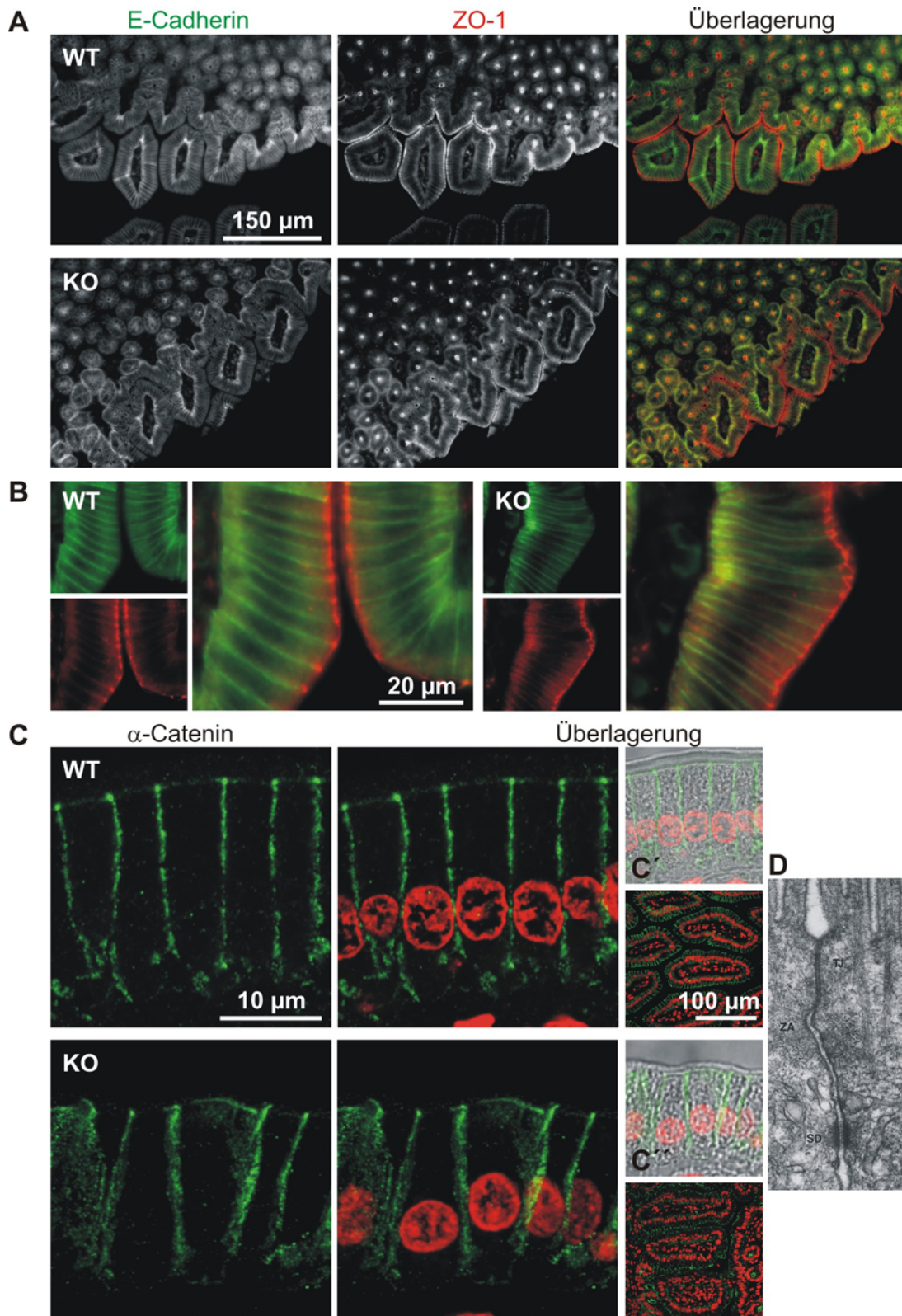
Proteinkomplexe durch SDS-PAGE wurden die Proteine zunächst mit *Coomassie* blau anfärbt. Eine Analyse der resultierenden Banden mit Hilfe der Massenspektrometrie war nicht möglich, da das GST-I-Plastin-Konstrukt viele Degradationsbanden aufwies. Aus diesem Grund wurden mittels *Western Blot* Analysen potenzielle Interaktionspartner auf ihre Bindung untersucht. In Abbildung III-24 sind die Ergebnisse der Kopräzipitationen mit Darmepithelzelllysaten dargestellt. In Versuchen mit Bürstensäumen wurden die gleichen Ergebnisse erzielt. Mit Hilfe einer Detektion mit einem Aktinantikörper konnte eine indirekte Bindung über Aktin ausgeschlossen werden. Außerdem müsste F-Aktin vorliegen, da beispielsweise sowohl I-Plastin als auch Myosin nur an dieses binden. Wie die Abbildung zeigt, interagiert I-Plastin anscheinend mit Keratin 19 und Myosin IIa. Dagegen konnte eine Interaktion mit Keratin 8,  $\alpha$ -Spektrin, Myosin Ie und Vinkulin ausgeschlossen werden. Die Interaktionen müssen mit weiteren Analysen verifiziert werden.



**Abbildung III-24: I-Plastin interagiert mit Keratin 19 und Myosin IIa.** An Glutathion-Sepharose immobilisiertes GST-I-Plastin oder GST wurden in Anwesenheit von Latrunkulin A (La) oder ohne Latrunkulin (NaCl) mit Epithelzelllysat (E) inkubiert. Als Kontrolle wurden die Lysate mit der Sepharose-Matrix alleine inkubiert. Die Proteinkomplexe wurden per SDS-PAGE aufgetrennt, mit *Coomassie* blau gefärbt oder im *Western Blot* analysiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit sekundären, an Peroxidase gekoppelten, Antikörpern und anschließender Chemilumineszenz. Die Immundetektionen mit GST und I-Plastin (hier nicht gezeigt) dienten als Positivkontrollen.

### 3.5 Analyse der Zell-Zellkontakte und basolateraler Marker

Die Erkenntnis aus der Rasterelektronenmikroskopie (3.1.2.1), dass die Zellgrenzen in I-Plastin defizienten Mäusen deutlicher zu erkennen sind, führte zu der Vermutung, dass bei Verlust von I-Plastin die Zell-Zellkontakte beeinträchtigt sein könnten. Dazu wurden Markerproteine für die *Tight Junctions* und die Adhäsionsverbindungen untersucht. *Tight Junctions* versiegeln benachbarte Zellen, um das Austreten von Molekülen zwischen ihnen zu verhindern. Den interzellulären Raum verschließen die extrazellulären Domänen der Transmembranproteine. Den Hauptteil dieser Proteine bilden die Claudine und Occludine, die mit den peripheren intrazellulären Proteinen, den *Zonula occludens* (ZO)-Proteinen verbunden sind. Die ZO-Proteine verbinden die Stränge mit dem Aktinzytoskelett. Die Adhäsionsverbindungen liegen unterhalb der *Tight Junctions* und verbinden die Zellen miteinander (Abbildung III-25, EM-Aufnahme), indem sie Aktinbündel einer Zelle mit einem gleichartigen Bündel einer Nachbarzelle verknüpfen. Als transmembranale Adhäsionsproteine dienen in Epithelzellen die E-Cadherine. Aktin ist mit den Adhäsionsverbindungen über Ankerproteinkomplexe verbunden (Alberts et al., 2004). Um die beschriebenen Zell-Zellkontakte zu untersuchen, wurden Paraffinschnitte des Darms von Wildtyp- und I-Plastin defizienten Mäusen mit Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Mit einem Antikörper gegen ZO-1 wurden keine Unterschiede in den *Tight Junctions* detektiert (Abbildung III-25 und im Anhang Abbildung A-3). Eine Beeinträchtigung der Funktionalität der Zell-Zellkontakte in I-Plastin defizienten Mäusen kann nicht ausgeschlossen werden, da es mit dieser Methode nicht getestet werden kann.

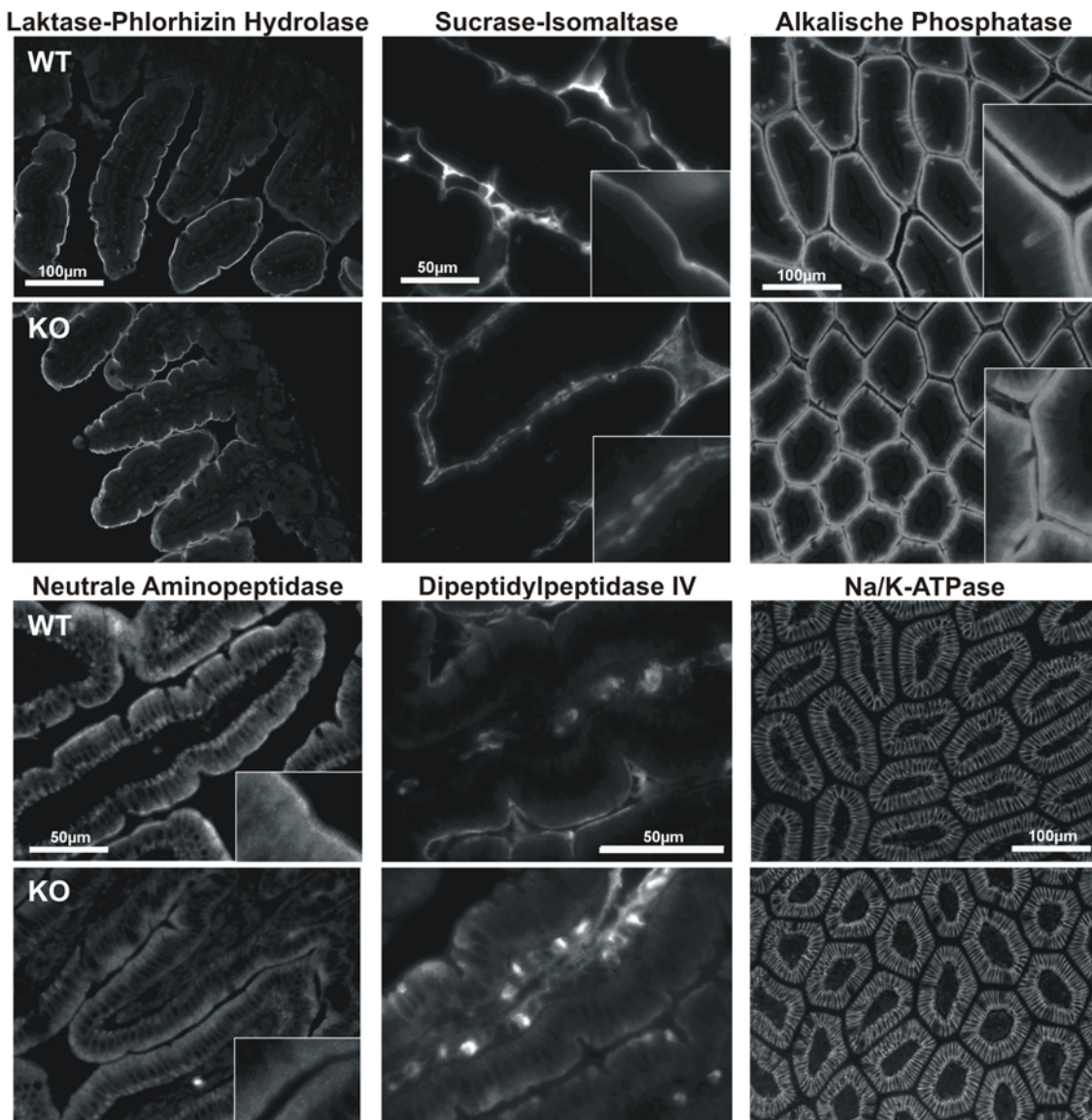




**Abbildung III-25 (vorherige Seite): Die Lokalisation von Proteinen der Zell-Zellkontakte ist nicht beeinträchtigt.** Paraffinschnitte des Dünndarms (Jejunum) von Wildtyp- (WT) und I-Plastin defizienten (KO) Mäusen wurden mit Antikörpern gegen Proteine der *Tight Junctions* (ZO-1; **A,B**) und der Adhäsionsverbindungen (E-Cadherin; **A,B** und  $\alpha$ -Catenin; **C**) inkubiert. Die Fluoreszenz der Alexa488- (grün) und Alexa568- (rot) gekoppelten Sekundärantikörper wurde bei der Doppelfärbung von E-Cadherin und ZO-1 mittels konventioneller Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen. Es sind zusätzlich vergrößerte Ausschnitte in B dargestellt. E-Cadherin färbt die basolaterale Membran der epithelialen Zellen, während ZO-1 vorwiegend apikal lokalisiert. Konfokale Aufnahmen einer  $\alpha$ -Catenin-Färbung (grün; **C**) zeigen ein ähnliches basolaterales Muster wie E-Cadherin. Die Zellkerne sind hier mit Propidiumjodid (rot) angefärbt. Die Überlagerungen mit Durchlichtaufnahmen (**C'** und **C''**) zeigen die Färbung unterhalb der Mikrovilli an den Zell-Zellkontakten. Es wurden keine Unterschiede in der Lokalisation dieser Proteine in Wildtyp- (WT) und *knockout*- (KO) Mäusen festgestellt. Die TEM-Aufnahme (**D**, entnommen aus Hull und Staehelin, 1979) zeigt die Zell-Zellkontakte zweier benachbarter Darmepithelzellen. TJ: *Tight Junction*; ZA: Adhäsionsverbindung oder *Zonula adherens*; SD: *Desmosom* oder *spot desmosome*.

### 3.6 Lokalisation apikaler Enzyme

Die Hauptaufgabe des Dünndarms ist die Resorption von Nahrungsbestandteilen in das Blut. Um diese in großen Mengen aufnehmen zu können, ist die Darmoberfläche mit Villi und Mikrovilli 300fach vergrößert. Enzyme in der Bürstensaummembran helfen bei den letzten Schritten der Nahrungsverdauung. Aus komplexen Kohlenhydraten entstehen einfache Zucker (durch Poly- und Disaccharidasen) und Proteine werden in einzelne Aminosäuren zerlegt (durch Peptidasen). Mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen wurde die Lokalisation einiger Verdauungsenzyme an Paraffinschnitten des Dünndarms (Jejunum) von Wildtyp- und I-Plastin defizienten Mäusen untersucht (Abbildung III-26). Die Disaccharidasen Laktase-Phlorhizin Hydrolase und Sucrase-Isomaltase sind integrale Membranglykoproteine des Bürstensaums (Frank et al., 1978; Brunner et al., 1979; Semenza, 1987; Semenza und Auricchio, 1989). Sowohl im Wildtyp als auch in I-Plastin defizienten Mäusen ist daher eine apikale Färbung zu erkennen. Bei näherer Betrachtung erkennt man, dass in *knockout*-Mäusen die Färbung der Sucrase-Isomaltase schwächer und unschärfer im Vergleich zu Wildtypmäusen verläuft. Des Weiteren wurden als Vertreter der Peptidasen Paraffinschnitte mit Antikörpern gegen die Neutrale Aminopeptidase und die Dipeptidylpeptidase IV inkubiert. In I-Plastin defizienten Mäusen fehlte für beide Peptidasen die apikale Lokalisation, wie sie in Wildtypmäusen detektiert wurde. Die histochemische Untersuchung der Lokalisation der Alkalischen Phosphatase zeigte eine diffusere Färbung in Abwesenheit von I-Plastin. Basolaterale Membranproteine wie die Natrium/Kalium-ATPase und wie zuvor die Proteine der Adhäsionsverbindungen zeigten keine Lokalisationsdefekte (Abbildung III-26).

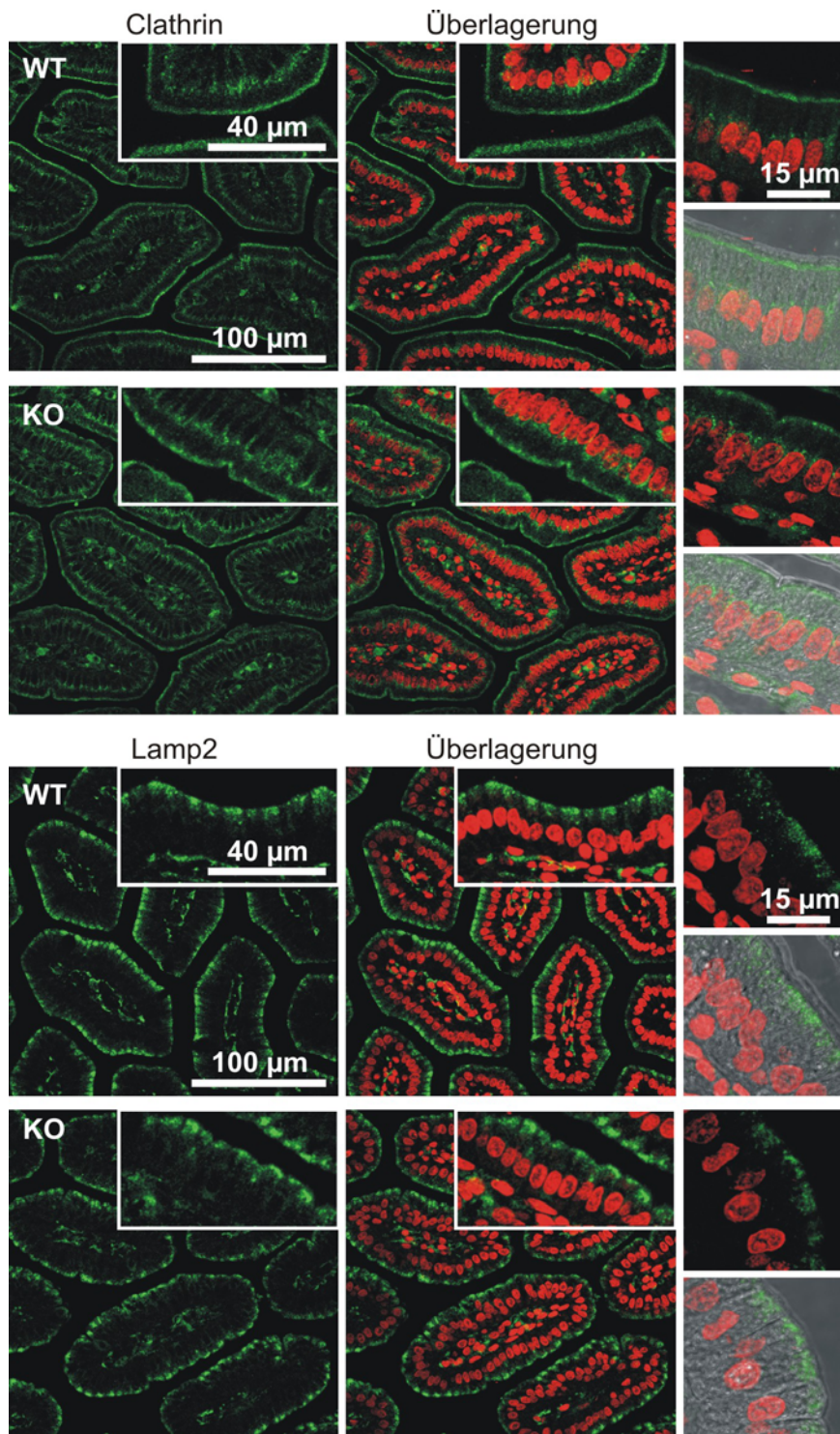


**Abbildung III-26: Die Lokalisation von Enzymen im Bürstensaum ist teilweise beeinträchtigt.** Dargestellt sind immunhistologische Färbungen von Paraffinschnitten des Dünndarms (Jejunum) aus Wildtyp- (WT) und I-Plastin defizienten Mäusen (KO). Die konventionellen Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen zeigen, dass die Defizienz von I-Plastin keine Auswirkungen auf die Lokalisation der Disaccharidasen Laktase-Phlorhizin Hydrolase und Sucrase-Isomaltase hat. Dagegen fehlen in I-Plastin defizienten Mäusen (KO) die typischen apikalen Färbungen der Neutralen Aminopeptidase und der Dipeptidylpeptidase IV, wie sie im Wildtyp (WT) zu sehen sind. Die histochemische Färbung der Alkalischen Phosphatase zeigt in I-Plastin defizienten Tieren, in der vergrößerten Betrachtung (Ausschnitt), eine diffusere Färbung im Vergleich zu Wildtypmäusen. Die basolaterale Lokalisation der Natrium/Kalium-ATPase (Na/K-ATPase) ist durch den Verlust von I-Plastin nicht beeinträchtigt. Die Ausschnitte in den Abbildungen zeigen vergrößerte Aufnahmen der Darmepithelzellen. Diese Untersuchungen wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. S. Robine am Institut Curie, Paris durchgeführt und die Abbildung zur Verfügung gestellt.

### 3.7 Lokalisation an der Endozytose beteiligter Proteine

Bestandteile der verdauten Nahrung werden über die Endozytose in die Darmepithelzellen aufgenommen. Endozytose findet im intermikrovillaren Bereich statt. Die Bildung clathrinumhüllter Vesikel ist die komplexeste Form der Vesikelabschnürung und zudem an den meisten Transportvorgängen der Zelle beteiligt. Die Transportwege verlaufen von der Plasmamembran zum frühen Endosom und von dort zurück an die Plasmamembran oder zu den Lysosomen. In den Lysosomen befinden sich saure Hydrolasen, die für eine intrazelluläre Verdauung sorgen. Clathrinumhüllte Transportvesikel befinden sich zudem auch auf den Wegen vom Trans-Golgi-Netzwerk zum frühen Endosom oder ebenfalls zu den Lysosomen. Für die Rolle des Aktinzytoskeletts während der Endozytose gibt es verschiedene Modelle (Qualmann et al., 2000; Lanzetti, 2007), in denen Aktin eine passive oder aktive Rolle zuteil wird. Es ist bisher nicht bekannt, ob und welche Rolle die Aktinwurzel für die Endozytose oder den Transport von Vesikeln spielt.

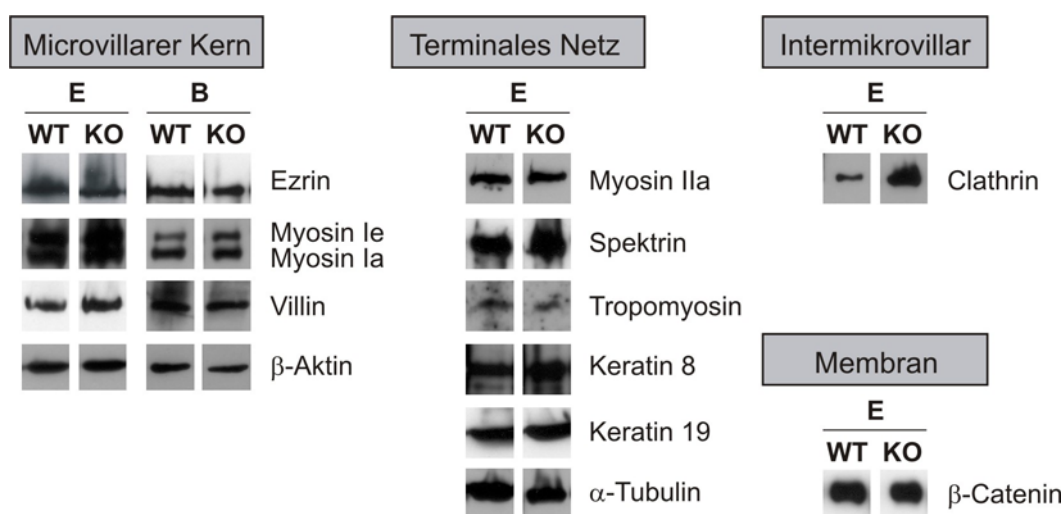
Mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen wurde überprüft, ob die fehlende Aktinwurzel, die Defekte im terminalen Netz oder die Fehllokalisation von einigen Enzymen in I-Plastin defizienten Mäusen Auswirkungen auf die clathrinvermittelte Endozytose hat. Dazu wurden Paraffinschnitte mit einem Clathrin spezifischen Antikörper inkubiert. Sowohl im Wildtyp als auch in I-Plastin defizienten Mäusen zeigte Clathrin eine Färbung im apikalen Bereich und oberhalb der Zellkerne (Abbildung III-27). Die Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen mit Durchlichtaufnahmen verdeutlicht die Färbung unterhalb der Mikrovilli im intermikrovillaren Bereich. Bei der Färbung oberhalb der Kerne handelt es sich vermutlich um den Golgi-Apparat. Ein Unterschied in der Färbung zwischen Wildtyp und *knockout* wurde nicht festgestellt. Zusätzlich wurde die Lokalisation von lysosomassoziierten Membranproteinen (Lamp1 und Lamp2) untersucht (Abbildung III-27). Es wurde auch hier keine veränderte apikale Lokalisation festgestellt.



**Abbildung III-27: Immunfluoreszenzanalyse von Endozytose- und lysosomalen Markern.** Paraffinschnitte des Dünndarms wurden mit Antikörpern gegen Clathrin und lysosomassoziertes Membranprotein (Lamp2) inkubiert. Die Signale wurden mit einem Alexa488- (grün) gekoppelten Sekundärantikörper an einem konfokalen Lasermikroskop sichtbar gemacht. Die Zellkerne wurden mit Propidiumjodid (rot) angefärbt. Die Fluoreszenzaufnahmen sind zusätzlich mit Durchlichtaufnahmen überlagert worden. Ausschnitte in den Abbildungen zeigen vergrößerte Aufnahmen. Clathrin zeigt sowohl im Wildtyp (WT) als auch in I-Plastin defizienten Mäusen (KO) die typische apikale und paranukleare Lokalisation. Die Lokalisation von Lamp2 ist ebenfalls nicht durch den Verlust von I-Plastin beeinträchtigt.

### 3.8 Analyse der Expression von Proteinen des Bürstensaums

Aufgrund der Resultate aus den Immunfluoreszenzanalysen wurde ein *Western Blot Screening* mit Antikörpern, die gegen Proteine der apikalen Region gerichtet sind, durchgeführt. Für die SDS-PAGE Analysen wurden isolierte Epithelzellen bzw. Bürstensäume verwendet. Die *Western Blot* Analysen zeigten, dass die meisten Proteine in normalen Mengen in I-Plastin- defizienten Mäusen exprimiert werden (Abbildung III-28). Die mikrovillaren Marker Ezrin, Myosin I und Villin zeigen keine veränderte Expression. Auch für Aktin konnte keine Reduzierung festgestellt werden, da es zum größten Teil in den Mikrovilli und nicht im terminalen Netz lokalisiert. Obwohl Myosin IIa, Spektrin und Tropomyosin deutliche Lokalisationsveränderungen in den Immunfluoreszenzanalysen aufweisen, ist die Expression im *knockout* gegenüber dem Wildtyp nicht reduziert, was auf eine Umverteilung schließen lässt.  $\beta$ -Catenin als Zell-Zellkontaktmarker wies ebenfalls keine Unterschiede auf. Quantifizierungen der Expressionslevel von Clathrin ergaben, dass Clathrin in I-Plastin defizienten Mäusen zweifach höher exprimiert wird als in Wildtypmäusen.



**Abbildung III-28: Expressionsanalyse einiger Markerproteine.** Epithelzellen (E) oder Bürstensäume (B) wurden aus Wildtyp- (WT) und I-Plastin defizienten Mäusen (KO) isoliert. Die Lysate wurden nach einer SDS-PAGE im *Western Blot* mit Antikörpern gegen zahlreiche Proteine, die vorwiegend im apikalen Bereich der Darmepithelzellen lokalisieren, analysiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit sekundären, an Peroxidase gekoppelten, Antikörpern und anschließender Chemilumineszenz. Dargestellt sind repräsentative *Blots*, die die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten zeigen.  $\alpha$ -Tubulin wurde in den Epithelzellextrakten als Ladekontrolle verwendet. Die Expression von Clathrin ist zweifach erhöht in I-Plastin defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. Die anderen Proteine zeigen keine Unterschiede in der Expression. Für Quantifizierungen wurde ein Hintergrundaussgleich vorgenommen und die Werte mit den korrespondierenden Wert von Villin normalisiert.

Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse der Lokalisationsstudien, die mit Hilfe der Immunfluoreszenz festgestellt worden sind, kurz zusammen.

**Tabelle III-2: Zusammenfassung der Lokalisationsstudien.**

<b>Protein</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Protein</b>	<b>Lokalisation</b>
<b>Plastinfamilie:</b>		<b>Zell-Zellkontakte:</b>	
L-Plastin	-	E-Cadherin	-
T-Plastin	-	Catenine	-
		ZO1	-
<b>Mikrovillare Marker:</b>		<b>Apikale Enzyme:</b>	
F-Aktin	-	Laktase-Phlorhizin- Hydrolase	-
Villin	-	Sucrase-Isomaltase	(+)
Epsin	-	Neutrale Aminopeptidase	+
Ezrin	-	Dipeptidylpeptidase IV	+
Myosin Ia	-	Alkalische Phosphatase	-
Myosin Ie	-		
<b>Marker des termi- nalen Netzes:</b>		<b>Endozytosemarker:</b>	
Myosin IIa	+	Clathrin	-
$\alpha$ -II-Spektrin	+	Lamp2	-
Tropomyosin	+		
$\beta$ -Aktin	+		
Keratine	(+)		
Plektine	-		
MACF1	-		

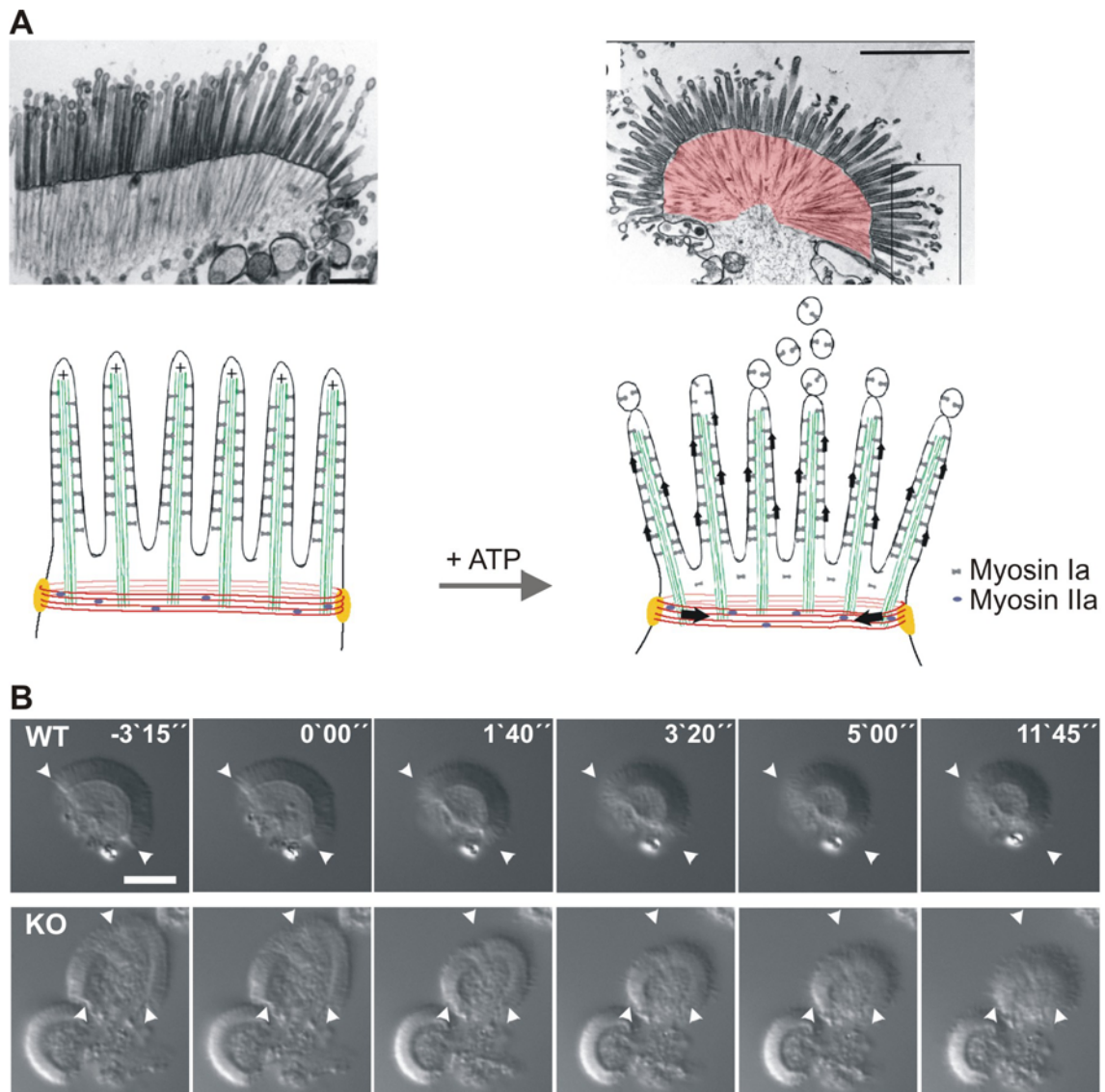
[ - unveränderte; (+) leicht veränderte; + veränderte Lokalisation in Darmepithelzellen]

## 4 Funktionelle Analysen

### 4.1 Kontraktion des Bürstensaums

In zahlreichen *in vitro* Studien wurde bereits Anfang der 80er Jahre gezeigt, dass neben dem gesamten Darm auch der Bürstensaum kontrahiert (Abbildung III-29 A). Im Bürstensaum befinden sich alle dafür notwendigen Komponenten wie Aktin, Myosin, Tropomyosin ((Bretscher und Weber, 1978; Mooseker et al., 1978; Drenckhahn und Groschel-Stewart, 1980; Howe et al., 1980; Herman und Pollard, 1981) und die aktinbündelnden und quervernetzenden Proteine. Die durch Myosin IIa vermittelte Kontraktion des Bürstensaums findet *in vitro* im Bereich des terminalen Netzes auf Höhe der Adhäsionsverbindungen in Gegenwart von ATP statt (Rodewald et al., 1976; Burgess, 1982; Keller und Mooseker, 1982). Neueste Studien zeigen, dass auch Myosin Ia mechanische Aktivität im Bürstensaum aufweist (McConnell und Tyska, 2007) (Abbildung III-29 A). Myosin Ia bewegt sich *in vitro* entlang der mikrovillaren Aktinbündel.

Der Verlust der Aktinwurzel und die Delokalisation von Proteinen im terminalen Netz in I-Plastin defizienten Mäusen warf die Frage auf, ob die Kontraktion des Bürstensaums dadurch beeinträchtigt ist. Der Bürstensaum wurde nach Mooseker bzw. McConnell (Mooseker und Tilney, 1975) (McConnell und Tyska, 2007) isoliert, so dass sowohl für Wildtyp als auch für den *knockout* gut erhaltene Bürstensäume als Ausgangsmaterial verwendet werden konnten (vgl. Abschnitt 3.1.3). Adhärente Bürstensäume wurden in einer Durchströmungskammer mittels Interferenzkontrastmikroskopie betrachtet. Nach drei Minuten wurde eine ATP-haltige Lösung in die Durchströmungskammer injiziert und die Beobachtung fortgesetzt (Abbildung III-29 B). Die durch Myosin IIa vermittelte Kontraktion fand sowohl im Wildtyp als auch in I-Plastin defizienten Bürstensäumen statt. Des Weiteren wurde kein Unterschied in der Geschwindigkeit der Kontraktion festgestellt. Eine spezifische Inhibition von Myosin II durch Blebbistatin führte in beiden Genotypen zu einem Ausbleiben der Kontraktion (Daten nicht gezeigt). Dies bestätigt, dass das Myosin IIa an den Adhäsionsverbindungen für die Kontraktion ausreicht und das Myosin IIa unterhalb der Mikrovilli eine andere Funktion besitzt (Keller et al., 1985). Die Aktinwurzel ist demnach auch nicht essenziell für die Kontraktion. Auch die motorische Aktivität von Myosin Ia ist durch die Defekte im Bürstensaum von I-Plastin defizienten Mäusen nicht beeinträchtigt.

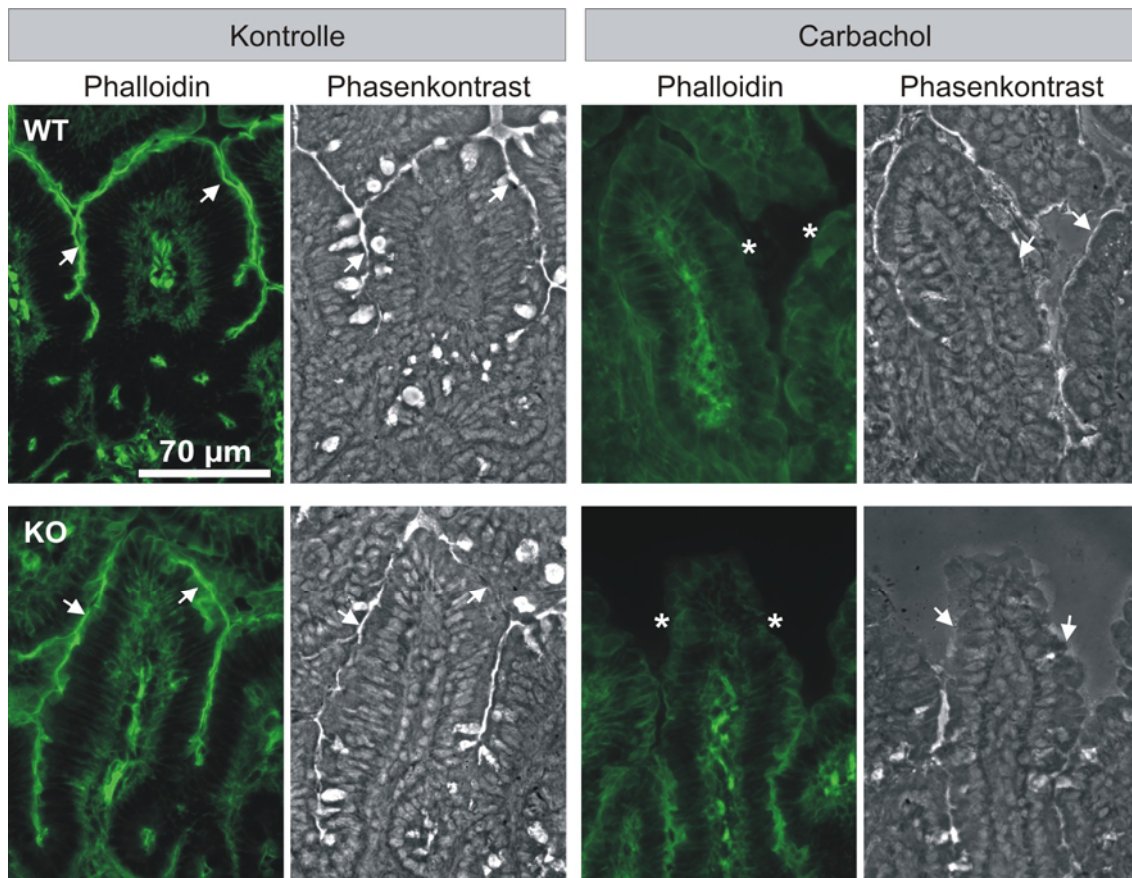


**Abbildung III-29: *In vitro* Kontraktion des Bürstensaums. A:** Modell der Bürstensaumkontraktion. Das Modell ist modifiziert nach McConnell und die TEM-Aufnahmen sind ebenfalls entnommen aus McConnell (McConnell und Tyska, 2007). In Gegenwart von ATP werden die Bürstensäume an den Adhäsionsverbindungen kontrahiert und das terminale Netz wird dichter gepackt. Durch die motorische Aktivität von Myosin Ia soll es gleichzeitig zu Membranabschnürungen kommen. **B:** Bürstensaumkontraktion. Bilder von Videoaufnahmen vor und nach Zugabe von ATP zu isoliertem Bürstensaum aus Wildtyp- (WT) und I-Plastin defizienten Mäusen (KO). Die adhärenen Bürstensäume wurden drei Minuten gefilmt. Beim Zeitpunkt 0 wurden sie mit einer ATP-haltigen Lösung inkubiert und weiter beobachtet. Sowohl beim Wildtyp als auch beim *knockout* sind die Auswirkungen der motorischen Aktivitäten von Myosin IIa und Myosin Ia deutlich erkennbar. Die Pfeilköpfe deuten auf die kontrahierenden Enden. Maßstab in den Videoaufnahmen: 5  $\mu$ m.



## 4.2 Untersuchungen möglicher Auswirkungen der I-Plastin-Defizienz auf eine erhöhte Kalziumkonzentration

Diverse physiologische und pathologische Bedingungen ändern die intrazelluläre Kalziumkonzentration und lösen Veränderungen der Zytoskelettstruktur aus. Zu diesen Bedingungen zählen z.B. hormonelle Stimulierungen, *fasting/refeeding* und Infektionen. I-Plastin bündelt bei hohen Kalziumkonzentrationen die Aktinfilamente nicht mehr (Lin et al., 1994). Des Weiteren werden die Aktinfilamente durch Villin fragmentiert, was zu einer Zerstörung des Aktinnetzwerkes in Darmepithelzellen führt (Burgess und Prum, 1982; Ferrary et al., 1999). Die Zellen können sich so z.B. vor dem Eintritt von Agenzien oder Enteropathogenen schützen. Um einen möglichen Effekt der I-Plastin-Defizienz auf diese Prozesse zu untersuchen wurden *in vivo* Versuche durchgeführt. Ein Ansatz war dabei ein pharmakologisches Experiment, das an isolierten Darmschleifen von anästhesierten Mäusen *in situ* durchgeführt wurde. Die Mäuse wurden betäubt und eine Darmschleife, ohne Gefäße zu verletzen, vorsichtig in Carbachol oder PBS (Kontrolle) inkubiert. Die Darmschleife wurde anschließend histologisch untersucht. Carbachol ist ein cholinergischer Agonist, der die Erhöhung der Calciumkonzentration induziert, indem die Natriumchlorid Resorption und der Natrium/Protonen-Austauscher inhibiert wird (Cohen et al., 1991). Die Gefrierschnitte der Darmschleifen wurden mit FITC-Phalloidin gefärbt, um die Aktinfilamente sichtbar zu machen. In Schnitten von mit PBS inkubierten Darmschleifen wurde sowohl im Wildtyp als auch in I-Plastin defizienten Mäusen die erwartete apikale Aktinfärbung beobachtet (Abbildung III-30). Weder im Wildtyp noch im *knockout* konnten apikale Aktinfilamente in Schnitten von Darmschleifen, die mit Carbachol inkubiert wurden, durch FITC-Phalloidin detektiert werden.



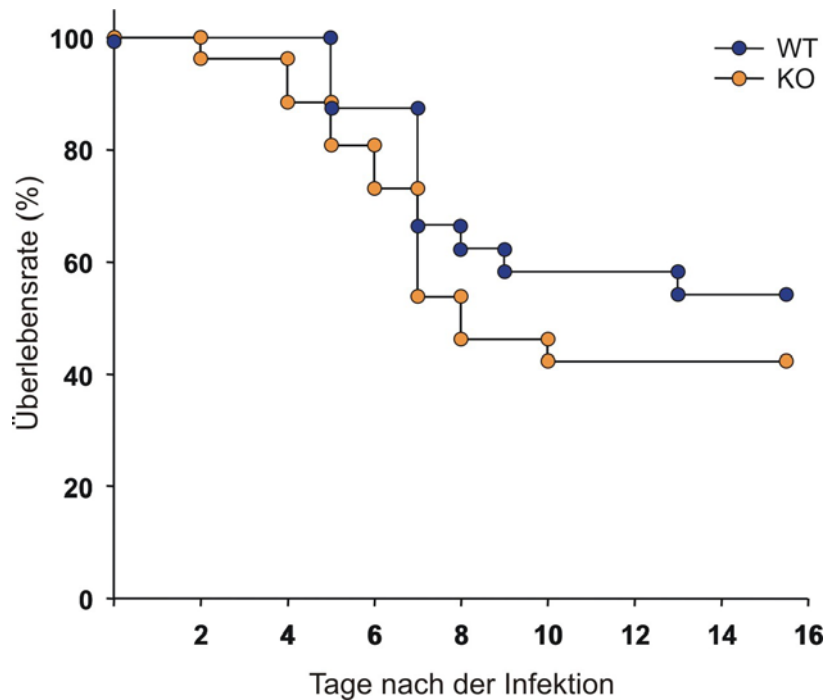
**Abbildung III-30: Carbacholinduzierte Fragmentierung der Aktinfilamente.** Darmschleifen von anästhesierten Wildtyp- (WT) und I-Plastin defizienten Mäusen (KO) wurden *in situ* mit Carbachol oder mit PBS (Kontrolle) für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Mäuse getötet, die Darmschleifen entnommen, Gefrierschnitte angefertigt und mit Phalloidin gefärbt. Abgebildet sind die mittels konventioneller Fluoreszenzmikroskopie aufgenommenen Fluoreszenzen von FITC-Phalloidin und die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen. Es ist jeweils ein Längsschnitt eines Villus dargestellt. Die Pfeile/Sterne zeigen auf die apikale Seite der Darmepithelzellen, wo sich die Mikrovilli befinden. In beiden Kontrollen sind die Aktinfilamente der intestinalen Epithelzellen deutlich erkennbar. Die Aktinfilamente der in carbachol-behandelten Darmschleifen sind sowohl im Wildtyp als auch in I-Plastin defizienten Mäusen durch Villin fragmentiert worden, was die fehlende apikale Färbung zeigt (Sterne).

Zusätzlich zu der basolateralen Inkubation mit Carbachol wurde ein *fasting/refeeding* Experiment durchgeführt, das vergleichbare Resultate ergab. Dazu wurden die Tiere 24 Stunden ohne Futter gehalten, gefolgt von einer einstündigen Fütterung, welche die intrazelluläre Kalziumkonzentration ansteigen lässt. Zur Kontrolle wurden Wildtyp- und I-Plastin defiziente Mäuse 24 Stunden ohne eine darauf folgende Fütterung gehungert. Anschließend wurden alle Mäuse getötet und Paraffinschnitte von Darmproben angefertigt. Die apikale Aktinfärbung fehlt sowohl im Wildtyp als auch in *knockout*-Mäusen, die nach dem Hungern für eine Stunde gefüttert wurden (Anhang Abbildung A-4). Die Aktinfärbung ist in für 24 Stunden ohne Futter gehaltenen Mäusen dagegen nicht beeinträchtigt (vgl. Anhang mit Abbildung III-19). Villin und I-Plastin (nur im Wildtyp) waren sowohl in nicht gefütterten wie auch in für eine Stunde gefütterten

Mäusen in ihrer Lokalisation nicht beeinträchtigt (vgl. mit Abbildung III-4 und III-15). Dies zeigt, dass die Mikrovilli noch intakt sind. Beide Experimente belegen, dass die Fragmentierung der Aktinfilamente durch Villin auch bei I-Plastin-Defizienz stattfindet. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die Fragmentierung in den Mikrovilli von I-Plastin defizienten Mäusen früher als in Wildtypmäusen stattfindet.

### 4.3 Die Rolle von I-Plastin bei der Umstrukturierung des Zytoskeletts bei bakteriellen Infektionen

Es ist eine verbreitete Eigenschaft vieler pathogener Mikroorganismen, wirtseigene Proteine, die das Aktinzytoskelett regulieren, zu nutzen. So ist es ihnen möglich, die Verteidigungsbarrieren der Organismen zu überwinden. Intrazellulär bewegliche Bakterien wie Shigellen und Listerien benötigen zur Fortbewegung Strukturen, die der Komposition der Mikrovilli mit I-Plastin und Villin ähneln. Sie rekrutieren Aktin für ihre intrazelluläre Fortbewegung und Ausbreitung von Zelle zu Zelle (Donnenberg, 2000). Ein Modell mit HeLa Zellen zeigt, dass T-Plastin zu shigelleninduzierten zellulären Ausstülpungen rekrutiert wird und dort Aktin bündelt (Adam et al., 1995). Des Weiteren korreliert die Ausbreitung der Shigellen innerhalb der Zelle mit der Bündelung der Aktinfilamente durch Plastin (Prevost et al., 1992). *In vivo* ist die Expression von Villin für die Infektion durch Shigellen essenziell, wie Studien an Villin defizienten Mäusen zeigen (Athman et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Infektionsmodelle in Zusammenarbeit mit PD Dr. Olaf Utermöhlen am Institut für Mikrobiologie der Medizinischen Fakultät (Universität Köln) untersucht. Auf diese Art sollte überprüft werden, ob I-Plastin eine wichtige Rolle in der Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts bei bakteriellen Infektionen spielt. Zunächst wurden adulte Wildtyp- und I-Plastin defiziente Mäuse für 24 Stunden ohne Futter gehalten und dann mit einer hohen Dosis von  $5 \times 10^9$  *Listeria monocytogenes* *intra gastral* (i.g.) infiziert (Yamamoto et al., 1993; Utermöhlen et al., 2003). Listerien sind grampositive Bakterien, die meist über verunreinigte Nahrung aufgenommen werden. Sie passieren die Darmepithelzellen sowie die M-Zellen und gelangen dann über die Blutbahn zu ihren primären Zielorganen, der Leber und der Milz (Kreft et al., 2002). Die I-Plastin defizienten Mäuse zeigten deutlich früher schwere klinische Symptome, starben aber nicht signifikant früher als infizierte Wildtypmäuse (Abbildung III-31). Bei mehreren Mäusen wurde der Lebertiter zwei Tage nach der Infektion mit *L. monocytogenes* bestimmt.

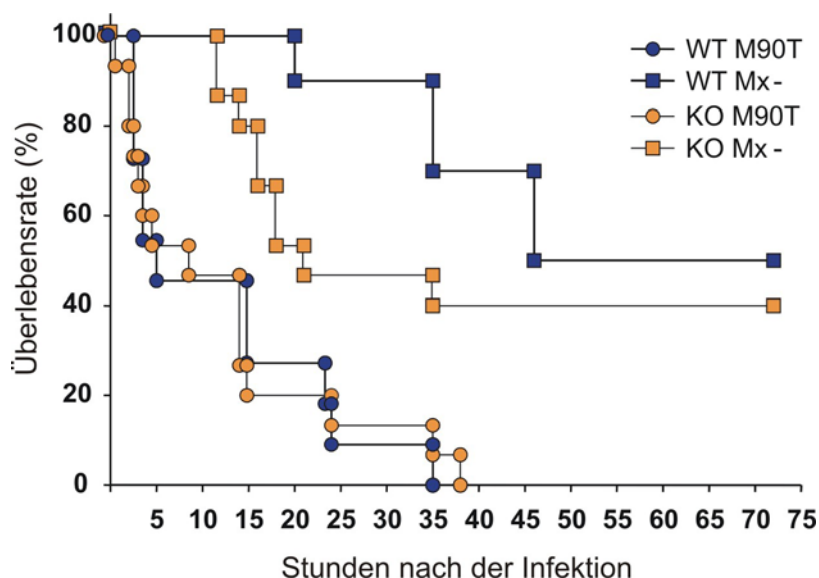


**Abbildung III-31: Infektion von Mäusen mit *Listeria monocytogenes*.** Adulte Mäuse wurden nach 24 h Hungern mit  $5 \times 10^9$  Listerien *intra gastral* (*i.g.*) infiziert, die Überlebensrate dokumentiert und in Form eines Kaplan-Meier-Graphens dargestellt. Obwohl I-Plastin defiziente Mäuse bereits sehr früh schwere klinische Symptome aufwiesen, starben sie nur geringfügig früher als infizierte Wildtypmäuse. Die Anzahl der untersuchten Mäuse betrug beim Wildtyp (WT)  $n = 24$  und beim knockout (KO)  $n = 26$ .

Mit einem Wert von  $3,0 \times 10^4$  CFU/g (*colony forming units*, vermehrungsfähige Bakterien) für den Wildtyp und  $5,9 \times 10^4$  für den *knockout* wurde kein nennenswerter Unterschied festgestellt.

In einem zweiten Versuchsmodell wurden drei Tage alte Mäuse *i.g.* mit den gramnegativen *Shigella flexneri* Bakterien infiziert, da dies effizienter ist als die Infektion von adulten Mäusen mit Shigellen (Fernandez et al., 2003; Athman et al., 2005). Die Neugeborenen wurden vor der Infektion zwei Stunden von der Mutter getrennt und jeder Genotyp in zwei Gruppen aufgeteilt. Für die Infektion wurden zwei unterschiedliche *S. flexneri* Stämme verwendet. Bei M90T handelt es sich um eine invasive Form, während Mx- (BS176) ein nicht invasives Derivat darstellt. Bei der Infektion mit dem invasiven Shigellenstamm wurden sowohl Wildtyp- als auch I-Plastin defiziente Mäuse gleichermaßen infiziert. Fünf Stunden nach der Infektion betrug die Überlebensrate bei beiden Genotypen 50 % (Abbildung III-32). Dies zeigt, wie auch die Infektion mit Listerien, das I-Plastin nicht essenziell für das Eindringen dieser Bakterien in die Darmepithelzellen ist.

Durch Inokulation mit dem nicht invasiven Shigellenstamm Mx- starben I-Plastin defiziente Neugeborene später als beim invasiven Stamm an einer Infektion allerdings unterscheidet sich die Sterbekurve nicht signifikant von Wildtyp Neugeborenen (*log rank*:  $P = 0,268$ ).

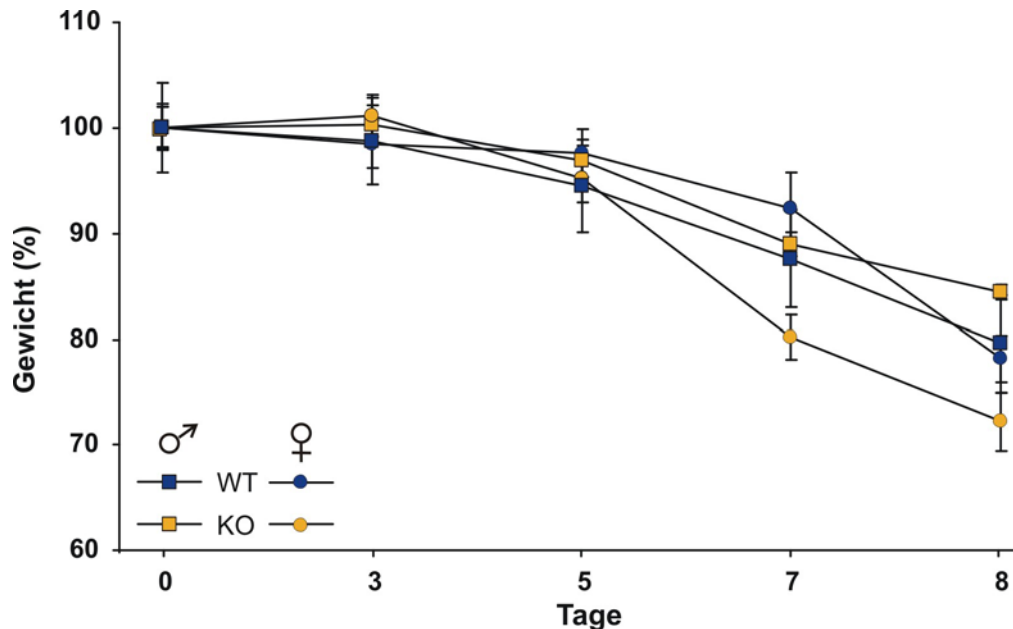


**Abbildung III-32: Infektion von neugeborenen Mäusen mit *Shigella flexneri*.** Drei Tage alte Wildtyp- (WT) und I-Plastin defiziente Mäuse (KO) wurden entweder mit dem invasiven Stamm von *S. flexneri* M90T oder dem nicht invasiven Mx- *intra gastral* (*i.g.*) inokuliert. Die Überlebensrate ist in Form einer Kaplan-Meier-Darstellung abgebildet. Die *knockout*- wie die Wildtypneugeborenen wurden infiziert und nach fünf Stunden betrug die Überlebensrate 50 %. Inokulation des nicht invasiven Stamms führte später als beim invasiven Stamm zum Tod. I-Plastin defiziente Mäuse starben nicht signifikant früher als Wildtypmäuse beim nicht invasiven Stamm (*log rank*:  $P = 0,268$ ). Die Inokulation mit dem invasiven Shigellenstamm M90T wurde an 11 Wildtyp- und 15 *knockout*-Neugeborenen durchgeführt. Für den nicht invasiven Stamm betrug  $n = 10$  für den Wildtyp und  $n = 15$  für den *knockout*.

#### 4.4 Analyse der Stabilität von Darmepithelzellen *in vivo*

Die Feststellung, dass der isolierte Bürstensaum von I-Plastin defizienten Mäusen fragiler ist (vgl. 3.1.3), führte zu weiteren Analysen der Stabilität der intestinalen Epithelzellen. Dextran Natrium Sulfat (DSS) ist ein aggressives Agens, das Läsionen im kolorektalen Epithelium ähnlich einer Kolitis induziert (Mashimo et al., 1996). Die Empfindlichkeit der Mäuse auf diese Verletzung wurde untersucht, indem den Mäusen DSS im Trinkwasser an dreizehn aufeinander folgenden Tagen verabreicht wurde. Das Körpergewicht wurde in den ersten acht Tagen alle zwei Tage ermittelt und die Überlebensrate über den gesamten Zeitraum dokumentiert (Abbildung III-33 und III-34). Weibliche und männliche I-Plastin defiziente Mäuse zeigten bereits am fünften Tag erste Anzeichen einer Kolitis, wie einen blutigen After.

Bei Wildtypmäusen traten die ersten Symptome erst am siebten Tag auf. Der prozentuale Gewichtsverlust von weiblichen und männlichen Wildtypmäusen war mit 21,8 % bzw. 20,4 % in etwa gleich (Abbildung III-33).

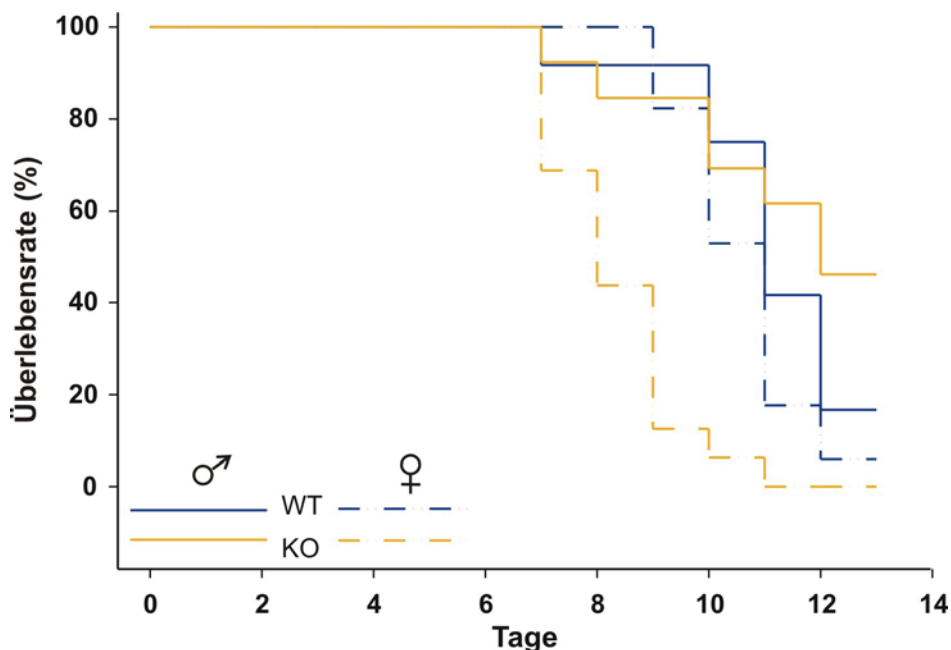


**Abbildung III-33: Körpergewichtsanalyse während der Behandlung mit Dextran Natrium Sulfat (2,5 % DSS).** Es wurde jeweils der Mittelwert des Tagesgewichts (in % bezogen auf das Anfangsgewicht) von Wildtyp- (WT) und I-Plastin defizienten (KO) Mäusen beider Geschlechter berechnet und mit dem Standardfehler dargestellt. Für den Wildtyp wurden 12 männliche und 17 weibliche Mäuse und für den I-Plastin defizienten Stamm 13 männliche und 16 weibliche Mäuse gewogen. Innerhalb der ersten fünf Tage ist der prozentuale Gewichtsverlust bei allen Gruppen ähnlich. Wildtypmäuse verlieren in den ersten acht Tagen geschlechtsunabhängig etwa 21 % an Gewicht, während weibliche *knockout*-Mäuse 27,7 % und männliche nur 15,6 % an Gewicht verlieren.

Weibliche *knockout*-Mäuse verloren in den ersten acht Tagen im Mittel 27,7 % an Gewicht, während männliche I-Plastin defiziente Mäuse im gleichen Zeitraum im Schnitt nur 15,6 % abnahmen. In den ersten fünf Tagen war die Gewichtsabnahme in Wildtyp- und *knockout*-Mäusen vergleichbar, wie der Kurvenverlauf zeigt.

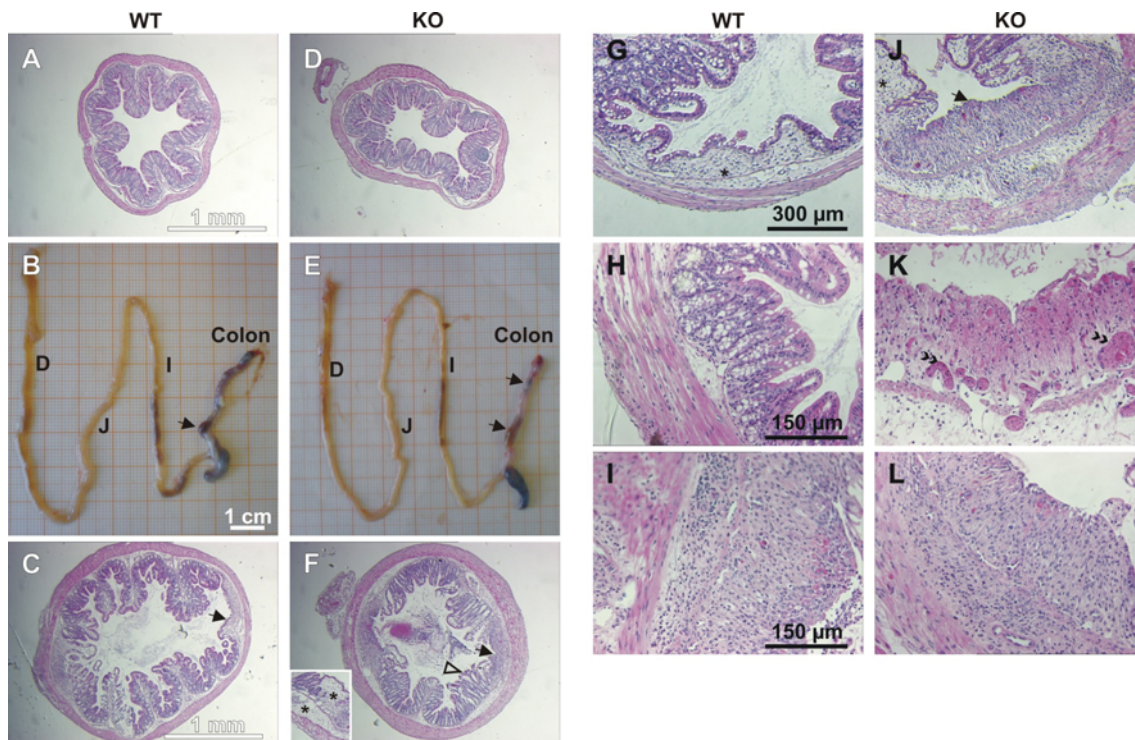
Weibliche I-Plastin defiziente Mäuse reagierten mit einer 0 % Überlebensrate nach 13 Tagen signifikant sensitiver gegen die induzierte Kolitis als Wildtypmäuse gleichen Geschlechts (6 % Überlebensrate; *log rank*:  $P < 0,0001$ ; Abbildung III-34). Bei männlichen *knockout*-Tieren konnte kein signifikanter Unterschied in der Überlebensrate zum Wildtyp festgestellt werden. Männliche I-Plastin defiziente Mäuse wiesen aber wie die *knockout*-Weibchen zwei Tage früher als der Wildtyp erste Symptome einer Kolitis auf.

Zusätzlich konnten in histologischen Untersuchungen deutlichere Läsionen, Ödeme und Blutungen als beim Wildtyp beobachtet werden (Abbildung III-35). Männliche I-Plastin defiziente Mäuse sind demnach stärker betroffen als der Wildtyp, obwohl sie nicht signifikant früher sterben.



**Abbildung III-34: Überlebensrate bei DSS-induzierter Kolitis.** Die Überlebensrate bei einer DSS-Behandlung (2,5 % DSS im Trinkwasser) wurde als Kaplan-Meier-Graph gegen die Behandlungsdauer aufgetragen. Weibliche *knockout*-Mäuse starben früher als Wildtypmäuse gleichen Geschlechts (*log rank*:  $P < 0,0001$ ). 50 % der defizienten Weibchen sind bereits nach 8 Tagen verstorben, während dies bei Wildtypweibchen erst nach 11 Tagen der Fall war. Männliche Wildtypmäuse zeigen eine ähnliche Überlebensrate wie die Wildtypweibchen. Zwischen männlichen I-Plastin defizienten Mäusen und dem Wildtyp wurde kein signifikanter Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit festgestellt (*log rank*:  $P < 0,241$ ). Für den Wildtyp wurden 12 männliche und 17 weibliche Mäuse und für den I-Plastin defizienten Stamm 13 männliche und 16 weibliche Mäuse untersucht.

Eine Korrelation der Anzahl der Tage, die die Mäuse während einer Verabreichung von DSS im Trinkwasser überlebten mit dem Anfangsgewicht zeigt, dass die Überlebensdauer nicht vom Anfangsgewicht abhängt. Die Weibchen von Wildtyp- und I-Plastin defizienten Mäusen besaßen ein vergleichbares Anfangsgewicht, *knockout*-Weibchen starben aber früher. Die Anfangsgewichte der männlichen Mäuse beider Genotypen unterschieden sich dagegen stärker, so waren die *knockout*-Männchen ungefähr 15 % leichter als die Wildtypmännchen. Der Gewichtsunterschied zeigte aber keinen Einfluss auf die Überlebensrate.



**Abbildung III-35: Histologische Untersuchung von männlichen Mäusen nach DSS-Behandlung.** Dickdärme von männlichen Mäusen, welche nach 13 Tagen Behandlung mit DSS noch lebten, wurden mit HE gefärbt und mikroskopisch untersucht. In **A** und **D** sind Dickdarmschnitte von unbehandelten Wildtyp- (WT) bzw. I-Plastin defizienten (KO) Mäusen dargestellt. Aufnahmen vom Gesamtdarm DSS behandelter Mäuse (**B** und **E**) verdeutlichen, dass Läsionen (Pfeile) vorwiegend im Dickdarm (Colon) und nicht im Dünndarm (D: Duodenum; J: Jejunum; I: Ileum) durch DSS induziert werden. HE gefärbte Dickdarmschnitte vom WT (**C**, **G-I**) und KO (**F**, **J-L**) zeigen örtliche Läsionen (Pfeil) und Ödeme (Sterne) im WT. In **I** und **L** sind infiltrierte Entzündungszellen zu erkennen. Dickdärme von I-Plastin defizienten Mäusen weisen viele Ödeme (Sterne, z.B. in **J** und im Ausschnitt in **F**), massiven Verlust von Epithelzellen der Oberfläche und Krypten auf. Einige noch erkennbare Krypten sind in KO beschädigt (**F**, offener Pfeilkopf). Häufig können in I-Plastin defizienten Dickdärme Bluteinlagerungen beobachtet werden (**K**, Doppelpfeile).

Das Darmepithel stellt eine Barriere zwischen *Lamina propria* und Darmlumen dar. Sie erlaubt die selektive Aufnahme von Makromolekülen durch die Epithelzelle selbst (transzellulär) oder zwischen den Epithelzellen (parazellulär). Um die Barrierefunktion des Darmepithels zu untersuchen, wurden erste Versuche mittels Messung des transepithelialen Widerstandes (TER) an Darmgewebe durchgeführt. In I-Plastin defizienten Mäusen war der Widerstand im Dünndarm um 26 % im Vergleich zum Wildtyp reduziert (WT: 4,48  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ; KO: 3,29  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ). Im Dickdarm von *knockout*-Mäusen wurde eine Reduzierung des transepithelialen Widerstandes um 47,5 % festgestellt (WT: 16,6  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ; KO: 9,24  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ). Die I-Plastin-Defizienz hat somit möglicherweise zur Folge, dass die Barrierefunktion des Epithels reduziert ist.

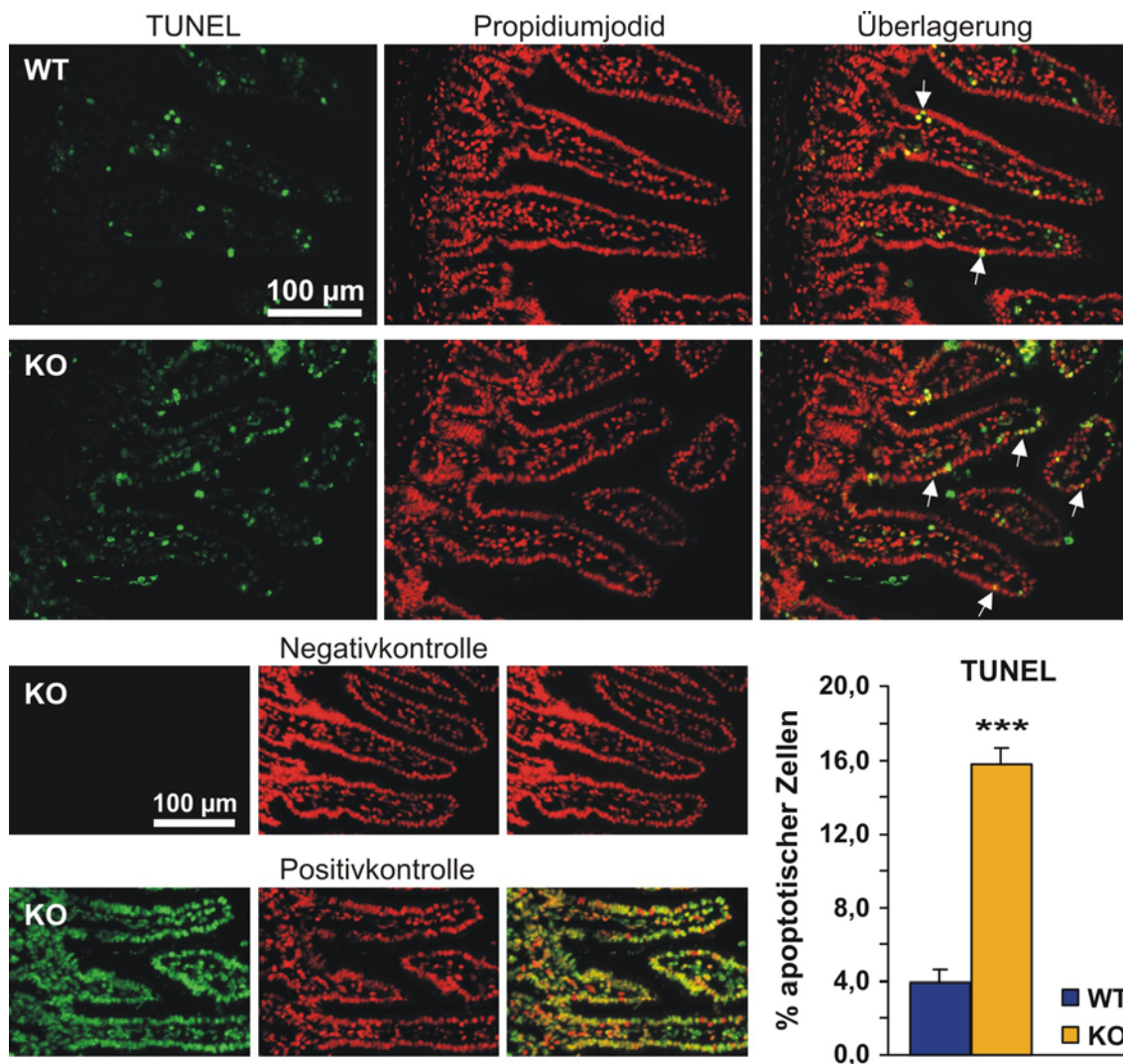


## 5 Analyse der Apoptose, Proliferation und Differenzierung

Einige beschriebene Phänotypen I-Plastin defizienter Mäuse (wie apoptotische Zellen in Rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung III-9), der fragile Bürstensaum (Abbildung III-13) und die Auswirkungen von epithelialen Verletzungen (Abbildung III-34 und III-35)) deuten auf gestresstes Gewebe hin. Der dennoch milde Phänotyp führte zu der Frage, ob durch eine erhöhte Apoptose- und Proliferationsrate die Auswirkungen der I-Plastin-Defizienz kompensiert bzw. abgemildert werden.

### 5.1 Erhöhte apoptotische Aktivität im Darmepithel

Die Zellbewegung, der in den Krypten produzierten Zellen erfolgt in Richtung Villusspitze, die innerhalb von zwei bis fünf Tagen erreicht wird. Spätestens zu diesem Zeitpunkt gehen sie in die Anfangsstadien der Apoptose über und werden schließlich in das Darmlumen abgestoßen (Reya und Clevers, 2005) (Abbildung I-2). Die Zellenerneuerung ist mit der Apoptose ausbalanciert. Zunächst wurde untersucht, ob der Verlust von I-Plastin zu einer erhöhten Apoptoserate im Darmepithel führt. Dazu wurden apoptotische Zellen mit dem TUNEL-Assay in Paraffinschnitten detektiert. Im Darmepithel durchlaufen Zellen regelmäßig den programmierten Zelltod. Abbildung III-36 zeigt repräsentative Darmschnitte von Wildtyp- und I-Plastin defizienten Mäusen. Für die statistische Auswertung wurden die Kerne der Epithelzellen und die apoptotischen Epithelzellen pro Villus gezählt und ins Verhältnis zueinander gesetzt. Während im Wildtyp nur vereinzelt apoptotische Epithelzellen auftraten, war in I-Plastin defizienten Mäusen die apoptotische Aktivität signifikant um das vierfache erhöht (t-Test:  $P < 0,0001$ ).

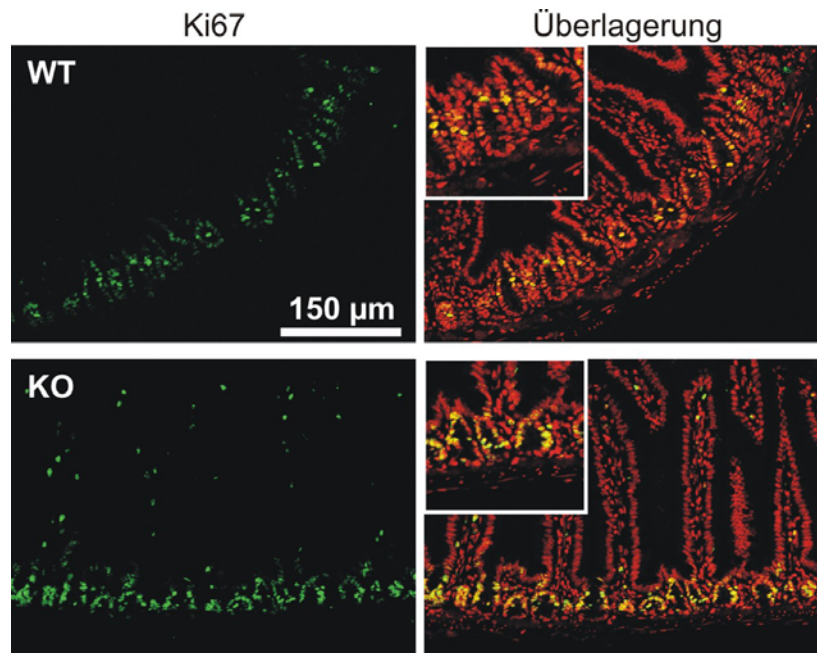


**Abbildung III-36: Im Darmepithel I-Plastin defizienter Mäuse treten vermehrt apoptotische Zellen auf.** Apoptotische Zellen wurden mit dem TUNEL-Assay detektiert. Im Kontrollgewebe (WT) sind vereinzelt apoptotische Zellen im Epithel zu finden (Pfeile). Bei Verlust von I-Plastin (KO) durchlaufen deutlich mehr Epithelzellen den programmierten Zelltod (Pfeile). Negativ- und Positivkontrolle sind beispielhaft für den *knockout* gezeigt. Für die statistische Auswertung wurden die Kerne der Epithelzellen und die TUNEL positiven Epithelzellen pro Villus gezählt und ins Verhältnis zueinander gesetzt (dargestellt mit Standardfehler). Die apoptotische Aktivität ist in I-Plastin defizienten Mäusen signifikant um das vierfache erhöht. (t-Test:  $***P < 0,0001$  )

## 5.2 Der Verlust von I-Plastin führt zu einer erhöhten Zellerneuerung

Zur Überprüfung, ob der erhöhte Zellverlust im Darmepithel von I-Plastin defizienten Mäusen durch eine erhöhte Proliferationsrate ausgeglichen wird, wurden weitere Analysen durchgeführt. Zunächst wurde die Proliferationszone in den Krypten in Immunfluoreszenzanalysen untersucht. Paraffinschnitte des Dünndarms von Wildtyp- und I-Plastin defizienten Mäusen wurden mit einem Antikörper gegen Ki67 inkubiert.

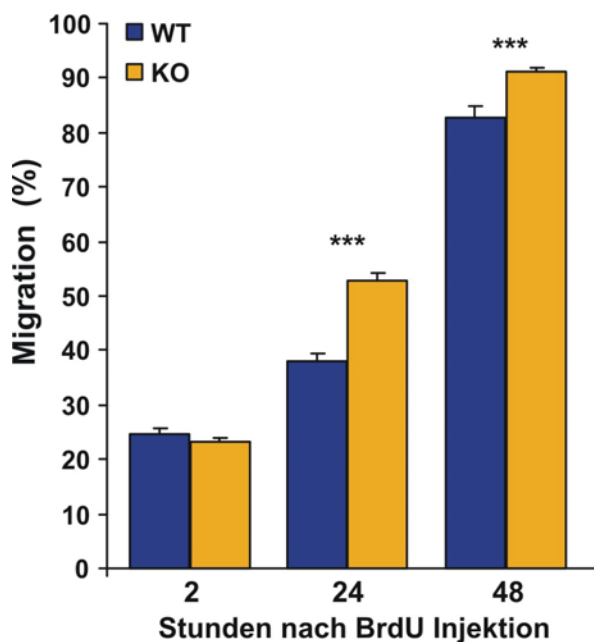
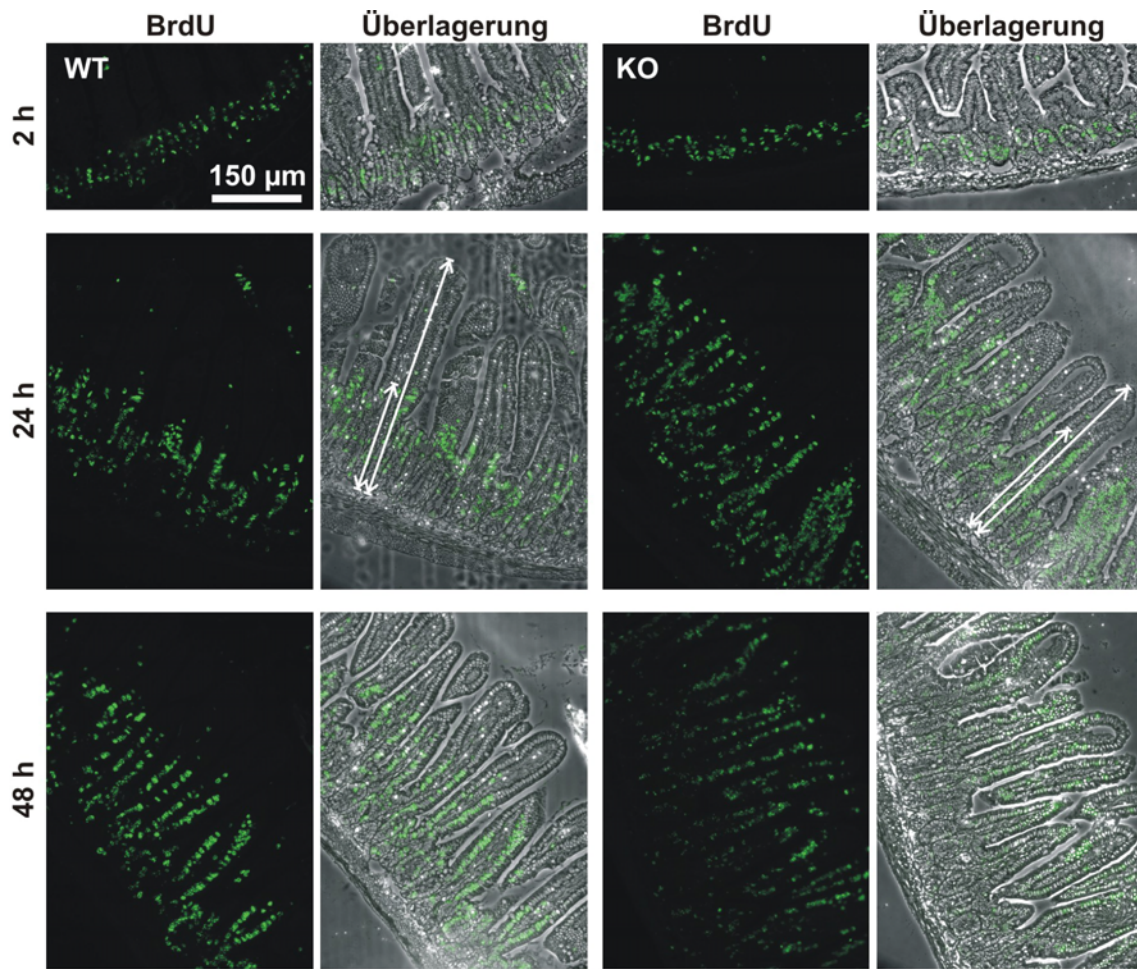
Ki67 ist ein nukleares Protein, das während der aktiven Zellzyklusphasen ( $G_1$ , S,  $G_2$  und M Phase) nicht aber in ruhenden ( $G_0$ ) Zellen exprimiert wird. Es lokalisiert daher in den Krypten. Wie die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen (Abbildung III-37) ist die proliferierende Zone in ihrer Position in I-Plastin defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert.



**Abbildung III-37: Die Proliferationszone ist in I-Plastin defizienten Mäusen nicht verändert.** Längsschnitte des Darms von Wildtyp- (WT) und *knockout*-Mäusen (KO) wurden mit einem Antikörper gegen Ki67 inkubiert. Die Fluoreszenz des Alexa488- (grün) gekoppelten Sekundäntikörpers wurde mit einem konfokalen Lasermikroskop aufgenommen. Die Zellkerne wurden mit Propidiumjodid (rot) angefärbt. Ki67 lokalisiert vorwiegend in den Krypten, wo Mitose stattfindet. In der *Lamina propria* können auch positive Zellen detektiert werden, bei denen es sich um Lymphozyten handelt. Die Ausschnitte zeigen Vergrößerungen der Kryptenregion.

Zur weiteren Analyse einer potenziell erhöhten Zellerneuerung in I-Plastin defizienten Mäusen wurde Bromodesoxyuridin (BrdU) als weiterer Zellproliferationsmarker appliziert. BrdU ist ein Analogon zu dem Nukleinsäurebaustein Thymidin und wird in der S-Phase in Kernen sich teilender Zellen eingebaut. Wildtyp- und I-Plastin defizienten Mäusen wurde BrdU *intra peritoneal* appliziert und die Mäuse wurden nach 2, 24 bzw. 48 Stunden durch Genickbruch getötet. Für die Analyse wurde der Darm entnommen und mittels Immunhistochemie oder Immunfluoreszenz untersucht. Mit Hilfe eines Antikörpers gegen BrdU konnten BrdU positive Zellen in Paraffinschnitten detektiert und quantifiziert werden (Abbildung III-38). Zwei Stunden nach der Injektion von BrdU können proliferierende Zellen in den Krypten, ähnlich der Ki67-Färbung, nachgewiesen werden. In der Höhe der proliferierenden Zone wurde kein Unterschied

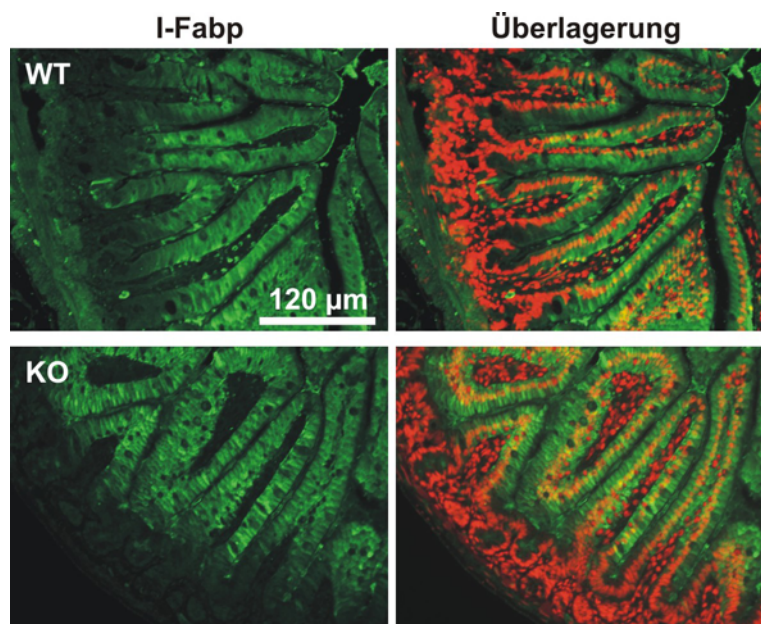
zwischen Wildtyp- und I-Plastin defizienten Mäusen festgestellt. Für die Überprüfung einer erhöhten Zellerneuerung wurden Darmschnitte von 24 und 48 Stunden nach der Injektion von BrdU untersucht. In I-Plastin defizienten Mäusen wurde eine signifikant erhöhte Migrationsrate festgestellt. Die Migrationsweite ist nach 24 Stunden mit 52,8 % deutlich weiter als im Wildtyp mit 36,8 % (t-Test:  $P < 0,0001$ ). Ähnliche Ergebnisse wurden 48 Stunden nach der Injektion ermittelt. Während BrdU positive Zellen in I-Plastin defizienten Mäusen bereits mit einer Migrationsweite von 91,2 % die Villusspitze fast erreichen, beträgt die Migrationsweite im Wildtyp 79,2 % (t-Test:  $P < 0,0001$ ). Eine Veränderung der Villuslänge oder Zellzahl in den Villi wurde nicht festgestellt.



**Abbildung III-38: Erhöhte Zellmigration in I-Plastin defizienten Mäusen.** Den Tieren wurde 2, 24 und 48 Stunden vor der Entnahme des Darms BrdU injiziert. BrdU positive Zellen wurden mit Hilfe der Immunhistochemie oder Immunfluoreszenz mit einem anti-BrdU Antikörper identifiziert. Für die Quantifizierung wurden mindestens drei Darmschnitte von jeweils drei Mäusen pro Genotyp und Zeitpunkt beider Geschlechter verwendet. Dargestellt sind repräsentative Fluoreszenzaufnahmen verschiedener Zeitpunkte von Wildtyp-(WT) und I-Plastin defizienten (KO) Mäusen. Die Fluoreszenz wurde zusätzlich mit Phasenkontrastaufnahmen überlagert. Zur Quantifizierung der Migrationsweite von BrdU positiven Zellen wurde die Länge von den Krypten bis zu den Villuspitzen und die Migrationsweite gemessen wie es bei den dargestellten Überlagerungen bei 24 h beispielhaft eingezeichnet ist. Der Graph

zeigt die statistische Auswertung mit Standardfehler der Migration BrdU positiver Zellen von immunhistochemischen Aufnahmen (t-Test: \*\*\*P < 0,0001). Zwei Stunden nach der BrdU-Injektion können proliferierende Zellen in der S-Phase identifiziert werden. Die Zellmigration ist nach 24 und 48 Stunden bei I-Plastin-Defizienz signifikant erhöht.

Um sicherzustellen, dass die erhöhte Zellmigration bei I-Plastin-Defizienz keine Auswirkungen auf die Differenzierung der Epithelzellen hat, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von I-Fabp (*intestinal fatty acid binding protein*) durchgeführt. I-Fabp wird im Zytoplasma von ausdifferenzierten Epithelzellen exprimiert. Sowohl im Wildtyp- als auch in I-Plastin defizienten Mäusen ist I-Fabp weder in den Krypten noch im unteren Drittel der Villi lokalisiert (Abbildung III-39). Die Zellen in den Villi von *knockout*-Mäusen weisen keinen Unterschied in ihrer Differenzierung auf.



**Abbildung III-39: Normale Differenzierung der Epithelzellen.** Immunfluoreszenzfärbung von Darmschnitten. Detektiert wurde nach Inkubation mit einem für den Differenzierungsmarker I-Fabp (*intestinal fatty acid binding protein*) spezifischen Antikörper (grün). Die Zellkerne wurden mit Propidiumjodid (rot) angefärbt. In I-Plastin defizienten (KO) Mäusen sind die Zellen in den oberen 2/3 Drittel der Villi wie im Wildtyp (WT) differenziert. Die Aufnahmen wurden mittels konventioneller Fluoreszenzmikroskopie erstellt.