

Organ- und Gewebelokalisation von P30, einem Protein aus der Gruppe der Strukturproteine

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereiches Medizin
der Justus-Liebig Universität Gießen

vorgelegt von

Thomas Schulte-Kreutz (geb. Schulte)
aus Wickede (Ruhr)

Gießen, 2008

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
des Fachbereiches Medizin
der Justus-Liebig Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Kummer

Gutachter: PD Dr. Wimmer-Röll

Gutachter: PD Dr. K. Reuner

Tag der Disputation: 10.06.2008

1 Inhaltsverzeichnis

2	Einleitung	1
2.1	Bedeutung der PTPasen	1
2.2	Potentieller Interaktionspartner P30	3
2.3	Zielsetzung	4
3	Material und Methoden	5
3.1	Gewebeengewinnung und Gewebverarbeitung	5
3.2	Lichtmikroskopische Immunhistochemie	6
3.3	Einfache Immunofluoreszenz	6
3.3.1	Durchführung	6
3.3.2	Primärantikörper	7
3.3.3	Spezifitätskontrollen	8
3.3.4	Doppelimmunofluoreszenz	9
3.3.5	Kernfärbung	9
3.3.6	Fluoreszenzmikroskopie	10
3.3.7	CLSM-Mikroskopie	11
3.3.8	Dokumentation	11
3.4	In vivo Stimulation von Rattenmuskeln	12
3.5	Zellkultur	12
3.5.1	Zelllinien	12
3.5.2	Kulturbedingungen	13
3.6	Western Blot	14
3.6.1	Durchführung	14
3.7	Elektronenmikroskopie	14
4	Ergebnisse	15
4.1	Muskulatur	16
4.1.1	Skelettmuskel	16
4.1.2	Herzmuskulatur	19
4.1.3	Glatte Muskulatur	20
4.2	Peripheres Nervensystem	22
4.2.1	Peripherer Nerv	22
4.2.2	Ganglion trigeminale	23
4.2.3	Ependym und Plexus choroideus	24
4.3	Auge	25
4.3.1	Retina	25
4.3.2	Cornea	27
4.3.3	Augenmuskulatur	28

4.4	Haut.....	28
4.5	Respiratorisches Epithel	30
4.6	Niere.....	32
4.6.1	Glomerulum	32
4.7	Glandula suprarenalis	33
4.8	Weibliche Geschlechtsorgane	35
4.8.1	Ovar	35
4.8.2	Tuba uterina	36
4.8.3	Mamma lactans.....	37
4.8.4	Placenta und Uterus.....	39
4.9	Männliche Geschlechtsorgane	40
4.9.1	Hoden	40
4.9.2	Spermium.....	42
4.10	Pankreas.....	43
4.11	Milz	44
4.12	Zellkultur	45
4.12.1	INR1G9 Zellen.....	46
4.12.2	HaCaT-Zellen	47
4.12.3	NS20Y-Zellen	48
4.13	Weitere untersuchte Organe	49
4.13.1	Leber	49
4.13.2	Großhirn	50
4.13.3	Kleinhirn.....	51
4.13.4	Blutausstrich	52
5	Diskussion.....	53
5.1	Lokalisation von P30	54
5.1.1	P30 in Assoziation mit Aktin.....	54
5.1.2	Muskulatur	56
5.1.3	Gefäßsystem	57
5.1.4	Haut	57
5.1.5	Nebenniere	58
5.1.6	Kinzilien tragende Epithelien (Ependym und respiratorisches Epithel)	58
5.1.7	Hoden und Spermien	59
5.1.8	Nervensystem	60
5.1.9	Glomerulum	61
5.1.10	Ovar (Oocyte)	62
5.2	P30 und Laminopathien	63

6	Zusammenfassung	64
7	Summary.....	67
8	Sequenz von KIAA0796/P30	69
9	Literaturverzeichnis	73
10	Abkürzungsverzeichnis.....	79
11	Veröffentlichung	82
12	Danksagung	83
13	Erklärung.....	84
14	Lebenslauf	85

2 Einleitung

2.1 Bedeutung der PTPasen

In jeder Zelle laufen eine große Anzahl komplexer Vorgänge und Interaktionen ab. Dabei folgen die Reaktionen einem übergreifenden Grundplan mit zahlreichen gleichen Prinzipien. Ein zentrales Element besteht in der Weitergabe von Signalen durch Phosphorylierung von Proteinen. Auf diese Weise ist es möglich, Proteine reversibel zu aktivieren oder zu deaktivieren. Reversible Phosphorylierung ist eine typische Form der Signalübertragung innerhalb von Signalkaskaden. Der Phosphorylierungsstatus jedes einzelnen Proteins wird von der Aktivität der Proteinkinasen und Phosphatasen bestimmt und damit auch reguliert. Über 30% der intrazellulären Proteine werden durch diese reversible Phosphorylierung gesteuert (Barford et al. 1998), und regulieren damit zum Beispiel die Aktivitäten verschiedener Enzyme oder steuern die interzelluläre Kommunikation. Sie kontrollieren anabole, katabole und mitogene Prozesse und deren intrazelluläre Organisation. Das Säugetiergenom kodiert allein ca. 2000 Proteinkinasen (Hunter 1995), wobei Serin/Threonin und Phosphotyrosin-Proteinkinasen am besten charakterisiert sind. Vergleicht man die Aktivitäten von Kinasen für Serin bzw. Threoninreste mit den entsprechenden Phosphatasen, so zeigt sich ein ausgewogenes Aktivitätsbild. Für die Regulation der Tyrosinphosphorylierung jedoch sind Phosphatasen verantwortlich, deren Aktivitäten die der Tyrosin-Kinase um 3-4 Potenzen übersteigt (Mustelin et al. 1989), wodurch das Gleichgewicht zugunsten der Dephosphorylierung zu erkennen ist. Die in den letzten Jahren vermehrt untersuchten Funktionen, aber auch die Folgen einer Fehlfunktion der PTPasen zeigen, dass sie eine übergeordnete Rolle in der Zelle spielen. In höheren Eukaryoten führen Defekte in der Aktivität von PTPasen zu nachweisbaren Dysfunktionen. Der großen Enzymfamilie der PTPasen, der immer wieder neue Isoformen zugeordnet werden, gehören drei große Molekülfamilien an, welche sich in ihrer Tertiärstruktur und ihrem katalytischen Mechanismus sehr ähnlich sind (Neel et al. 1997). Nach Aufbau, Funktion und Lokalisation in der Zelle werden transmembranäre, zytoplasmatische und dualspezifische (rezeptorähnliche) Formen der PTPasen unterschieden. 75 dieser klassischen Enzyme sind bisher charakterisiert, Schätzungen auf Grund von Genomsequenzierungen lassen

mindestens 500 weitere humane PTPasen erwarten. Speziell die Gruppe der rezeptorähnlichen PTPasen hat eine Struktur, die einem Transmembranrezeptor ähnlich ist. Es wird vermutet, dass diese Enzyme maßgeblich an der Zell-Zell-Interaktion beteiligt sind (Pulido et al. 1995). Aufgrund der verschiedenen Strukturelemente können die PTPasen unterschiedlichen Lokalisationen innerhalb der Zelle zugeordnet werden. Man findet Sequenzsignale sowohl für eine nukleäre, membranassoziierte, als auch für eine cytoskeletale Assoziation. Die kleinere Splicevariante der PTPasen findet sich bevorzugt nukleär, die größere im Zytosol am endoplasmatischen Retikulum (Mosinger et al. 1992), (Reddy et al. 1995), (Champion-Arnaud et al. 1991). SH3- und PEST-Sequenzen deuten darauf hin, dass die Proteine an bestimmte Zellkompartimente binden können, um diese zu regulieren. Als eine der ersten PTPasen wurde die PTP 1B isoliert und charakterisiert (Burke et al. 1998). Sie gehört zur Non-Rezeptor Subklasse und besitzt regulatorische Funktion. Die PTP 1B steht mit ihrem C-terminalen Ende in direkter Verbindung zum endoplasmatischen Retikulum und ihre katalytische Domäne ist zum Cytoplasma hin gerichtet. Eine Phosphorylierung ist an Serin-Resten möglich. Bei einem der Interaktionspartner der PTP 1B handelt es sich um eine Serin-Threonin Kinase. Eine weitere PTP Unterklasse, die T-Zell PTP wird in zwei Splicingvarianten gefunden. Die 45kDa Form wird im Nucleus gefunden, die 48kDa Form ist wie die PTP 1B mit dem endoplasmatischen Retikulum assoziiert. Es handelt sich bei beiden Splicingformen um nicht transmembranäre PTPs, die zuerst aus T-Zellen isoliert wurden. Die katalytische Domäne der ER-assoziierten TC-PTP ist an der cytoplasmatischen Seite lokalisiert, wodurch ihr eine Reihe von cytoplasmatischen Substraten zugänglich sind. Beide Formen der TC-PTP wurden in verschiedenen Organen (Ovarien, Hoden, Thymus, Niere, Pankreas) gefunden (Ibarra-Sanchez et al. 2000)

2.2 Potentieller Interaktionspartner P30

Bei der Suche nach potentiellen Interaktionspartnern der T-cell PTPase bzw. der ihr sehr ähnlichen PTP1B mithilfe des Yeast-Two-Hybrid-Systems (Gyuris et al. 1993), wurden 2 mögliche Interaktionspartner identifiziert. Einer dieser möglichen Partner war das Protein P30, dessen Name sich aus einer fortlaufenden Nummerierung der untersuchten Klone ergab (Porsche 2001). Das Protein ist inzwischen in seiner Basen- und Aminosäuresequenz bekannt und zeigt nur sehr geringe Ähnlichkeit mit anderen bekannten Proteinen. Es handelt sich bei P30 um ein Protein bestehend aus 562 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 58,4 kDa. Das erstmalig aus menschlichem Gehirn isolierte Protein 30 (Nagase et al. 1998) findet sich in der Datenbank SwissProt (www.expasy.org) unter der Bezeichnung KIAA0796, KIAA1262 und KIAA1756, wobei diese synonym verwendet werden. Eine Domänen-Analyse des Proteins mit dem BLAST-Vergleichsalgorithmus (Altschul et al. 1990) zeigte das Vorkommen von Spektrin-Repeats, durch die sich P30 in die Gruppe der Strukturproteine einordnen läßt. Charakteristisch für alle Mitglieder der Spektrinfamilie sind deren kontinuierlich wiederkehrende Motive der 90-110 Aminosäuren, die unter anderem eine Calponin-Homologie Domäne besitzen, mit der sie zur Bindung an Aktin befähigt sind (Hartwig 1994; Pascual et al. 1997). Es ergab sich eine partielle Ähnlichkeit mit einer Gruppe von Strukturproteinen, zu denen unter anderem Dystrophin, α -Spektrin und Utrophin zählen. Diese Proteine, wie auch P30, beinhalten zahlreiche sogenannte Spectrin-Repeats, deren Funktion unter anderem die Organisation und Erhaltung der strukturellen Integrität des Membranskelettes innerhalb der Zelle ist (Grum et al. 1999). Weitere Synonyme für P30 sind Myne und Syne-1, deren Lokalisation und Funktionsbereich dem Cytoskelett, sowie der Zellkernmembran und dem Golgi-Apparat zugeordnet werden (Gough et al. 2003). Vorhersagen über die Sekundärstruktur von P30 (Expasy Molecular Biology Servers) zeigen, daß das Protein zu 68,7% aus alpha-Helices, zu 3,1% aus beta-Faltblättern und zu 28,1% aus Loops besteht. Die spezielle Anordnung der alpha-Helices zu einem antiparallelen Coiled-coil-Motiv hin geben dem Molekül eine hohe Flexibilität (Cohen et al. 1994). Unter Zuhilfenahme der Software zur Suche nach Transmembrandomänen von P30 (Sonnhammer et al. 1998) wurde gezeigt, daß Position 1-1029 extrazellulär und Position 1049-1080 intrazellulär lokalisiert sind.

Diese Feststellung legt nahe, daß es sich im Falle von P30 um ein Typ I-Transmembranprotein handeln könnte. An Position 134-141 wurde zusätzlich eine Tyrosin-Phosphorylierungsstelle gefunden, die eine direkte Assoziation zur intrazellulär vorkommenden Gruppe der Tyrosinkinase als Effektormoleküle ermöglicht. Eine Vielzahl dieser Phosphorylierungskaskaden wird der unmittelbaren Nachbarschaft zur Zellmembran zugeordnet.

2.3 Zielsetzung

Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist noch sehr wenig über die Expression von P30 in verschiedenen Organen und Geweben bekannt und auch seine Funktion ist nur ansatzweise charakterisiert. Ziel dieser Arbeit war es, eine morphologische Charakterisierung über immunhistochemische Verfahren für Lichtmikroskopie und Elektronenmikroskopie, sowie über Western Blotting zu erreichen. Damit soll eine Übersicht über Organe und Gewebe erstellt werden, die das Protein exprimieren. Zusätzlich sollte die zelluläre und subzelluläre Lokalisation des Proteins in diesen Organen untersucht werden. Darüber hinaus sollte spezifiziert werden, welche Stellung das P30 Protein innerhalb der intrazellulären Funktionsabläufe einnehmen könnte und welche Folgen eine Dysfunktion von P30 haben könnte.

3 Material und Methoden

3.1 Gewebegewinnung und Gewebverarbeitung

Die zu untersuchenden Gewebe wurden von AVB-Mäusen (Harlan-Winkelmann, Borcheln; n=5) mit einem Gewicht von 25-30g und Wistar-Ratten (Tierstall des Physiologischen Instituts, Universität Gießen; n=5) mit einem Gewicht von 200-300g entnommen. Nach Tötung der Tiere durch Inhalation von Halothan (Rüsch, Böblingen) wurden die Tiere thorakotomiert und der Herzbeutel eröffnet. Für histologische Untersuchungen wurde der linke Ventrikel kanüliert und das Blut mit Vorspüllösung (25g/l Polyvinylpyrrolidon MG 40000, 9g/l NaCl, 5 g/l Procainhydrochlorid in aq. bidest., eingestellt auf pH 7,4) aus dem Kreislauf gewaschen. Zuvor wurde über einen kleinen Schnitt im rechten Vorhof ein Abfluss geschaffen, um so die orthograde Durchströmung und die retrograde Durchströmung des kleinen Kreislaufs zu ermöglichen. Anschließend wurde das Tier durch die liegende Kanüle mit Zamboni-Fixativ ((150 ml/l gesättigte Pikrinsäure (Merck, Darmstadt), 50 ml/l Formaldehyd (37 %; Roth, Karlsruhe), 500 ml/l Phosphatpuffer (0,2 M, pH 7,4), mit Aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt) perfundiert und die benötigten Gewebe entnommen. Anschließend wurden die Gewebeproben in Zamboni-Lösung für durchschnittlich 3-4 h bei Raumtemperatur nachfixiert. Anschließend wurden die Proben mindestens viermal für eine Stunde in 0,1 M Phosphatpuffer (PB) pH 7,4 gewaschen. Zur Kryoprotektion wurden die Proben über Nacht in Saccharose-Lösung (PB + 18% Saccharose (Merck, Darmstadt)) überführt, in dem Gefriereinbettmedium Tissue Tek (Sarkura, Zoeterwoude, Niederlande) orientiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Alle Gewebe wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Humane Hautproben etc. wurden mir freundlicherweise vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Giessen unter der Leitung von Prof. Dr. Andreas Schulz und von Leichenmaterial des Instituts für Anatomie und Zellbiologie des Universitätsklinikums Giessen unter der Leitung von Prof. Dr. Wolfgang Kummer zur Verfügung gestellt. Für weitere histologische Untersuchungen wurden die entnommenen humanen Hautproben in Zamboni-Fixativ für durchschnittlich 4-6 h bei Raumtemperatur immersionsfixiert und anschließend analog zu den Gewebeproben von Maus und Ratte verarbeitet.

Gewebeproben für Western Blot-Analysen wurden in schmelzendem Isopentan schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

3.2 Lichtmikroskopische Immunhistochemie

Studien zur Lokalisation des Protein P30 in den zu untersuchenden Geweben, wurden mittels der lichtmikroskopischen Immunhistochemie durchgeführt.

3.3 Einfache Immunofluoreszenz

3.3.1 Durchführung

Es wurde die Technik der indirekten Immunofluoreszenz gewählt, bei der im Gegensatz zur direkten Immunofluoreszenz nicht der Primärantikörper, sondern der sekundäre Antikörper mit einem Fluorochrom markiert wird, wodurch eine größere Sensivität und eine höhere Flexibilität beim Einsatz der Detektionssysteme ermöglicht wird. Gefrierschnitte mit einer Dicke von $7-10\mu\text{m}$ wurden am Kryostat (Leica Modell 1900M, Nussloch; Boxtemperatur je nach Gewebe -18 bis -22°C , Präparattemperatur je nach Gewebe -21 bis -25°C , s. Abb. 1) angefertigt und auf mit Chromalaun/Gelatine beschichtete Objektträger (Kaliumchromsulfat-12-Hydrat (Riedel-de-Haen, Seelze) aufgenommen. Nach einer Stunde Lufttrocknung bei Raumtemperatur wurden die Schnitte mit einem Pap Pen (SCI Sciences Sevices, München) umfahren. Das Blocken unspezifischer Bindungen erfolgte parallel zur Inkubation. Hierzu wurde der Primärantikörper gegen das Protein P30 in der optimal ausgetesteten Verdünnung in der Blocklösung (10 % normales Ziegen Serum, 5 % Rinderserumalbumin (Serva, Heidelberg), 0,1 % Cold Water Fish Skin in PB mit 9g/l NaCl (Roth,)) verwendet (Hauri & Bucher, 1986). Die Inkubation der Schnitte erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur.

Nach der Inkubation wurden die Schnitte dreimal zehn Minuten in Phosphate buffered Saline gewaschen. Der Nachweis des P30 Antikörpers erfolgte mit dem jeweiligen Sekundärantikörper gelöst in Inkubationspuffer in entsprechender

Verdünnung (s. Tab.). Nach der Inkubation (1 h) mit dem Sekundärantikörper in Dunkelheit wurde erneut dreimal zehn Minuten mit PBS gespült. Alle Schnitte wurden in gepuffertem Glycerol (pH 8,6) als Medium eingedeckelt und zur Stabilisierung der Immunofluoreszenz imKühlschrank bei 4°C aufbewahrt.



Abb 1. Kryostat (Leica Modell 1900M, Nussloch)

3.3.2 Primärantikörper

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete polyklonale Antikörper gegen P30 wurde von Herrn Prof. Dr. W. Hofer hergestellt (Welte, 2000) und wurde von Frau Welte charakterisiert und auf seine Spezifität untersucht. Die Herstellung erfolgte mittels eines gereinigten und rekombinanten Proteins. Zur Immunisierung wurde einem Kaninchen über einen Zeitraum von 35 Tagen hinweg in steigenden Dosen das entsprechende Antigen injiziert. Die Immunisierung führte zu einer kontinuierlichen Zunahme von anti-P30-IgG. In meinen eigenen Versuchsreihen mit den Antiseren konnte eine optimale Verdünnung des P30- Antikörpers für die Immunhistochemie von 1:250 ermittelt werden. Weitere verwendete Primärantikörper und deren optimale Verdünnung sind in Tabelle 1 aufgelistet.

<i>Konjugat</i>	<i>Wirtsspezies</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Quelle</i>
Anti PDI	Maus	1:100	Abcam, Cambridge
Anti Golgin	Maus	1:250	Molecular Probes, Eugene, USA
Anti P30	Kaninchen	1:250	Arbeitsgruppe Hofer, Konstanz
Reca 1	Maus	1:20	Serotec , USA
Anti CD14	Maus	1:100	Dako Cytomation, Dänemark

Tabelle 1 Liste der verwendeten Primärantikörper

3.3.3 Spezifitätskontrollen

Kontrollen auf unspezifische Bindungen wurden durch eine Präabsorption des polyklonalen P30-Antiserums über Nacht bei 4°C mit korrespondierendem P30-Protein (Konzentration: 20 µg Antigen/ml Antiserum) durchgeführt. Mit diesem präabsorbierten Antikörper wurde eine immunhistochemische Reaktion nach Standardprotokoll durchgeführt. Eine Positivkontrolle mit nicht präabsorbiertem Antikörper wurde mitgeführt. Als Negativkontrolle wurde für jede Serie eine Inkubation ohne Primärantikörper nach Standardprotokoll durchgeführt, um mögliche unspezifische Bindungen durch den Sekundärantikörper auszuschließen.

<i>Konjugat</i>	<i>Wirtsspezies</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Quelle</i>
Fluorescein- Isothiocyanat (FITC)	Ziege	1:500	Organon Teknika, Eppelheim
Alexa Fluor	Ziege	1:1000	Molecular Probes, Leiden/ Niederlande
Alexa Fluor	Ziege	1:500	Molecular Probes, Leiden/NL
Fluorescein- Isothiocyanat (FITC)	Esel	1:400	Dianova, Hamburg

Tabelle 2 Liste der verwendeten Sekundärantikörper

3.3.4 Doppelimmunofluoreszenz

Zur simultanen Darstellung zweier unterschiedlicher Antigene im selben Schnitt wurden Doppelimmunofluoreszenzen durchgeführt. Das Vorgehen entspricht im Prinzip dem Verfahren der einfachen Immunfluoreszenz. Dabei wurde ein Gemisch beider Primärantikörper verwendet, die jeweils von unterschiedlichen Spezies stammen. Die Endkonzentration entspricht dem jeweiligen Verdünnungsoptimum bei einfacher Immunofluoreszenz. Dieses wurde in Blocklösung auf den Schnitt aufgetragen. Zur Detektion kamen FITC (Fluoresceinisothiocyanat), Alexa rb555 und Alexa mouse 488 markierte Sekundärantikörper zum Einsatz.

3.3.5 Kernfärbung

Die Färbung der Zellkerne wurde mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenyl-indol (DAPI) durchgeführt., der jeweils nach Abschluß der Immunofluoreszenz auf die Schnitte gegeben wurde. Die Einwirkzeit betrug 10 Minuten an einem dunklen Ort, danach erfolgte die Spülung in Pufferlösung und die Einbettung der Objektträger in Glycerol oder Mowiol.

3.3.6 Fluoreszenzmikroskopie

Die Auswertung der Immunfluoreszenzen erfolgte mittels Auflichtfluoreszenzmikroskop (BX 60 F Fotofluoreszenzmikroskop der Firma Olympus, Hamburg) oder mit dem Auflichtfluoreszenzmikroskop Universalmikroskop Axioplan 2 Imaging der Firma Carl Zeiss Jena GmbH, (Jena; s. Abb.). Diese Methode beruht darauf, dass verschiedene Fluorochrome durch Bestrahlung mit kurzwelligem oder ultraviolettem Licht angeregt werden und Licht einer längeren Wellenlänge emittieren. Zur Kontrolle autofluoreszierender Strukturen wurden Sperrfilter und Anregungsfilter mit unterschiedlichen Wellenlängen wie auch UV Filter verwendet (Tab.) Je nach Filterkombination passiert nur emittiertes Licht eines bestimmten Wellenlängenbereichs den Sperrfilter.

<i>Fluorchrom</i>	<i>Erregerfilter</i>	<i>Sperrfilter</i>
FITC	band pass 470-490 nm	bandpass 515-550 nm
Texas-Rot	band pass 545-580 nm	long pass 610 nm
Cy-3	band pass 525-560 nm	band pass 420-460 nm
UV-Filter	band pass 390-560nm	475nm longpass

Tab 2 Verwendete Filterkombinationen

3.3.7 CLSM-Mikroskopie

Einige Präparate wurden neben der einfachen Fluoreszenzmikroskopie zusätzlich mit einem CLSM Mikroskop der Firma Leica ausgewertet. Es handelt sich dabei um ein Laser Scanning Mikroskop, mit dem immunhistochemische Präparate in einer sehr hohen Auflösung betrachtet werden können.

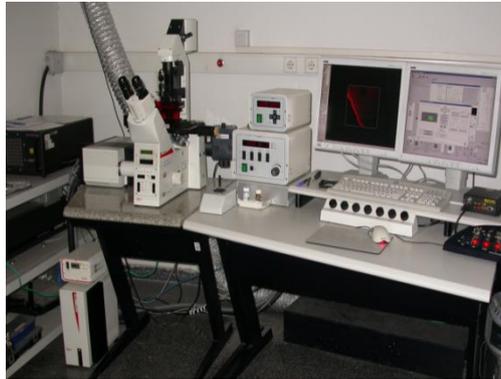


Abb. 2 LEICA TCS SP2 AOBS CLSM
Laserscanning-Mikroskop

3.3.8 Dokumentation

Die Dokumentation der Untersuchungsreihe erfolgte mittels eines an das Mikroskop angeschlossenen Computers. Die mikroskopischen Bilder wurden mit einem Videodokumentationssystem (Scion-Image, Jena) als TIFF-Dateien gespeichert. Diese Bilder wurden mit einer Bildverarbeitungssoftware (Adobe Photo-Shop) nachbearbeitet.



Abb 3 Universalmikroskop Axioplan
2 imaging der Firma Carl Zeiss Jena
GmbH, Jena).

3.4 In vivo Stimulation von Rattenmuskeln

Die in dieser Arbeit verwendeten stimulierten Rattenmuskeln, an denen der Umdifferenzierungsprozess untersucht wurde, stammen von Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von 400g-470g. Für die standardisierte Stimulation wurden den Tieren zwei Elektroden seitlich an den N. peroneus implantiert. Die chronische Elektrostimulation des M. tibialis anterior (TA) erfolgte mit einer tonischen Impulsfrequenz von 10Hz (1/0,2ms) für 12h, 2d, 4d, 8d, 10d, 20d, 21d, 22d, 23d, 28d und 33d. Der Impulsgeber wurde auf dem Rücken der Ratten befestigt und über Photozellen gesteuert. Stimuliert wurde 24h pro Tag. Untersucht wurden die Mm. tibialis anterior, extensor digitorum longus und soleus, die nach erfolgter Stimulation auf Alufolie gestreckt und anschließend in Stickstoff überführt wurden.

Diese stimulierten Muskeln wurden mir freundlicher Weise von Prof. Dr. D. Pette (Universität Konstanz) zur Verfügung gestellt.

3.5 Zellkultur

3.5.1 Zelllinien

Zur Untersuchung des Vorkommens von P30 in verschiedenen Zelllinien wurden folgende Zelllinien verwendet: INR1G9 Zellen eines Hamsterglucagonoms, zur Verfügung gestellt von Dr. Wulbrand (Philipps-Universität, Marburg);

Immortalisierte humane Keratinocyten-Zelllinie (HaCaT, Boukamp et al., 1988). Diese Zelllinie wurde uns freundlichst von Herrn Prof. Dr. H.-J. Teschemacher der Abteilung Pharmakologie der Justus–Liebig-Universität Gießen überlassen; NS20Y-Zelllinie aus dem Neuroblastom einer A/Jax Maus.

3.5.2 Kulturbedingungen

3.5.2.1 HaCaT:

Zur Anzucht wurden 75 cm² Zellkulturflaschen (Falcon, Heidelberg) für 1 Stunde mit fetalem Kälberserum (FKS; PAA, Marburg) beschichtet. Danach wurden die Zellen in RPMI 1640 Medium (SIGMA, Deisenhofen), das je 500 ml mit 50 ml fetalem Kälberserum und 5 ml Penicillin/Streptomycin/Amphotericin (PSA; Invitrogen) angereichert wurde, suspensiert. Die HaCaT-Zellen wurden dreimal wöchentlich einem Mediumwechsel unterzogen und bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.5.2.2 INR1G9

Die Kultivierung wurde in RPMI 1640-Medium durchgeführt, unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum, 100U/ml Penicillin und 100µg Streptomycin.

3.5.2.3 NS20Y

Die Zellen wurden unter Verwendung von DMEM und 10% fetalem Kälberserum, sowie 100U/ml Penicillin und 100µg Streptomycin kultiviert.

3.6 Western Blot

3.6.1 Durchführung

Nach dem Auftauen wurde den Proben 0,2% Mercaptoethanol zugegeben, um die in den Proteinen enthaltenen Disulfidbrücken aufzuspalten. Zur Inkubation wurden die Proben erneut 10min bei 95°C belassen. Anschließend wurde kurz an zentrifugiert. Als Trenngel wurde ein SDS-Polyacrylamid-Gel (10% Acrylamid) verwendet und auf Immobilon-PVDF-Membran (Millipore, Schwalbach) geblotet. Unspezifische Proteinbindungen wurden mit 10% Magermilchpulver, gelöst in TTBS (0,025M Tris-HCl, pH 8,0, 0,15 M NaCl, Tween 20 0,05% (v/v)), für 1h geblockt und anschließend mit Anti-P30-Anti Serum (1:500) in TTBS mit 2,5% Magermilchpulver über Nacht inkubiert. Nach einem Waschschrift mit TTBS (3x10min) erfolgte die Inkubation mit anti-Kaninchen IgG-Antikörper, gekoppelt an alkalische Phosphatase (1:10000; Promega, Mannheim), in TTBS mit 2,5% Magermilchpulver für 1h, gefolgt von einem weiteren Waschschrift mit TTBS (2x10min). Abschließend wurde nochmals 1x10min mit TM (0,1M Tris-HCl, pH 8,0, 0,1M NaCl, 5 mM MgCl₂) gespült. Dann wurde die Aktivität der an das Sekundärreagenz gekoppelten alkalischen Phosphatase mit BCIP/NBT Phosphatase Substrate 1-C (KPL, Maryland USA) durch Farbreaktion nachgewiesen.

3.7 Elektronenmikroskopie

Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden in Unicryl eingebettete ultradünne Gewebeschnitte der Milz verwendet. Anti-P30 wurde durch einen mit Gold konjugierten Antikörper von Ziege gegen Kaninchen IgG mit einer Partikelgröße von 20nm detektiert (Aurion). Die Auswertung und Fotodokumentation erfolgte am Transmissionselektronenmikroskop LEO 902.

4 Ergebnisse

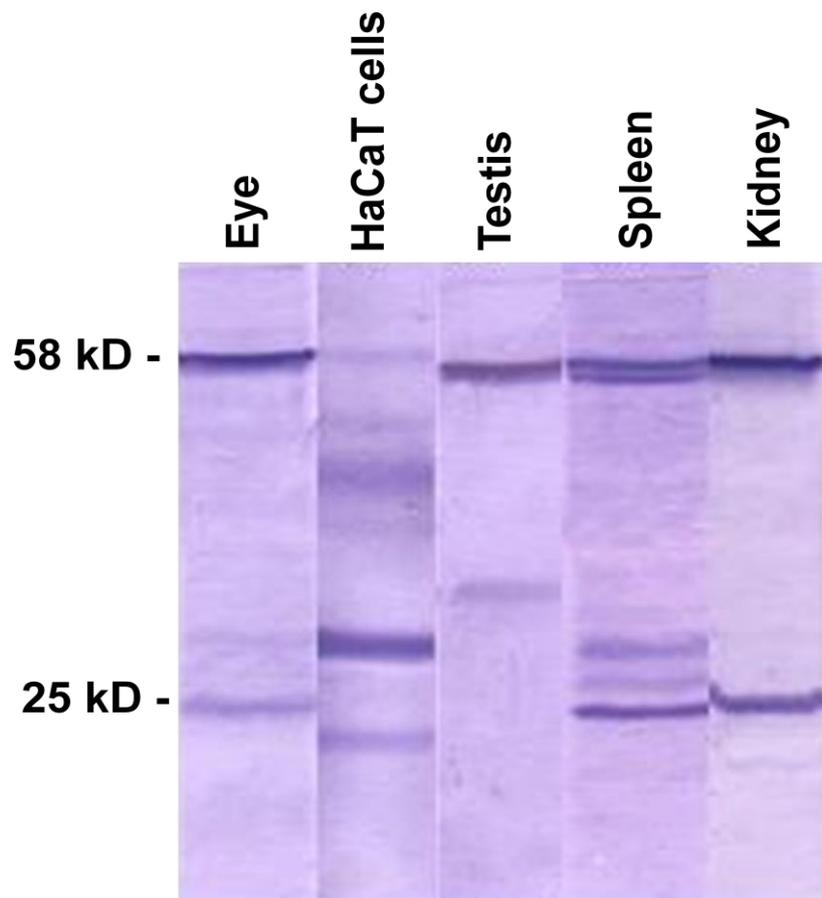


Abb 4 Westernblot von Auge, HaCat-Zellen, Hoden, Milz und Niere mit Protein 30

Der Western Blot (Abb. 4) zeigt eine Übersicht mehrerer Organe der Ratte (Auge, Hoden, Milz, Niere) und einer Zellkultur (HaCat) mit Detektion von P30. Die Bande bei 58 kD stellt P30 dar, bei der 25 kD Bande handelt es sich um eine durch alternatives Splicen entstandene Variante des Proteins.

4.1 Muskulatur

4.1.1 Skelettmuskel

Bei der quergestreiften Skelettmuskulatur handelt es sich um Gewebe, welches sich aus dem paraxialen Mesoderm differenziert hat. Das Ausgangsgewebe für die Entwicklung der Skelettmuskulatur ist das Mesoderm. Im Bereich von Kopf und Hals das unsegmentierte, am Rumpf und an den Gliedmaßen das zu Urwirbeln (Somiten) segmentierte paraxiale Mesoderm. Der einzelne Myocyt besteht aus Myofibrillen, die vom Sarkolemm umgeben werden. Die einzelne Muskelfaser enthält mehrere Zellkerne. Durch die Gliederung der Myofibrillen in einzelne Sarkomere kommt es zur speziellen Querstreifung der Skelett- und Herzmuskulatur. Die motorische Endplatte, welche ausschließlich am Skelettmuskel vorkommt, leitet die neuronalen Reize an die Muskulatur weiter. Der Nachweis des Protein 30 in Schnitten von quer gestreifter Skelettmuskulatur zeigt das Protein 30 spezifisch im Bereich der Kernmembran, sowie im Sarkolemm. In Abb. 5 sind zum Teil mehrere Kerne je Faserquerschnitt angeschnitten, das Caryoplasma reagiert nicht. Das Endothel der zwischen den einzelnen Muskelfasern befindlichen Kapillaren ist ebenfalls P30 positiv.

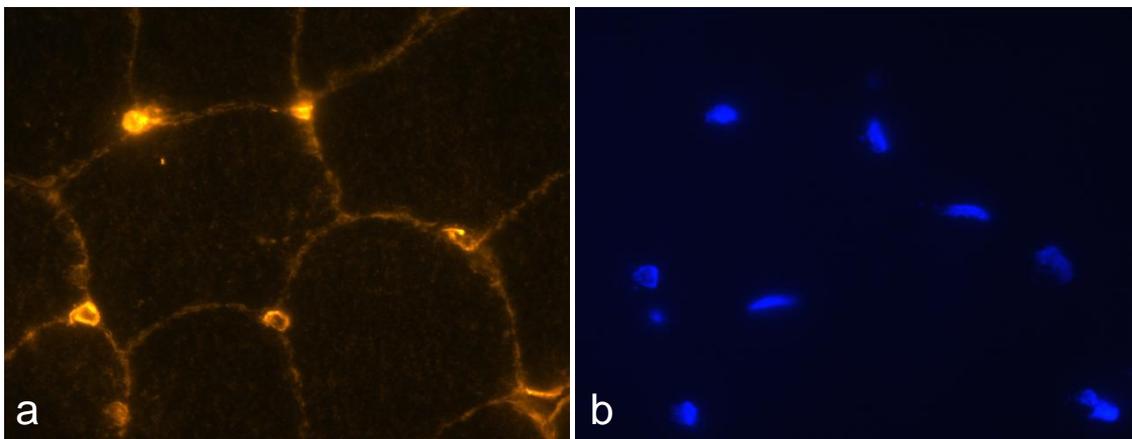


Abb.5 a) P30 Reaktion im Skelettmuskel der Ratte (630fach vergrößert) **b)** DAPI Kernfärbung des identischen Muskelschnittes

Die in Abbildung 6a dargestellte Muskelspindel weist ebenfalls eine positive Reaktion mit dem Antikörper gegen P30 auf. Die neuronalen, sowie die muskulären Anteile der Muskelspindel sind P30 positiv. Im Kapselraum der Spindel erkennt man die Zellkerne der intrafusalen Muskelfasern, deren Kernmembran eine positive Reaktion aufweist. Diese intrafusalen Fasern werden unterschieden in Kernsack- und Kernkettenfasern, welche sich vor allem durch ihre Größe und die Anordnung der Zellkerne unterscheiden. Kernkettenfasern (siehe Pfeil) sind schmal und die Zellkerne sind kettenförmig übereinander angeordnet, Kernsackfasern sind wesentlich dicker und länger und die Zellkerne befinden sich zentral ungeordnet nebeneinander, weshalb im vorliegenden Präparat mehrere Kerne gleichzeitig in einer Faser erkennbar sind (siehe Stern). Das Cytoplasma der intrafusalen Faser weist keine Reaktion auf. Deutlich reaktiv ist ebenfalls die Kapsel, die die komplette Muskelspindel umgibt. Um zu überprüfen, ob die Expression des P30 im Skelettmuskel durch eine Änderung, hier eine Reduktion, der Thyroidkonzentration beeinflusst wird, wurden Schnitte von musculus soleus von hypothyreoter Ratte angefertigt und auf das Vorkommen von P30 analysiert. Wie Abbildung 6b zeigt, wird auch unter reduzierten Thyroidkonzentrationen P30 exprimiert. Im Vergleich zur Muskulatur eines stoffwechsellnormalen Tieres ist die Expressierung von P30 im hypothyreoten Muskel jedoch deutlich reduziert.

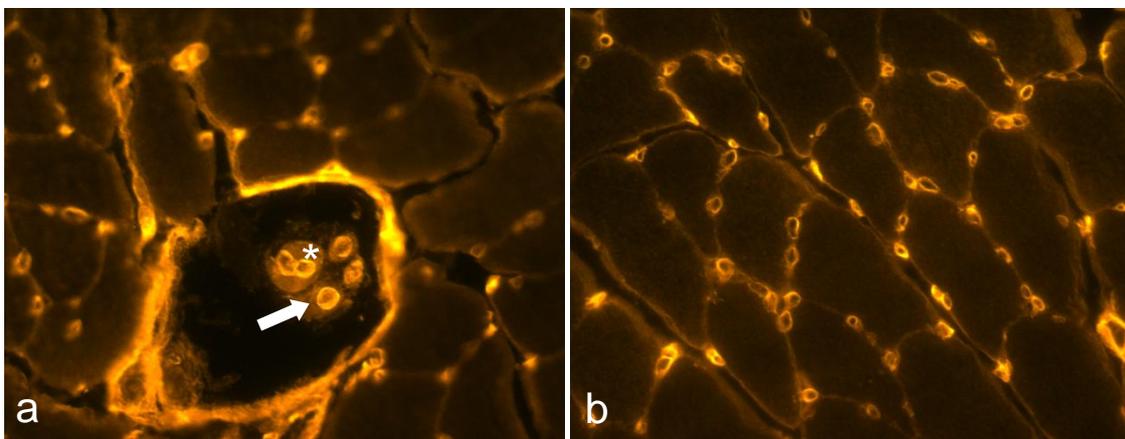


Abb.6 a) Muskelspindel der Ratte 400fach vergrößert, **b)** hypothyreoter Rattenmuskel 400x

4.1.1.1 Stimulierter Skelettmuskel

Durch Training bzw. Stimulation können sich Größe und Volumen der Muskelfaser infolge einer Myofibrillenvermehrung und eines geänderten Expressionsmusters an die neuen Bedingungen anpassen. Deshalb bietet die Fasertyptransformation ein geeignetes Modell, das Expressionsmuster des P30 bei Änderung des Aktivitätsprofils und in Folge des Fasertyps zu untersuchen. In Abb. 7 sind in a) der unstimulierte Musculus tibialis anterior und in b) der stimulierte Musculus tibialis anterior (Stimulationsdauer von 20 Tagen) desselben Tieres nach Markierung mit dem Antikörper gegen Protein 30 dargestellt. Im stimulierten Muskel zeigt sich deutlich ein verstärktes Vorkommen von P30 an der Zellmembran und der Kernmembran.

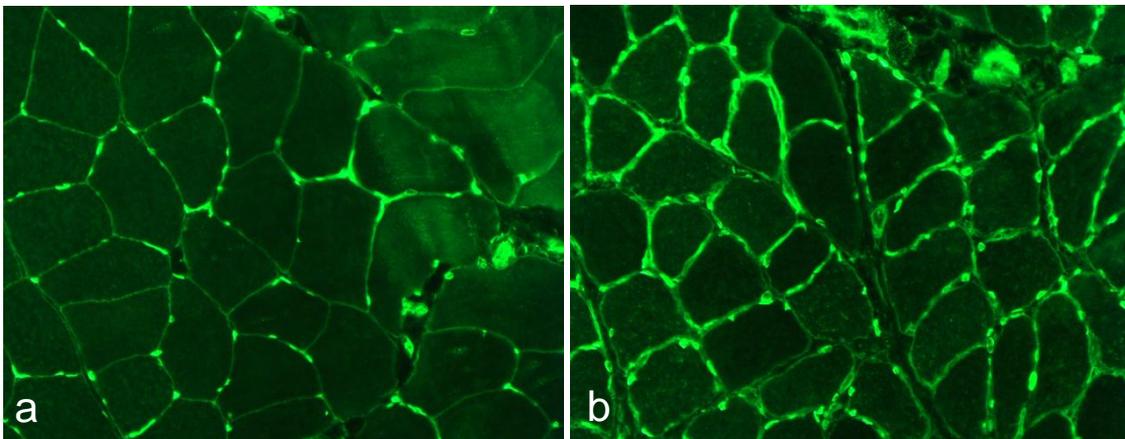


Abb 7 a) unstimulierter Skelettmuskel der Ratte (200fach), **b)** 8 Tage stimulierter Rattenmuskel (200fach)

Um den Einfluß der Entwicklung auf die Ausprägung des P30 zu untersuchen, wurde in 18 Tage alten Mäuseembryonen die Verteilung des P30 untersucht. Im sich differenzierenden Skelettmuskel, hier am Beispiel des M. intercostalis gezeigt, findet sich bereits in diesem Stadium eine Expression des P30. Im Gegensatz zum adulten Muskel kann das Protein nur in der Kernmembran nachgewiesen werden, während das Sarcolemm areaktiv ist (Abb. 8).

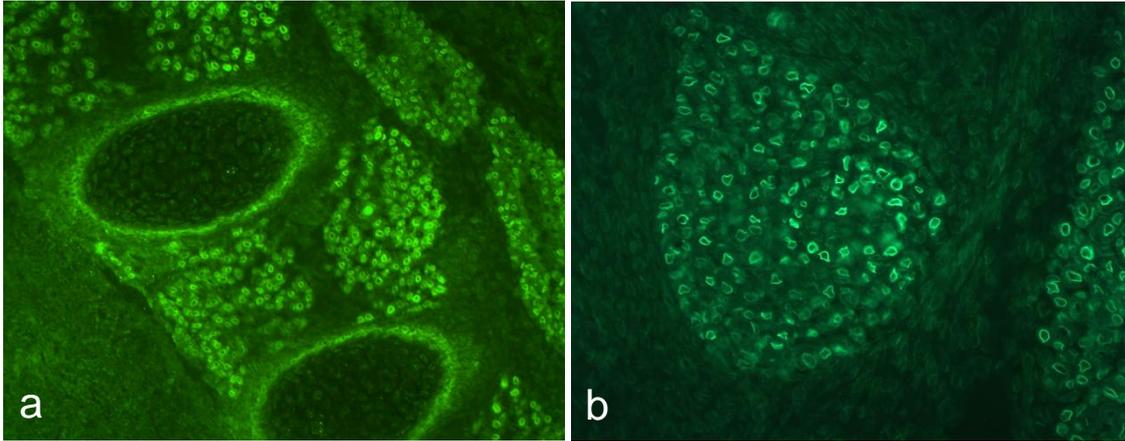


Abb 8 a) embryonale Intercostalmuskulatur der Ratte in 100 facher Vergrößerung **b)** embryonale Muskelanlage 200 fach vergrößert

4.1.2 Herzmuskulatur

Als ein weiterer Typ der quergestreiften Muskulatur wurde die Herzmuskulatur untersucht. Bei Betrachtung der Herzmuskulatur der Ratte zeigt sich eine mit der Skelettmuskulatur vergleichbare Lokalisation des P30. Sowohl die Membran der mittelständigen Kerne, als auch das Plasmalemm der Herzmuskelzelle sind P30 positiv. Im Bereich der mechanischen Zellkontakte, der Glanzstreifen/Disci intercalares ist jedoch keine P30 Reaktion nachzuweisen. Die stark ausgeprägten kardialen Gefäße weisen in ihrem Endothel ebenfalls P30 auf (Pfeil in Abb. 9).

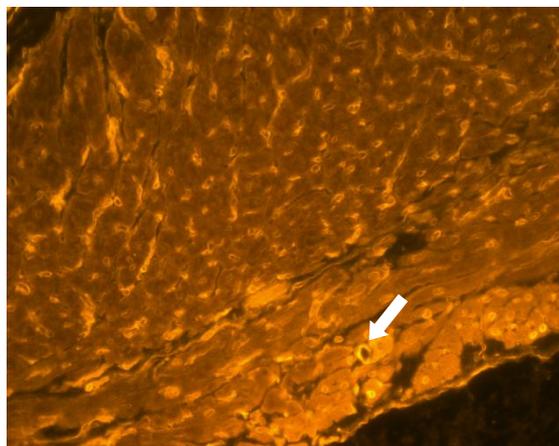


Abb 9 Herzmuskulatur der Ratte in 200 facher Vergrößerung

4.1.3 Glatte Muskulatur

Bei der Suche von P30 in den verschiedenen Organen und Geweben wurde P30 auch in glatter Muskulatur des Gefäßsystems, des Bronchialsystems, des Uterus, sowie während der Embryonalentwicklung nachgewiesen.

4.1.3.1 Gefäßmuskulatur

Hier wurde das Vorkommen von P30 im Gefäßsystem an verschiedenartigen Gefäßen untersucht und ist hier exemplarisch für die Arteria carotis, einem Gefäß des muskulären Typs, dargestellt. Dabei handelt es sich um das Blutgefäß, welches den Großteil des Kopfes mit sauerstoffreichem Blut versorgt. Arterielle Gefäße wie die Arteria carotis bestehen aus drei Schichten. Der Intima, bestehend aus einer Schicht Endothelzellen unterlagert von einer Schicht feinmaschigen Bindegewebes, der Media, einer Schicht aus glatten Muskelzellen, sowie elastischen Fasern und der Adventitia, die aus Bindegewebe aufgebaut ist. Der Nachweis des P30 in Schnitten eines A. carotis Präparates der Ratte zeigt eine deutliche Reaktion des Antikörpers mit der Tunica media (Abb. 10). Es sind die einzelnen Schichten der glatten Muskelzellen deutlich (* in Abb. 10b) zu erkennen. Das zwischen den jeweiligen Muskelschichten gelegene Bindegewebe weist keine Reaktion des Antikörpers auf (+). Gleiches gilt für die Membrana elastica interna, einer Schicht aus verdichteten elastischen Fasern, sowie für die Adventitia. Die Endothelzellen weisen im vorliegenden Präparat eine niedrige Konzentration an P30 auf. Diese Lokalisation findet sich so in allen untersuchten arteriellen Gefäßen, sowohl vom muskulären, als auch vom elastischen Typ. Im Gegensatz hierzu wies die Reaktivität des untersuchten Proteins im Endothel eine große Variabilität auf. In Abbildung 10a ist das Endothel mit Hilfe der Doppelmarkierung durch P30 und Reca1 markiert, wodurch über die Kolokalisation des Proteins deutlich wird, dass P30 im arteriellen Endothel zu finden ist. Bei den P30 positiven glatten Muskelzellen findet sich eine starke Reaktion der Kernmembran, während das Cytoplasma eine fein granulierte schwache Reaktion aufweist. Teilweise sind auch fein faserige/fibrilläre Strukturen zu erkennen. Wie die Gegenfärbung mit DAPI zeigt, verbleibt das Karyoplasma negativ. Die stark variierende Größe der Zellkerne ergibt sich aus den unterschiedlichen Schnittebenen in denen die einzelnen Kerne getroffen wurden.

Ein entsprechendes Verteilungsmuster des P30 lässt sich in venösen Gefäßwänden nachweisen. Auch hier wird P30 analog zur Lokalisation in den Arterien in der glatten Muskulatur der Media gefunden, wobei die Intensität der Reaktion aufgrund des geringeren Muskelanteils wesentlich geringer ausgeprägt ist. Bereits während der Embryonalentwicklung der Maus wird P30 in Arterien eines 18 Tage alten Mäuseembryos exprimiert (Abb. 10c).

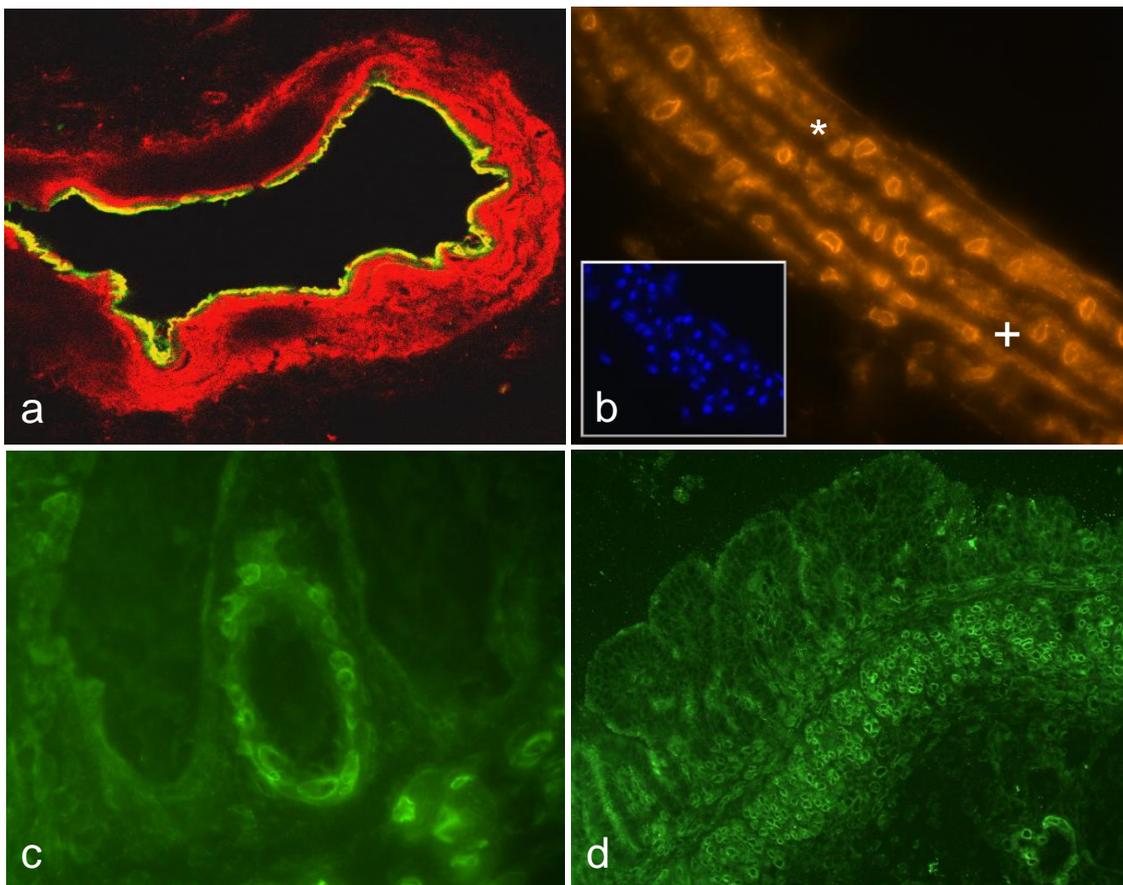


Abb 10 a) Doppelfärbung einer Arterie mit P30 und Recla1 **b)** P30 in der Arteria carotis der Ratte (kl. Bild: DAPI Markierung der Zellkerne) **c)** Arterie eines Mäuseembryos 400 fach vergrößert **d)** P30 Reaktion in embryonalem Darm der Maus

4.1.3.2 Verdauungstrakt

Das Vorkommen von P30 im Verdauungstrakt wurde am Beispiel des Dün- und Dickdarmes des Mäuseembryos untersucht.

Bei Betrachtung von embryonalen Präparaten des Mäusedarmes wurde P30 nur in der Lamina muscularis mucosae, sowie in der Tunica muscularis nachgewiesen. Bei beiden Schichten handelt es sich um glatte Muskulatur. Während der Embryonalentwicklung der Maus, hier am Beispiel des Tag 18, findet man am sich entwickelnden Mäusedarm eine positive Reaktion an der Zellkernmembran der Myocyten (Abb. 10d). Bindegewebe und Drüsen bleiben reaktionslos.

4.2 Peripheres Nervensystem

4.2.1 Peripherer Nerv

Die Axone der sensiblen Ganglienzellen beginnen am Soma (Zellkörper) der Nervenzelle und verlaufen in dicht aneinander liegenden Faserbündeln. In Abbildung 12 ist der N. ischiadicus einer Ratte nach Anfärbung des P30 Antigens als Beispiel für einen peripheren Nerven dargestellt. Im Bild 12a handelt es sich um einen Längsschnitt und in Bild b um einen Querschnitt eines peripheren Nerven. Die Axone weisen das Protein 30 in granulärer Form im Axoplasma jeder einzelnen Zelle auf. Die Schwann'schen Zellen der Myelinscheide sind in der Immunreaktion areaktiv. Im Querschnittsbild des Nervenstranges finden sich Axone verschiedener Querschnitte mit jeweils zentral erkennbarer Reaktion mit P30 im Axoplasma (Pfeil).

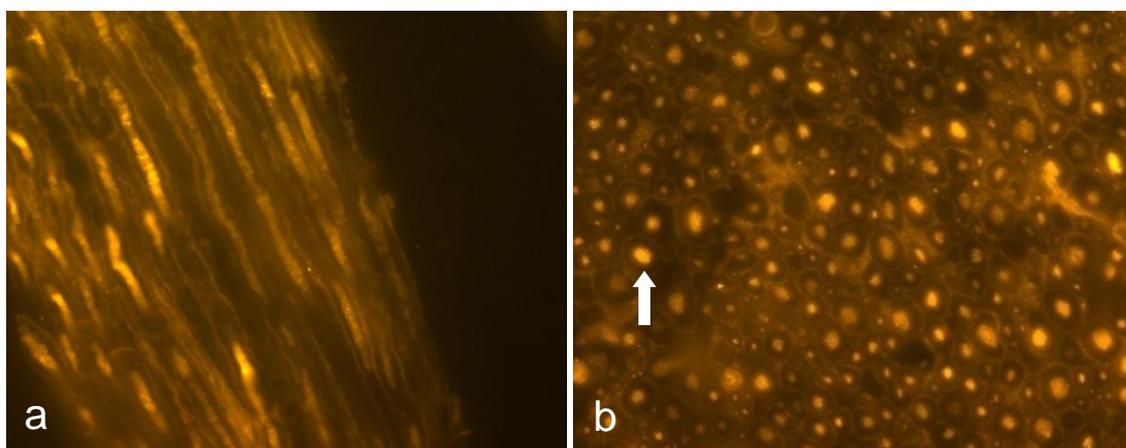


Abb 12 a) peripherer Nerv längs geschnitten, 400 fache Vergrößerung **b)** P30 Reaktion im Querschnitt eines Nerven in 630 facher Vergrößerung

4.2.2 Ganglion trigeminale

Im Ganglion trigeminale liegen die Perikaryen des sensiblen Anteils des V. Hirnnerven. Es entspricht somit in seiner topographischen Lage, sowie der Histologie und Qualität den sensiblen Rückenmarksganglien. Wie Immunreaktionen mit dem Antikörper gegen Protein 30 zeigen (Abb. 11 a, b), ist das Protein in den Perikarien sowohl des Ganglion trigeminale (V), als auch der Spinalganglien nachzuweisen. Die Reaktion ist auf die einzelnen, pseudounipolaren Ganglienzellen beschränkt. Eine Kernmarkierung mit DAPI (ohne Abbildung) macht deutlich, dass die Zellkerne keine Reaktion im Karyoplasma aufweisen, jedoch ist ein deutlicher Fokus im Bereich der Kernmembran zu erkennen (Pfeil). In diesem Bereich ist das ER lokalisiert. Satellitenzellen, welche um die Nervenzelle angeordnet sind, sind nicht reaktiv.

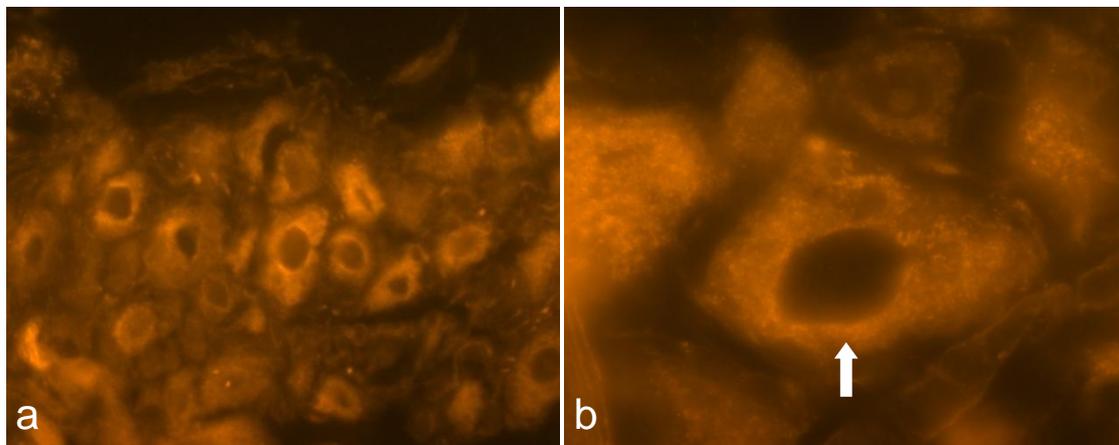


Abb 11 a) P30 Reaktion im Rückenmarksganglion der Ratte, 400fache Vergrößerung **b)** einzelne Ganglienzelle in 1000 facher Vergrößerung (Ganglion trigeminale)

4.2.3 Ependym und Plexus choroideus

Lokalisationsstudien im ZNS umfassten auch die Analyse des Plexus choroideus, sowie des Ependyms. Der Plexus choroideus ist ein speziell geformtes arteriovenöses Gefäßkonvolut in den Hirnventrikeln, das für die Produktion von Liquor verantwortlich ist. Er wird von spezialisierten Ependymzellen, die auch den gesamten restlichen Liquorraum ausgekleiden, bedeckt. Ependymzellen gehören zur Gruppe der Gliazellen, die in direktem Kontakt mit dem Liquorraum stehen. Es handelt sich um kubisch bis hochprismatische Zellen, die apikal Mikrovilli und Kinozilien aufweisen und eine wichtige Rolle in der Phagozytose und dem Stofftransport spielen (Sterba et al. 1967). Auf Frontalschnitten des Großhirns im Bereich des Seitenventrikels (Stern in Abb. 16a) lässt sich eine starke Reaktion des Antikörpers gegen P30 in den Ependymozyten, die den Ventrikel auskleiden erkennen. Die Reaktion ist auf einzelne Zellen und hier auf den apikalen Cytoplasmabereich beschränkt (Abb 16b Pfeil). In diesem Bereich befinden sich die Kinocilien mit ihren Basalkörperchen, die eine Art Verankerung der Mikrotubuli innerhalb der jeweiligen Zelle darstellen. Bei den nicht reaktiven Zellen, die regelmäßig zwischen den Kinozilien tragenden gelegen sind, handelt es sich um die Tanyzyten, die weder über Mikrovilli, noch über Kinozilien verfügen.

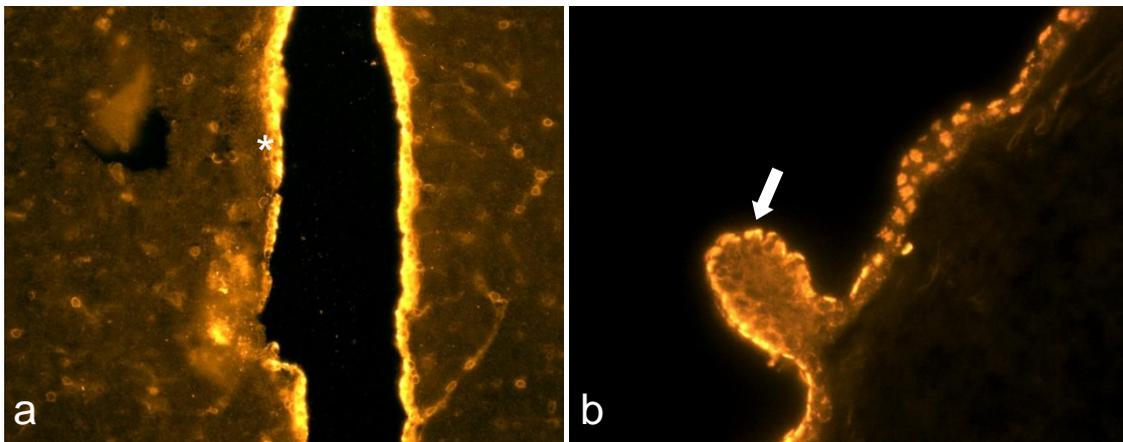


Abb. 16 a) Ependym eines Großhirnventrikels beim Meerschweinchen (200fache Vergrößerung) **b)** Kleinhirnependym der Ratte (400fach vergrößert), Ependymocyt siehe Pfeil

Die Ependymzellen gehen in das Plexusepithel über, welches das Gefäßkonvolut des Plexus choroideus umgibt und ihn vom Liquorraum trennt. Die Kapillargefäße des Plexus weisen ebenfalls eine deutliche Reaktion des Antikörpers gegen P30 im Endothel auf (ohne Abbildung). Die Ependymzellen des Plexus zeigen im Gegensatz zu den Zellen der Ventrikelauskleidung keine höhere Konzentration des Proteins im apikalen Bereich, wobei in einzelnen Zellen im gesamten Cytoplasma P30 enthalten ist.

4.3 Auge

4.3.1 Retina

Die Netzhaut als rezeptiver Bereich des Auges lässt sich in zehn einzelne Schichten mit jeweils unterschiedlichen Zelltypen und Funktionen unterteilen. Von Zentral werden folgende Schichten unterschieden. Innere Grenzmembran (Membrana limitans interna), Nervenfaserschicht (Stratum neurofibrarum), Ganglienzellschicht (Stratum ganglionare fasciculi optici), Innere plexiforme Schicht (Stratum plexiforme internum), Innere Körnerschicht (Stratum nucleare internum), Äußere plexiforme Schicht (Stratum plexiforme externum), Äußere Körnerschicht (Stratum nucleare externum), Äußere Grenzmembran (Membrana limitans externa), Photorezeptorenschicht (Stratum neuroepitheliale), Pigmentepithelschicht (Stratum pigmentosum retinae) und peripher die Lamina choroidea, die die versorgenden Blutgefäße beinhaltet. In den verschiedenen Schichten der Retina ist eine große Anzahl an Zelltypen zu unterscheiden, die an dieser Stelle kurz erläutert werden sollen. Die Nervenfaserschicht beinhaltet die Fasern des 1. Neurons, durch welches die Informationen der Fotorezeptoren verschaltet werden, die Ganglien des Nervus opticus an sich befinden sich in der Ganglienzellschicht. Der Immunnachweis des P30 im Auge der Maus zeigt eine deutliche Reaktion in den verschiedenen Schichten der Retina. In Abbildung 13a ist die Lokalisation von P30 in den einzelnen Ganglienzellen sichtbar (Pfeil). Von dort werden die Signale über den Neuronenplexus der inneren plexiformen Schicht zu den optischen Zentren des Gehirnes weitergeleitet, während sie unter Mitwirkung von Amakrinzellen moduliert werden.

In der inneren Körnerschicht befinden sich die Zellkörper von Bipolar-, Amakrin- und Horizontalzellen. Innerhalb der äußeren plexiformen Schicht werden die Dendriten der Bipolar- und Horizontalzellen mit den Photorezeptoren verschaltet, während in der Übergangszone zur nächsten Schicht das tiefe Netz der retinalen Versorgungskapillaren liegt. In der äußeren Körnerschicht befinden sich die Zellkörper der Photorezeptoren, deren Außensegmente bis hin zum Pigmentepithel reichen und mit Ausläufern von Müller-Zellen eine direkte Verbindung eingehen. Neben den Ganglienzellen findet sich auch eine Immunreaktion des P30 in den Gefäßen der Choroidea. Der Stern in Abbildung 13a kennzeichnet die Reaktion mit P30 in den Blutgefäßen. Die Doppelfärbung mit einem 2. Antikörper gegen Reca1 (Endothelzellmarker) in Abbildung 13c zeigt die Lokalisation des gesuchten Proteins im Bereich des Endothels der versorgenden Gefäße.

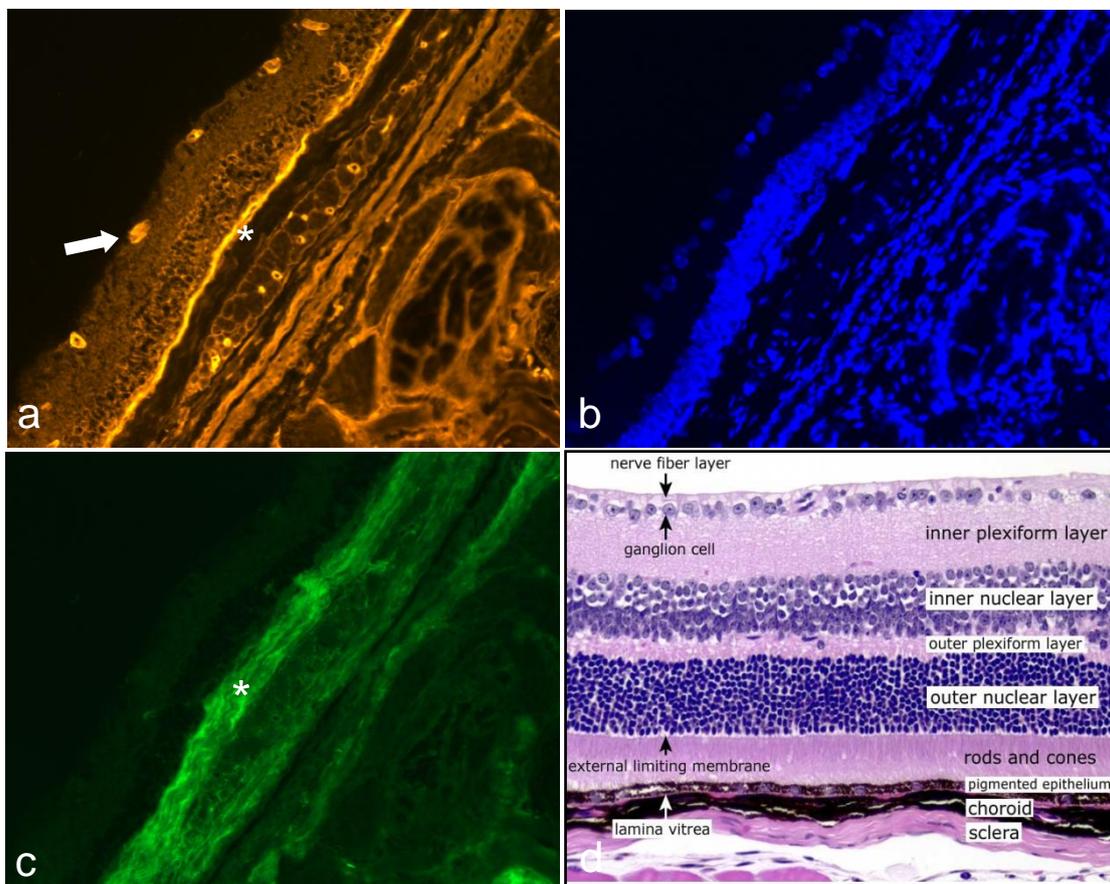


Abb 13 Retina der Maus 200 fach vergrößert **a)** P30 Reaktion **b)** Kernfärbung mit DAPI **c)** Endothelfärbung mit Reca1 **d)** Schichtenbau der Retina (Quelle: Deltagen Inc.)

4.3.2 Cornea

Die Hornhaut des Auges dient einerseits als Schutz, beeinflusst aber andererseits als Teil des optischen Apparates die Brechung. Sie besteht aus einem vorderen und hinteren Epithel, sowie der Bowman- und Descemet-Membran und der Substantia propria, die das corneale Gerüst bildet. Das vordere Hornhautepithel, ein unverhorntes Plattenepithel, ist fünf- bis sechsschichtig und besteht aus drei verschiedenen Zelltypen, den Basal-, Flügel- und Schuppenzellen. Beim hinteren Hornhautepithel handelt es sich um Endothel, das als einschichtige, lückenlose Zellschicht die Hinterfläche der Cornea bedeckt. Es liegt einer dicken, spezifisch zusammengesetzten Basalmembran (Descemet-Membran) auf. Dieses Endothel dient mit seinem Gehalt an Aquaporinen und tight junctions als Diffusionsbarriere und ist somit verantwortlich für die Transparenz der Hornhaut. Die stoffwechselaktiven Endothelzellen besitzen große Kerne und eine große Anzahl an zytoplasmatischen Organellen wie Mitochondrien, endoplasmatischem Retikulum, freien Ribosomen und Golgi-Apparaten. Der Immunnachweis des Protein 30 in der Cornea einer adulten Maus ist positiv. Wie im Schnitt (Abb. 14a) zu sehen ist, reagiert der Antikörper gegen Protein 30 mit beiden Epithelien der Cornea. Im vorderen Hornhautepithel wird P30 in allen drei Zelltypen exprimiert und ist dort im Zytoplasma lokalisiert, wobei sich ein Fokus im Bereich der Kernmembranen zeigt. Im Übergang zwischen vorderem Hornhautepithel und dem Stroma der Cornea erkennt man die areaktive Bowman-Membran. Auch die breite Substantia propria (Stroma), welche aus kollagenem Bindegewebe und Corneofibrozyten besteht, zeigt größtenteils keine Reaktion. Dort findet sich P30 lediglich im Bereich der Fibrozytenzellkerne. Die darunterliegende Descemet-Membran weist wie die Bowman Membran kein P30 Antigen auf. Das hintere einschichtige Cornealepithel zeigt nur eine geringe Fluoreszenz, die ebenfalls im Zytoplasma der Epithelzellen lokalisiert ist (Pfeil). Die Kerne sind P30 negativ.

4.3.3 Augenmuskulatur

Abbildung 14b zeigt das Vorkommen von P30 in der äußeren Augenmuskulatur (+), wobei die Reaktion eine identische Verteilung in den Muskelfasern aufweist, wie bereits für Skelettmuskulatur beschrieben wurde. Protein 30 ist in den Kernmembranen und dem Sarkolemm lokalisiert.

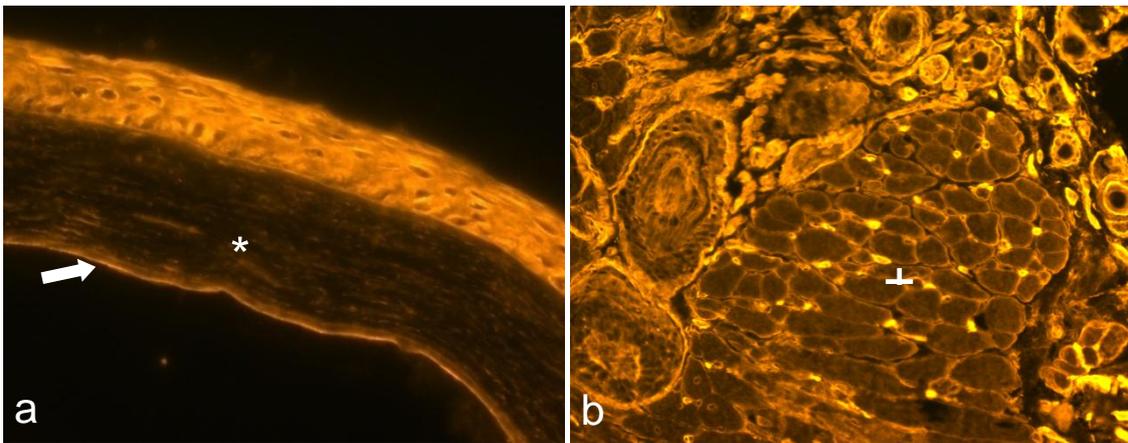


Abb. 14 a) P30 Reaktion in der Cornea einer Maus, 200 fache Vergrößerung **b)** Anschnitt von Augenmuskel (+)

4.4 Haut

Von besonderem Interesse war es, das Vorkommen des Proteins in der Haut zu untersuchen, da es sich bei der Haut um das größte und schwerste Organ des Körpers handelt. Die Haut dient sowohl der Abgrenzung, als auch dem Schutz des Organismus vor zahlreichen Umwelteinflüssen. Zusätzlich übernimmt sie wichtige Stoffwechselfunktionen in der Homöostase des Organismus. Die äußere Haut (Cutis) gliedert sich in 3 Hauptschichten: Oberhaut (Epidermis), Lederhaut (Dermis oder Corium) und die Unterhaut (Subcutis). Die Epidermis wird wiederum in 5 Schichten unterteilt: Hornschicht (Stratum corneum), Glanzschicht (Stratum lucidum), Körnerschicht (Stratum granulosum), Stachelzellschicht (Stratum spinosum) und Basalschicht (Stratum basale).

In dieser Schicht findet die Proliferation statt, die für die ständige Regeneration der Epidermis sorgt, und deshalb über eine gute Versorgung verfügt. Es handelt sich dabei um ein mehrschichtig verhornendes Plattenepithel, das auf Grund seiner unterschiedlichen Funktionen aus verschiedenen spezialisierten Zellen besteht. Etwa 90 Prozent stellen die Keratinocyten dar, die die Barriere für mechanische und chemische Noxen bilden. Zusätzlich finden sich Melanocyten, die den physikalischen Schutz vor UV Strahlung ermöglichen. Langerhans Zellen wiederum sind in die Abwehr von Antigenen involviert und Merkel Zellen, die als Rezeptoren fungieren. Die Dermis, unterteilt in Stratum papillare und reticulare, besteht vorwiegend aus Bindegewebsfasern und dient der Ernährung und Verankerung der Epidermis, außerdem verlaufen hier die Versorgungsstrukturen wie Nervenfasern und Blutgefäße. Das fein kapillarisierte Blutgefäßsystem versorgt hier die Grenzzone zur Epidermis. Über die Subcutis erreichen die größeren Blutgefäße und Nerven die oberen Hautschichten. Sie besteht aus Fettzellen und lockerem Bindegewebe. In Schnittpräparaten humaner Haut konnte das Protein P30 in der Epidermis lokalisiert werden. In der Dermis finden sich einzelne P30 haltige Zellkerne (Abb. 15a, b Pfeil), die unter morphologischen Gesichtspunkten und durch Doppelmarkierung mit DAPI als Zellkerne der Fibrozyten identifiziert werden konnten. Die Subcutis weist P30 innerhalb seiner versorgenden Blutgefäße auf, sowie analog zur Dermis, innerhalb der zwischen den Adipocyten gelegenen Fibrocytenzellkerne. Eine nähere Betrachtung der Epidermis zeigte, dass das Protein in allen Schichten und deren verschiedenen Zellen (Melanocyten, Merkel- und Langerhanszellen) zu finden ist, allerdings unterscheiden sich die Zellen in der Konzentration von P30 voneinander. Einzelne Zellen des Stratum basale weisen stärkere Reaktionen in dem zur Dermis hin orientierten Zellkompartiment auf (siehe Stern). In ebenfalls untersuchten Haaren zeigt sich P30 in allen Schichten der Haarwurzel, wobei die Konzentration von P30 eine unterschiedliche Ausprägung zeigt. Ein deutlicher Focus ist im Bereich der Huxley Schicht der inneren Wurzelscheide zu erkennen (siehe Pfeil in Abb. 15d). Die Zellen der Haarpapille und des Cortex zeigen deutlich die Lokalisation von P30 im Cytoplasma, während die Zellkerne reaktionslos verbleiben. In parallel untersuchten embryonalen Hautpräparaten wurde P30 in identischen Bereichen wie in adulter Haut gefunden (Abb. 15c).

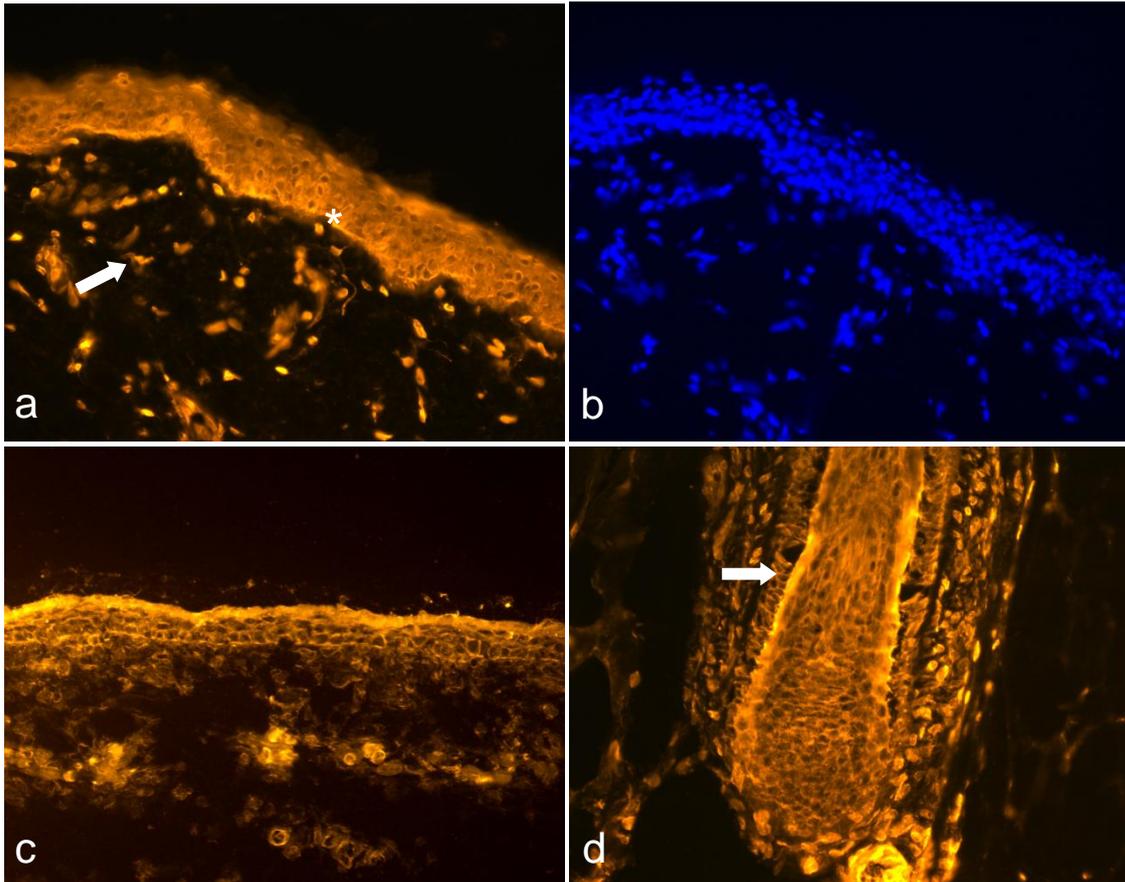


Abb. 15 a) P30 Reaktion in humaner Haut **b)** DAPI Kernfärbung **c)** embryonale Haut der Ratte **d)** humaner Haarfollikel (alle Abbildungen in 200 facher Vergrößerung)

4.5 Respiratorisches Epithel

Das Vorkommen des Protein 30 in Atmungsorganen wurde an Schnittpräparaten von Trachea und Lunge mit ihren luftleitenden (Bronchialbaum) und gasaustauschenden Anteilen (Alveolen) untersucht. Die luftführenden Hohlräume werden von respiratorischem Epithel ausgekleidet, welches aus mehrreihig hochprismatischem, kinzilientragendem Epithel und intermittierend angeordneten Becherzellen besteht. Die Becherzellen stellen etwa 15-20% des Epithels. Die kinzilientragenden Zellen stellen den Hauptteil der Zellen. Ihre Kinozilien am apikalen Zellpol sind bewegliche Ausstülpungen der Zellmembran, die etwa 7-10 μm lang sind und einen Durchmesser von etwa 0,3 μm haben. Ihre Motilität wird durch Mikrotubuli gewährleistet. Der Zilienschlag erfolgt in Richtung Rachen zum Transport des Schleims mit anhaftenden Fremdkörpern und Mikroorganismen.

Unterhalb der Tunica mucosa befindet sich die Tunica muskularis, die den gesamten Bronchus umschließt. Distalwärts verringert sich die Dicke der Muskulatur und die Anzahl elastischer Fasern nimmt zu. Wie in Abbildung 17 gezeigt, reagiert der Antikörper gegen P30 mit Strukturen des respiratorischen Epithels, nämlich den kinzilien tragenden Zellen, während Becherzellen als nicht reaktive Lücken erscheinen (Pfeil). Analog zu den Zellen des Ependyms findet sich P30 konzentriert in den apikalen Zellkompartimenten der kinzilien tragenden Zellen. In der Tunica muscularis findet sich das Protein in den Zellen der glatten Muskulatur, wie die Doppelimmunreaktion mit dem Antikörper gegen smooth muscle actin (SMA), einem spezifischen Antigen glatter Muskelzellen, zeigt. In den Abbildungen 17 a) und b) ist eine Doppellokalisierung dieser beiden Antikörper in glatten Muskelzellen zu erkennen (Stern).

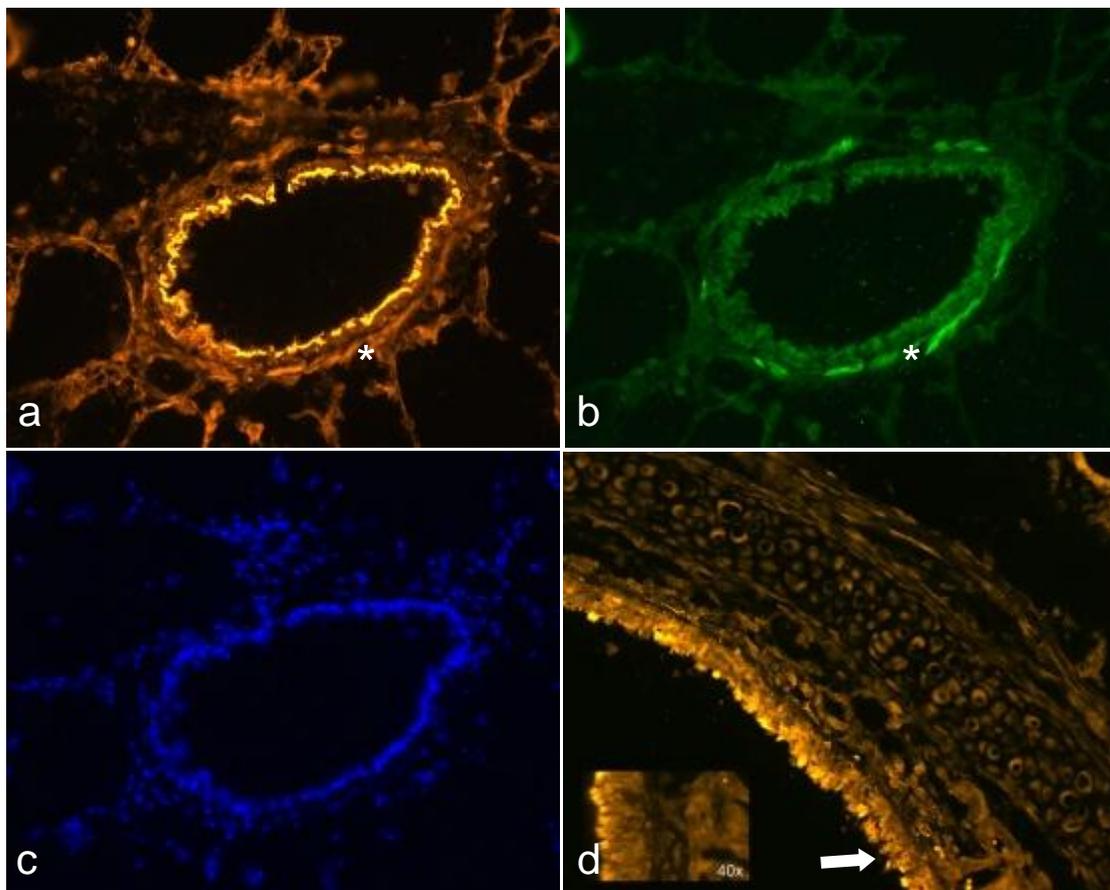


Abb. 17 a) P30 Reaktion im Bronchus der Ratte(200fach) **b)** Färbung der glatten Muskulatur mit SMA (smooth muscle aktin) **c)** DAPI Kernfärbung **d)** Flimmerepithel in der Rattentrachea

4.6 Niere

4.6.1 Glomerulum

Das Protein 30 findet sich in der Niere nur in den Glomerula, welche sich im Cortex renalis befinden (Abb. 18a). Das Tubulussystem ist nicht reaktiv. Die Glomerula der Niere haben die Funktion, ein Ultrafiltrat des Blutes zu erzeugen und somit den Primärharn zu produzieren, der im Verlauf des Tubulussystemes, bis hin zum Nierenbecken, konzentriert und durch Sekretion und Resorption verändert wird. Die Reaktion mit dem markierten Protein 30 ist in den Glomerula am Gefäßpol in der Arteriola glomerularis afferens zu erkennen, die sich aus Verzweigungen der Arteria renalis bildet. P30 findet sich hier im Gefäßendothel des Vas afferens. (Stern in Abb. 18b). Im Inneren des Corpus renale erkennt man die positiv markierten Querschnitte der Kapillarschlingen (gelb), die das Gefäßkonvolut bilden, aus dem der Primärharn abfiltriert wird. Die Podozyten sind diesem Gefäßknäuel aufgelagert und bilden das innere Blatt der Bowman-Kapsel, welches P30 reaktiv ist. Eine Reaktion mit P30 wurde außerdem im gesamten äußeren Blatt der Bowman-Kapsel gefunden (Abb. 18a,b Pfeil), welches aus einschichtigem Plattenepithel aufgebaut ist. Das parietale Blatt der Bowman-Kapsel umschließt das gesamte Nierenkörperchen und bildet mit dem visceralen Blatt ein schmales Lumen, in das der Harn als Ultrafiltrat des Blutes abfiltriert wird.

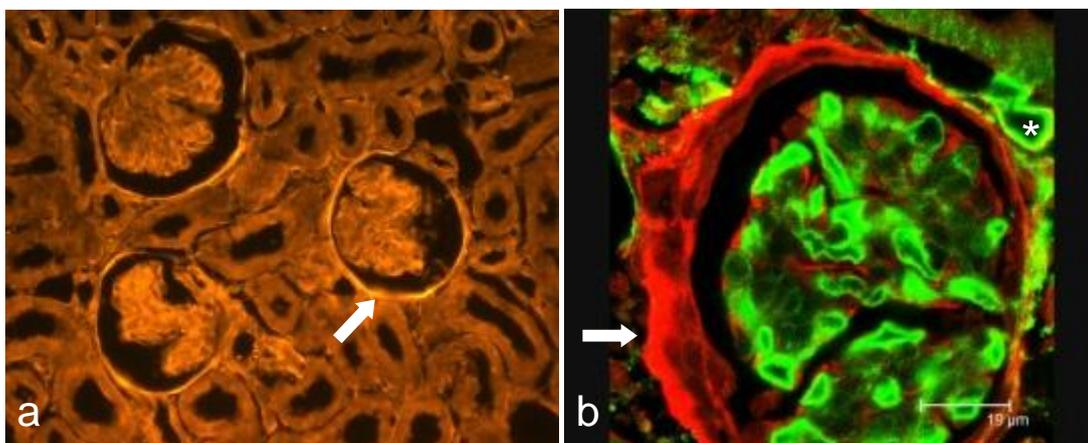


Abb. 18 a) P30 Reaktion in Glomerula der Ratte 200fache Vergrößerung **b)** Doppelfärbung eines Glomerulum der Ratte mit P30 (rot) und Recla1 (grün), Überlagerung (gelb), CLSM Mikroskop

4.7 Glandula suprarenalis

Die paarigen Nebennieren (Glandulae suprarenales) bestehen aus zwei sowohl entwicklungsgeschichtlich als auch funktionell verschiedenen Bereichen, dem Mark und der Rinde. Das Mark ist ein sogenanntes Paraganglion des sympathischen Nervensystems. Das Parenchym des Nebennierenmarks besteht aus einem epithelartig angeordneten Gewebe, welches der Neuralleiste entstammt (ektodermale Herkunft). Die Nebennierenrinde produziert in drei verschiedenen Zonen, Zona glomerulosa, Zona fasciculata und Zona reticularis, Steroidhormone. Das Protein P30 lässt sich im Bereich der Organkapsel, in der Rinde, sowie im Nebennierenmark nachweisen (Abb. 19). Dabei handelt es sich um die Kapillaren, bzw. das Endothel des stark ausgeprägten Gefäßsystems. In der Zona glomerulosa reagieren die Endothelzellen der Gefäße/Sinusoide (Glomeruli) mit dem Antikörper gegen das Protein 30 (Stern in Abb. 19a). Reaktionslos bleiben die in Nestern zusammen gelagerten Epithelzellen. In der Zona fasciculata, deren Gefäße zwischen den Zellsäulen geradlinig Richtung Mark verlaufen, weist wiederum deren Endothel eine Reaktion mit dem gesuchten Protein auf (Abb. 19a Kreuz). Die Reaktion setzt sich in den sinusartigen Gefäßen der Zona reticularis fort. Im Nebennierenmark finden sich drei verschiedene Typen chromaffiner Zellen, die die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin bilden und in geringer Zahl sogenannte „small granule chromaffin cells (SGC)“, sowie Ganglienzellen. Abbildung 19c zeigt die Reaktion des P30 Antikörpers im Übergang der Nebennierenrinde zum Mark. Das Protein 30 lässt sich den in Gruppen liegenden chromaffinen Zellen, sowie den großen und mit glatter Muskulatur ausgestatteten Sinusvenen zuordnen. Innerhalb der chromaffinen Zellen findet man P30 im Bereich der Zellkernmembran, sowie im Cytoplasma (Pfeil). Das Karyoplasma bleibt reaktionslos. Eingebettet in die chromaffinen Zellverbände finden sich die Ganglienzellen, deren Reaktivität mit P30 die gleiche Ausprägung aufweist, wie sie bereits bei den Zellen des Ganglion trigeminale beobachtet wurde (Punkt in Abb. 19d) Im Cytoplasma erkennt man einzelne, granuläre Elemente, die P30 positiv sind, der Zellkern wiederum bleibt reaktionslos. Die Aufgabe dieser Markganglienzellen ist es, efferente sympathische Signale umzuschalten und die Sekretion der Katecholamine zu stimulieren.

Die von den Ganglienzellen ausgehenden Neurone verlaufen in Faserbündeln innerhalb des Nebennierenmarkes in direkter Nachbarschaft zu den chromaffinen Zellen und Sinusoiden, was die starke Reaktion mit P30 in diesen Bereichen erklärt (siehe # in Abb. 19d). Analog zu anderen Organen reagiert auch das Endothel der großen Sinusgefäße.

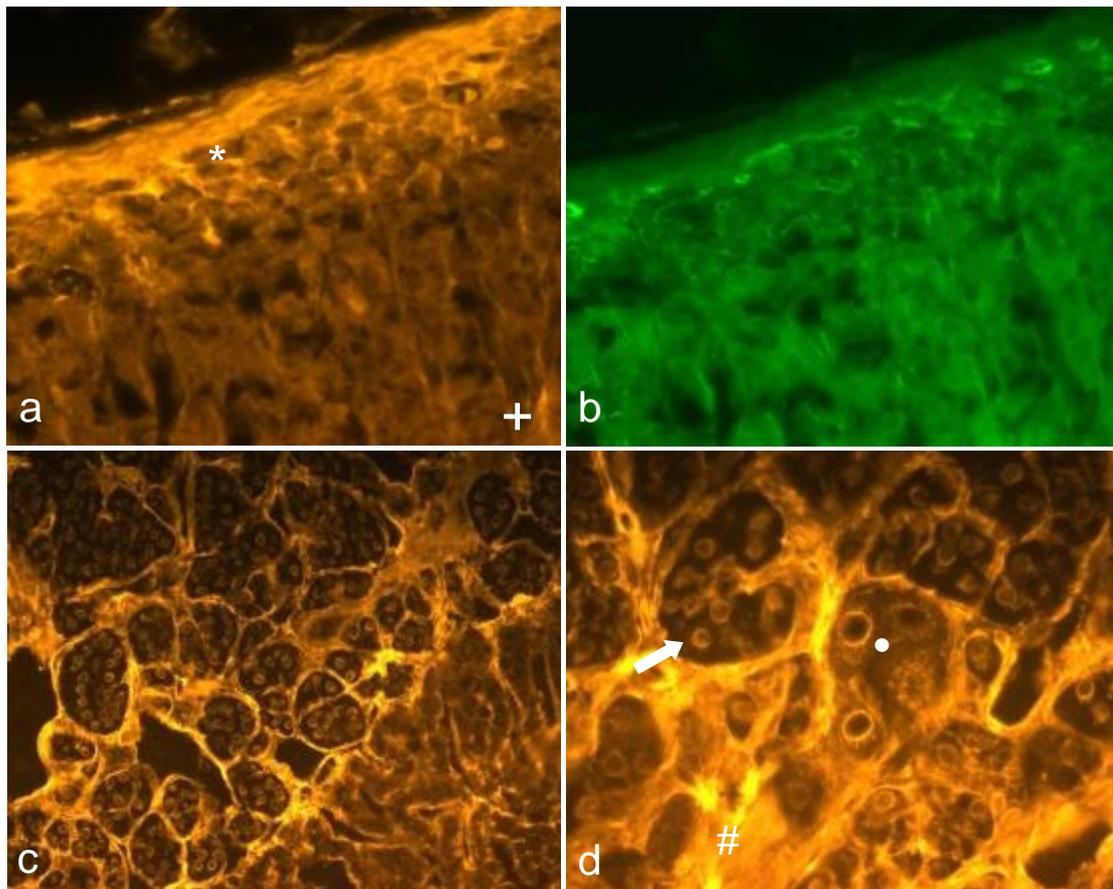


Abb. 19 a) P30 Reaktion der Nebennierenrinde der Ratte (400fach) **b)** Endothelreaktion mit ReCa1 **c)** Nebennierenmark, 200fach vergrößert **d)** Mark mit chromaffinen Zellen und Ganglienzellen (400fach)

4.8 Weibliche Geschlechtsorgane

4.8.1 Ovar

Im aktiven Ovar reifen kontinuierlich Eizellen heran, die von Follikelepithelzellen umgeben sind. Zusätzlich werden weibliche Geschlechtshormone produziert und sezerniert. Diese Aufgaben bedingen einen komplexen Aufbau: Tunica serosa (Keimepithel), Tunica albuginea, als bindegewebige Kapsel, die Rinde und das Mark. Das Stroma der Rinde besteht aus spezifischem spinozellulärem Bindegewebe, während das Mark lockeres Bindegewebe enthält. Die Follikelreifung findet in der Rinde statt. Es differenzieren sich Bindegewebszellen zu Thekazellen und organisieren sich um die die Eizelle umgebenden Follikelepithelzellen, deren Zahl im Laufe der Reifung zunimmt. Ein Nachweis des P30 im Ovar läßt sich erst im Stadium des Tertiärfollikels erbringen, während die Serosa permanent reaktiv ist. In früheren Stadien wird das gesuchte Protein nicht exprimiert. Der Tertiärfollikel unterscheidet sich von den früheren Reifungsstadien durch das Vorhandensein des Cumulus oophorus, welcher aus Granulosazellen besteht, sowie dem Liquor gefüllten Antrum folliculi, umgeben von der Theka interna und externa. Mit Beginn des Tertiärfollikels kann Protein 30 im Cytoplasma im Zellmembranbereich der Oozyte nachgewiesen werden. Der Zellkern (Abb. 20a Pfeil), sowie die Zona pellucida zeigen keine Reaktion. Das spinozelluläre Bindegewebe der Rindenzone, in der sich die verschiedenen Follikelstadien befinden, weist einzelne Zellen auf, die eine positive Reaktion mit dem Antikörper gegen P30 zeigen (ohne Abbildung). Bei diesen Zellen handelt es sich um die Fibrocyten des umgebenden bindegewebigen Stromas. Eine starke Reaktion des Antikörpers findet sich in der Tunica serosa, dem Teil des Peritoneums, der das Ovar zum Bauchraum hin begrenzt (Abb. 20a Stern). Die hier kubischen Zellen bilden den einschichtigen Teil des Mesothels. P30 liegt hier im Cytoplasma vor, nicht aber im Kern (nicht gezeigt). Die Zellen der Serosa sind sekretorisch und resorptiv aktiv.

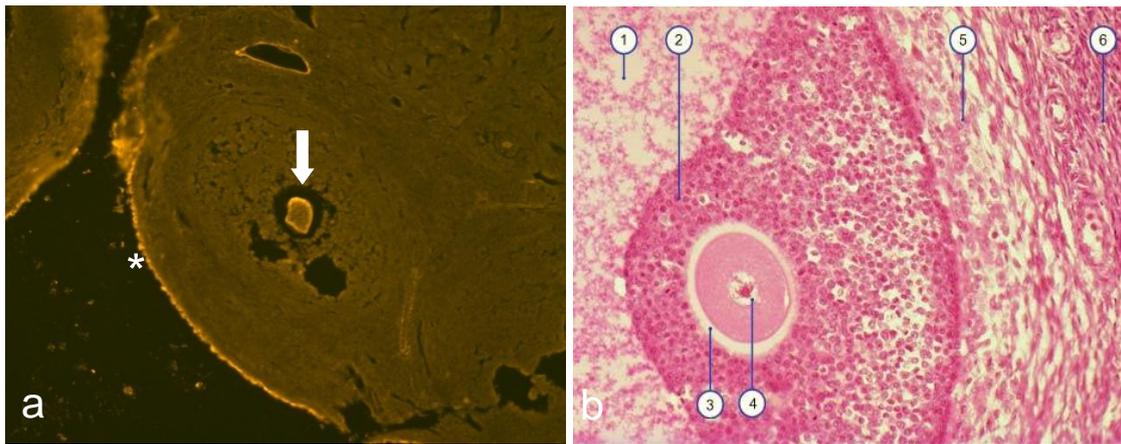


Abb.20 a) P30 Reaktion des Tertiärfollikels im Ovar der Ratte in 100 facher Vergrößerung (Pfeil) **b)** Cumulus Oophorus eines Tertiärfollikels 1) Antrum folliculi 2) Granulosazellen 3) Zona pellucida 4) Zellkern

4.8.2 Tuba uterina

Die Tuba uterina stellt die Verbindung vom Cavum uteri zum Ovar her. Nach der Befruchtung wird die Zygote durch den Zilienschlag der Epithelzellen mit dem Sekretstrom und peristaltischer Kontraktionen der Tubenmuskulatur zum Uterus transportiert. Die Tunica mucosa besteht aus einem einschichtigen kubisch bis hochprismatischem Epithel, das zyklusabhängig mehr oder weniger Kinozilien tragende Zellen aufweist. Zwischen diesen Flimmerzellen liegen Drüsenzellen. Die Lamina propria besteht aus lockerem Bindegewebe mit zahlreichen glatten Muskelzellen und vielen Blutgefäßen. Die Serosa bedeckt die Tube nach außen. Das Protein 30 kann nur in den Kinozilien tragenden Zellen des Flimmerepithels nachgewiesen werden, und hier nur im apikalen Zellpol (Abb 21d Pfeil), sowie in der die Tube umgebenden Tunica serosa. Die Drüsenzellen enthalten kein P30. Eine geringe Reaktion des Antikörpers findet sich auch in der angrenzenden Lamina propria in den Fibrocyten, sowie in der Serosa des visveralen peritonealen Blattes und den versorgenden Blutgefäßen.

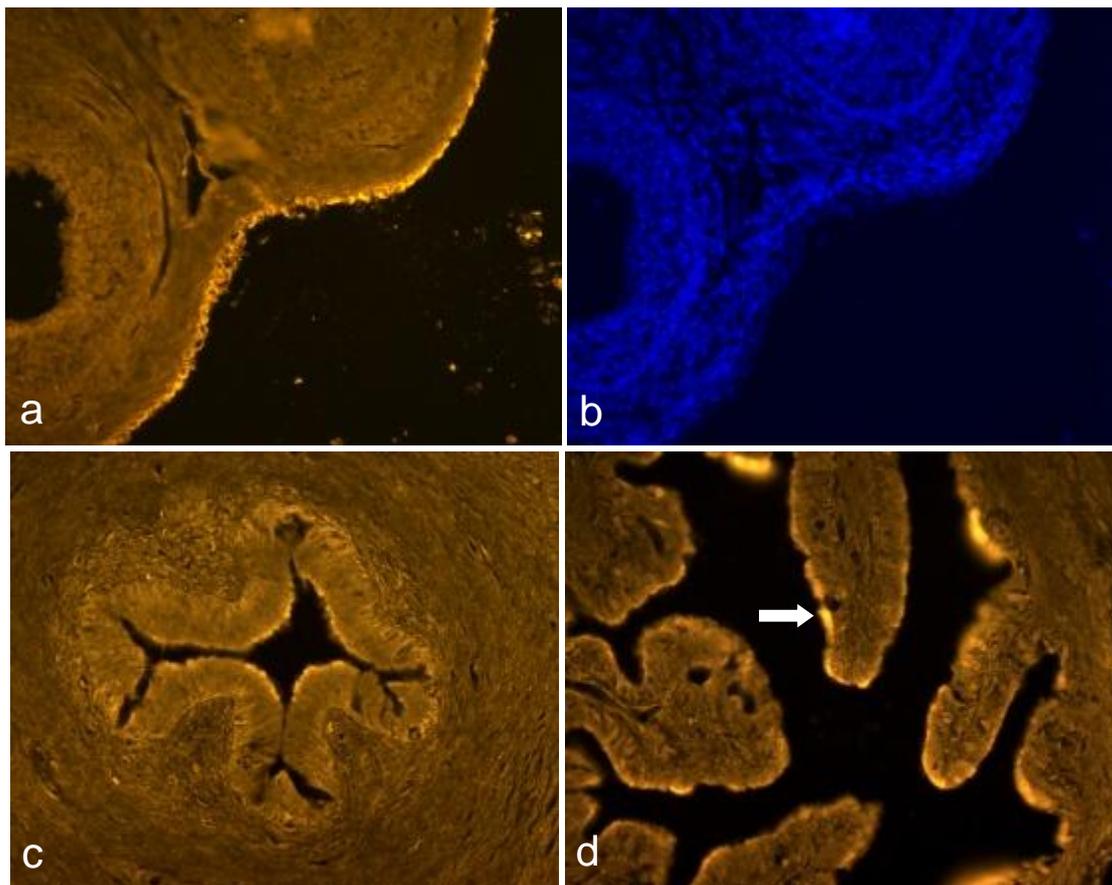


Abb. 21 a) P30 Reaktion der ovariellen Serosa, 200 fach vergrößert **b)** DAPI Kernfärbung **c)** Querschnitt des Eileiters der Ratte (200fach) **d)** P30 im Flimmerepithel des Eileiters (400fach)

4.8.3 Mamma lactans

Die weibliche Brustdrüse besteht aus 15-20 verzweigten tubulo-alveolären Einzeldrüsen, organisiert in kleineren Läppchen und Lappen. Die Einzeldrüsen werden von einem gemeinsamen Bindegewebsstroma umschlossen und sezernieren nach Stimulation in gemeinsame Ausführungsgänge. Die Schwangerschaft und deren hormonale Veränderungen bedingen eine starke Proliferation des epithelialen, apokrinen Brustdrüsengewebes, wodurch die Gesamtdrüse an Volumen zunimmt. Zur Untersuchung des Vorkommens von Protein 30 in laktierender Mamma wurden Schnitte von Brustgewebe einer seit 3 Tagen entbundenen/laktierenden Ratte verwendet.

Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, ist das gesuchte Protein 30 in den Alveolen/Endstücken der laktierenden Drüse zu finden. Das umgebende Bindegewebe zeigt eine Reaktion innerhalb der Fibrozyten und das noch verbliebene Fettgewebe ist immunreaktiv negativ. Die höhere Auflösung zeigt zwischen den Epithelzellen des Endstücks und der Basalzellschicht der Drüsen eine Reaktion mit P30 (Pfeil). An dieser Stelle sind Myoepithelzellen angeordnet, welche durch Kontraktion die Entleerung des fetthaltigen Sekretes fördern. Die Dicke des Drüsenepithels ist abhängig von seinem Funktionszustand. Im vorliegenden Präparat ist das Epithel größtenteils stark abgeflacht und zeigt nur eine geringe Reaktion mit P30, da sich die Abschnitte der im Präparat untersuchten Brustdrüse zum Zeitpunkt der Entnahme in der Erschöpfungsphase befunden haben. Protein 30 findet sich außerdem in den Endothelzellen der Kapillaren des Drüsenläppchens (Stern), wobei die Reaktion cytoplasmatisch lokalisiert ist. Zwischen den einzelnen Drüsenläppchen und im Bindegewebe gelegene versorgende Blutgefäße sind ebenfalls reaktiv.

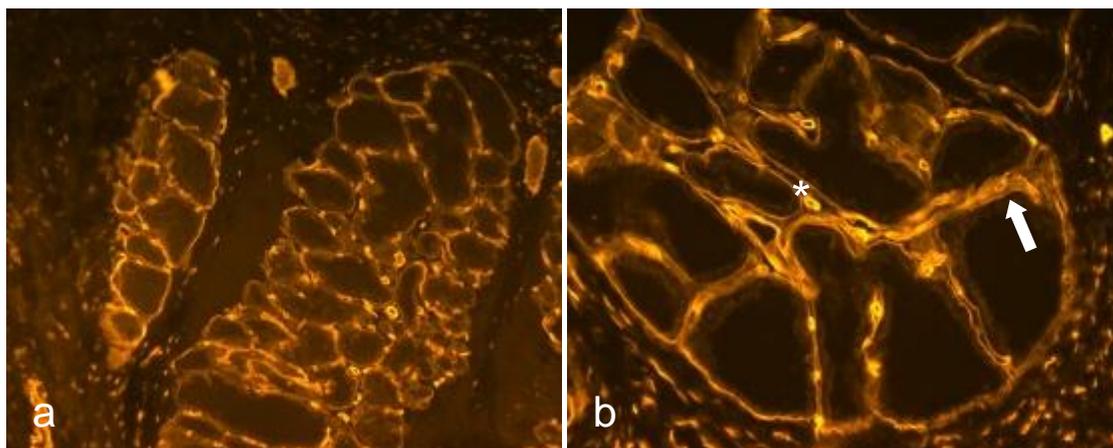


Abb. 22 a) P30 im Drüsenlappen einer laktierenden Mamma der Ratte (100 fach) b) Drüsenläppchen, (200 fach)

4.8.4 Placenta und Uterus

Besonders interessant war die Untersuchung des P30 in der Placenta, da der Mutterkuchen (Placenta) sich aus dem fetalen Trophoblasten und einem Teil des dezidualisierten Endometriums entwickelt. Dies ermöglicht die Versorgung des Embryos mit Sauerstoff und Nährstoffen. Die Placenta steuert ihr eigenes Wachstum und bildet außerdem das Hormon humanes Choriongonadotropin (HCG). Die fetale Seite bildet die Chorionplatte, die mit dem einschichtigen Amnionepithel bedeckt ist. Im Gegensatz zur humanen Placenta verfügt die hier untersuchte Placenta der Maus nicht über Zotten, sondern über ein stark verzweigtes Labyrinthsystem. Dieses besteht aus zahlreichen Gefäßen, sowie aus mit maternalem Blut gefüllten Lakunen, die von einschichtigem Epithel bedeckt sind. Eine Reaktion mit P30 ist in der Placenta der Maus auf endothelialer Ebene zu finden. In Abbildung 23a sind Anschnitte sowohl von Arterien und Venen, als auch von placentaren Lakunen (Stern) zu erkennen. In allen Epithelien der Lakunen und Gefäße ließ sich das Protein nachweisen. Eine deutliche Reaktion mit dem markierten Protein zeigte sich im Zytoplasma der Zellen, die ein einschichtiges Epithel bilden und maßgeblich am Stoffaustausch zwischen Mutter und Fetus beteiligt sind. Das Stroma der Placenta, bestehend aus Mesoderm, weist eine Reaktion auf Ebene der Fibrocytenzellkerne auf, die das bindegewebige Stroma ausbilden (DAPI Färbung nicht gezeigt). Bei Abbildung 23d handelt es sich um einen Anschnitt des maternalen Teils der Placenta und angrenzendem Uterusgewebe. Hier finden sich gehäuft großlumige Gefäße. Im Endothel dieser großlumigen Gefäße ist eine starke Reaktion mit dem Antikörper gegen P30 zu erkennen (Pfeil). Weiterhin findet sich das P30 Antigen im Uterusmyometrium (Abb. c). Diese Reaktion ist wie auch in anderen muskulären Organen im Cytoplasma der Myocyten zu finden, sowie fokussiert im Bereich der Kernmembran. Das Karyoplasma bleibt auch hier reaktionslos.

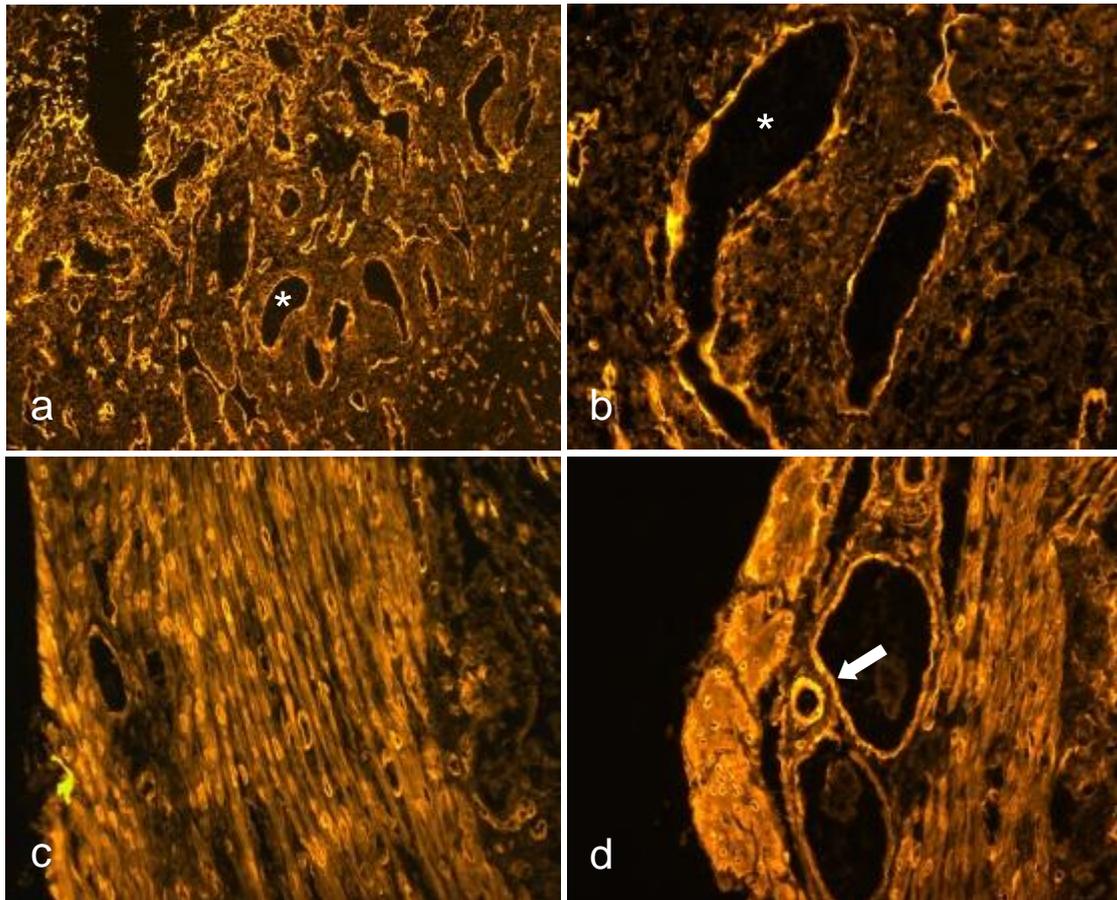


Abb. 23 a) P30 in Placenta der Maus (50 fach vergrößert) **b)** Placentalakunen (200fach) **c)** glatte Uterusmuskulatur der Maus (200fach) **d)** Versorgungsgefäße des Uterus

4.9 Männliche Geschlechtsorgane

4.9.1 Hoden

Der Hoden ist ein paariges Organ, welches sich zusammen mit dem Nebenhoden innerhalb des Scrotums befindet. Er wird von der Tunica albuginea, einer straffen Bindegewebskapsel umgeben. Von dieser Kapsel strahlen Bindegewebssepten in das Innere des Hodens ein und teilen ihn in ca. 300 Läppchen, die jeweils 1-4 Samenkanälchen (Tubuli seminiferi) beinhalten. Die Tubuli münden in das Rete testis und werden von Bindegewebe umgeben, in welchem sich die Leydig-Zwischenzellen befinden, die nach Stimulation durch das Hormon LH das Androgen Testosteron produzieren.

Innerhalb der Tubuli seminiferi sind die Sertoli-Zellen, die eine Stütz- und Ernährungsfunktion einnehmen, von den Keimzellen (Spermatogonien) zu unterscheiden. Innerhalb der Tubuli seminiferi findet die Spermatogenese statt. Die Spermatogenese geht von der Typ-A Spermatogonie aus, welche aufgrund ihrer Fähigkeit, sich homonym zu teilen als eine Art Stammzelle angesehen wird. Nach einer heteronymen und einer mitotischen Teilung entstehen aus ihnen die Typ-B Spermatogonien, die sich wiederum mitotisch in primäre (I) Spermatozyten teilen. Aus diesen gehen nach der ersten meiotischen Teilung zwei sekundäre (II) Spermatozyten hervor. Sie treten daraufhin in die zweite Reifeteilung ein, aus der erst sekundäre und danach primäre Spermatiden hervorgehen. Unter starker Stimulation durch die Sertoli-Zellen reifen die Spermatiden über mehrere Wochen im Hoden zu Spermien heran. Eine Reaktion mit P30 im humanen Hoden ist nur auf Ebene der elongierenden Spermatiden I (frühe Spermatiden) zu finden, was in Abbildung 24a (Pfeil) zu erkennen ist. Diese beschränkt sich ausschließlich auf die Akrosomenanlage (Akroblast) im Kopf der Spermatide. Das Akrosom entspricht einem Lysosom, welches durch Abschnürungen des Golgi-Apparates entsteht. Es legt sich während seiner Entwicklung in der Spermatide dem Zellkern an und verschmilzt schließlich mit der Kernmembran. Die Sertolizellen sind P30 areaktiv.

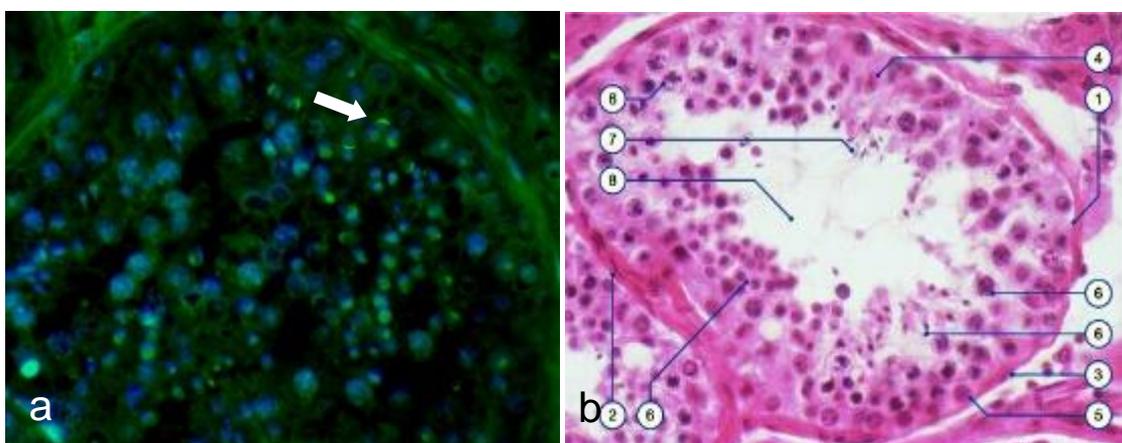


Abb. 24 a) humanes Hodenkanälchen mit Doppelmarkierung von P30 (grün) und DAPI (blau)
b) 1: Basalmembran, 2: Myofibroblast 3: Fibrozyt 4: Sertolizelle 5: Spermatogonie A 6: verschiedene Keimzellstadien 7: Spermium 8: Lumen

4.9.2 Spermium

Das Spermium (Spermatozoon) besteht aus einem Kopfteil, der den haploiden Zellkern und zwischen 2682 und 2886 verschiedene mRNA-Moleküle enthält und einem Mittelstück mit einer großen Anzahl von Mitochondrien, die dem Spermium die zur Fortbewegung nötige Energie in Form von ATP zur Verfügung stellen. Der Schwanzteil des Spermiums ist beweglich und setzt sich aus einem System längsverlaufender Mikrotubuli zusammen. Die Immunreaktion zeigt das markierte Protein P30 im Bereich des Mittelstückes, in dem sich die Mitochondrien des Spermatozoons befinden, sowie im Kopf und im beweglichen Schwanz. Die Mitochondrien sind nebeneinander um das zentral liegende Axonema angeordnet, von dem sie durch die dichten äußeren Längsfasern getrennt werden. Wie in Abbildung 25 deutlich zu sehen ist, weist das Axonema des Spermiums keine Reaktion mit P30 auf. Es ist als dunkler Streifen zwischen den Mitochondrien sichtbar. Der komplette Halsbereich zeigt keine Reaktion, er stellt sich als kragenförmige Abgrenzung zum Kopf dar. Im Kopfteil findet sich P30 im Bereich der Plasmamembran, die sich um den Kern erstreckt. Das an der Spitze großflächig dem Kern aufsitzende Akrosom, welches dem Spermium das Eindringen in die Eizelle ermöglicht, zeigt keine Reaktion mit dem markierten Protein P30. Alle Spermien zeigen im Verlauf des Schwanzes eine granuläre Reaktion. Der Schwanz des Spermiums dient der Fortbewegung, die durch ein längsverlaufendes Fibrillensystem aus Mikrotubuli ermöglicht wird. In dessen Umgebung befinden sich Lysosomen, sowie im Abbau befindliche Teile des Golgi Apparates.

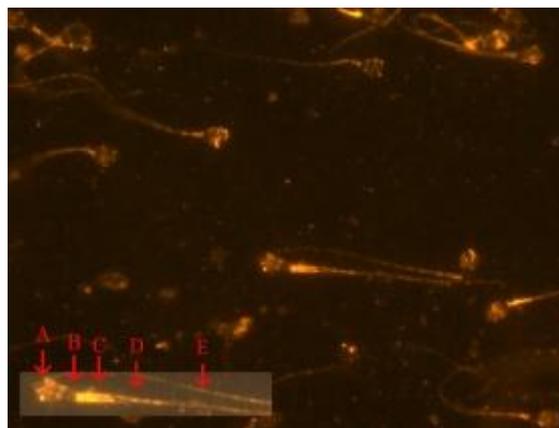


Abb. 25 Spermien in humanem Ejakulat (400 fache Vergrößerung) A: Kopf B: Hals C: Mittelstück D:Hauptstück D: Endstück

Die Reaktionen im Spermienkopf können dem Bereich der postakrosomalen Scheide zugeordnet werden, sowie dem im Halsanteil des Kopfes verbliebenen Cytoplasmasaum.

4.10 Pankreas

Neben den aus Zellkultur gewonnenen Glucagonzellen des Pankreas, wurde auch das Organ selbst auf das Vorkommen von P30 untersucht. Das Pankreas ist eine rein seröse Verdauungsdrüse, die ein speziell an die Nahrung angepasstes Verdauungsekret in den Darm abgibt. Neben dieser exokrinen Drüsenfunktion werden vom endokrinen Drüsenanteil auch Hormone direkt ins Blut abgegeben. Ungefähr 5% der Zellen sind inselförmig zusammengefasst und werden als Inselapparat bezeichnet, der über das gesamte Organ verteilt ist. Er besteht aus unterschiedlichen Zellen, die die Hormone Insulin, Glucagon, Pankreatisches Polypeptid und Somatostatin bilden und sezernieren. Der exokrine Anteil weist eine septale Gliederung in Lobuli auf, welche wiederum aus den einzelnen Azini bestehen. P30 ist in den Azinuszellen nachzuweisen (Abb. 26). Das Protein ist konzentriert im apikalen Bereich der azinären Zellen zu finden (Pfeil). In diesem Bereich befindet sich der Golgi-Apparat und sogenannte Zymogengranula, die inaktive Vorstufen der Verdauungsenzyme enthalten und primären Lysosomen entsprechen. Sie werden erst nach Abgabe in den Darm in ihre aktive Form umgebaut. Die Zellkerne der Azinuszellen und das Ausführungsgangsystem des Organes zeigen keine Reaktion mit P30.

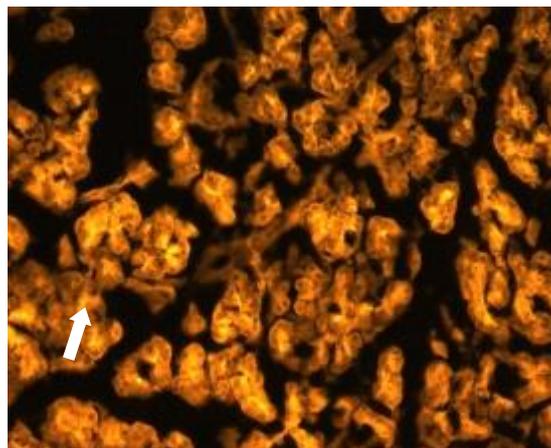


Abb. 26 Azinuszellen des Pankreas (siehe Pfeil), 200 fache Vergrößerung

4.11 Milz

Die Milz, das größte lymphatische Organ des Körpers, ist direkt in den Blutkreislauf eingeschaltet und übernimmt so eine wichtige Filterfunktion, bei der dem Blut Erythrocyten und Thrombocyten entnommen und abgebaut werden. Das Organ wird von einer kollagenfaserigen Kapsel umgeben, von der aus sich Bindegewebsstränge in das Organ fortsetzen. Diese Stränge bilden die so genannten Milztrabekel, welche die zugehörigen Balkengefäße enthalten. Die zwischen den Trabekeln befindlichen Räume werden durch retikuläres Bindegewebe gebildet, das von zahlreichen Blutgefäßen durchsetzt ist. Dieser Bereich wird als rote Pulpa bezeichnet. Die Milzknötchen, die aus lymphoretikulärem Gewebe bestehen, werden dagegen als weiße Pulpa bezeichnet. Die Sinusräume der Milz stehen in direktem Kontakt mit dem Blut, wobei der Querschnitt der Blutstrombahn stark vergrößert wird und der Blutstrom so verlangsamt in die Retikulumaschen gelangt. Ein Vorkommen von P30 in der Milz konnte einerseits mittels Immunoblotting, als auch mit Hilfe von Immuncytochemie gezeigt werden. Wie der Immunblot/Western Blot zeigt, kommt P30 in hoher Konzentration vor. Der Immunnachweis ergibt sowohl für Maus, Ratte und Meerschwein eine identische Lokalisation. Eine Reaktion mit P30 findet sich im gefensterten Endothel, welches die Milzsinus bildet. Es stellt die selektive Barriere der Milz dar, durch deren Fensterung Zellen gezielt aus dem Blut herausgefiltert werden können. Aufgrund der ebenfalls zahlreich vorhandenen arteriellen Gefäße, die der Milz das zu reinigende Blut zuführen, ist die insgesamt hohe Konzentration an P30 in diesem Organ zu erklären. In Abbildung 27a ist die P30 Reaktion im stark verzweigten Sinussystem der roten Milzpulpa und deren Endothel (Pfeil) deutlich zu erkennen. Zur detaillierten Analyse der Lokalisation auf subzellulärer Ebene wurden Dünnschnitte angefertigt und nach der Immunreaktion am Elektronenmikroskop untersucht. Das gesuchte Protein wurde mit Goldpartikeln markiert. P30 konnte im Cytoplasma der Endothelzellen gefunden werden. (siehe Stern in Abb. 27c,d)

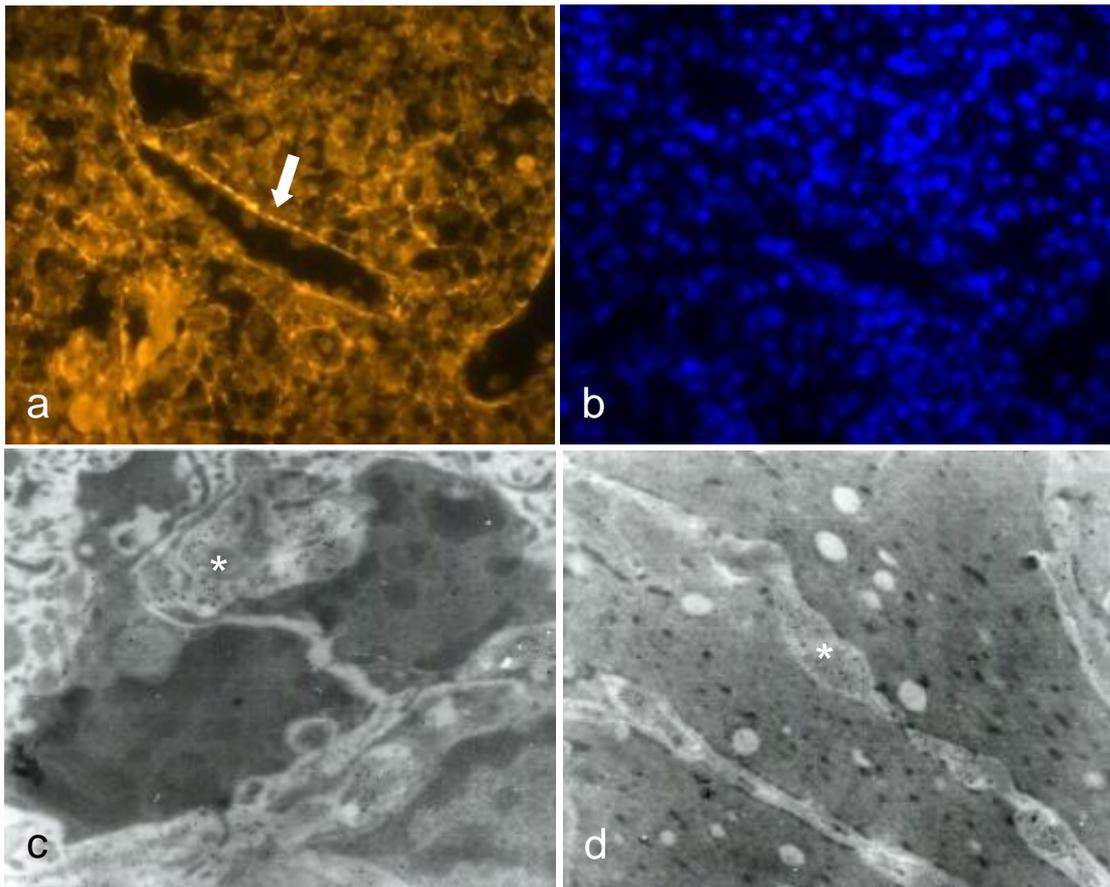


Abb. 27 a) P30 im Milzsinus (Pfeil) innerhalb der roten Pulpa (400x) **b)** DAPI Kernfärbung **c)** EM Präparat eines Milzsinus (P30 mit * markiert) **d)** P30 in Endothelzellen eines Milzsinus

4.12 Zellkultur

Zusätzlich zu den Organen und Geweben wurde das Vorkommen des P30 in Zellkulturen verschiedener Herkunft untersucht. Es wurden hierzu folgende Kulturen verwendet: INR!G9 (Glucagon sezernierende Zellen), HaCaT (Keratinocyten), NS20Y (neuronale Zellen). In allen untersuchten Ziellinien war Protein 30 nachweisbar.

4.12.1 INR1G9 Zellen

Bei den INR1G9 Zellen handelt es sich um eine Hamsterglucagonom Zelllinie. Eine Reaktion mit P30 Antikörper findet sich im Cytoplasma der Glukagonzellen, wobei der Zellkern keine Reaktion zeigt. Um den Kern herum ist ein Cytoplasmasaum im Bereich der Kernmembran zu erkennen, der ebenfalls reaktiv erscheint. In Zellkernnähe findet sich ein Focus mit starker Reaktion des P30 Antikörpers. Eine Doppelfärbung mit einem Antikörper gegen Golgin zeigt eine partielle Überlappung der Reaktionen. Wie in Abbildung 28 zu erkennen ist, gibt es Bereiche, die eine Doppellokalisierung aufweisen (Pfeil). P30 findet sich genau dort, wo auch der Golgi-Apparat nachzuweisen ist (gelb), es sind jedoch auch Anteile des Golgi-Apparates zu erkennen, die keine Doppellokalisierung mit P30 aufweisen (grün).

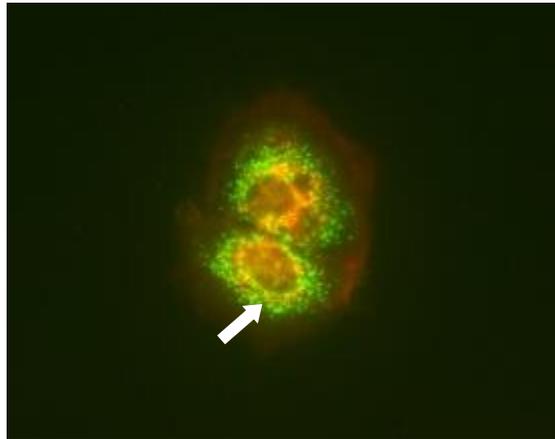


Abb. 28 Doppellokalisierung (Pfeil) von P30 und Golgin in 2 nebeneinander gelegenen Glucagonzellen, Zellkerne ohne Reaktion

4.12.2 HaCaT-Zellen

Bei den HaCat Zellen handelt es sich um eine Linie humaner Keratinozyten. Sie entsprechen den Zellen der Epidermis. P30 war in diesen Keratinozyten im Zytoplasma, nicht aber innerhalb des Zellkerns nachzuweisen. Die cytoplasmatische Lokalisation erscheint granulär. Eine deutlich stärkere Reaktion mit P30 findet sich an der Membran des Zellkerns, in deren Nähe sich das Endoplasmatische Retikulum (ER) befindet (Abb 29).

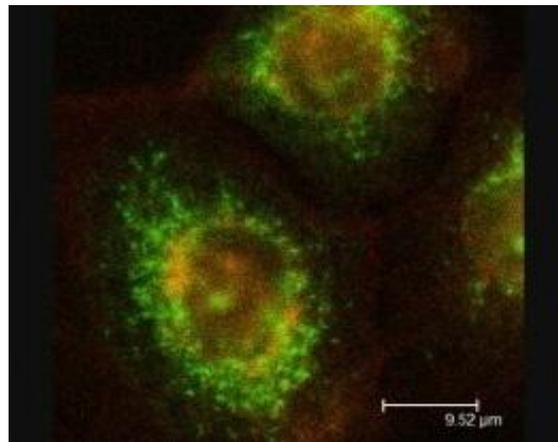


Abb. 29 Doppellokalisierung (gelb) von P30 und PDI (rER) in humanen Keratinozyten

4.12.3 NS20Y-Zellen

Bei der NS20Y-Zelllinie handelt es sich um eine Zelllinie, die aus dem Neuroblastom einer A/Jax Maus isoliert wurde. Diese Zellen können noch sekretorisch aktiv sein, sie sezernieren Acetylcholin. Auch in diesen Zellen findet man P30 im Cytoplasma der NS20Y Zellen, wobei wiederum der Zellkern areaktiv bleibt. Die cytoplasmatische Reaktion erscheint granuliert und lässt eine vermehrte Fokussierung im Bereich der Zellkernmembran erkennen (Abb. 30 Pfeil).

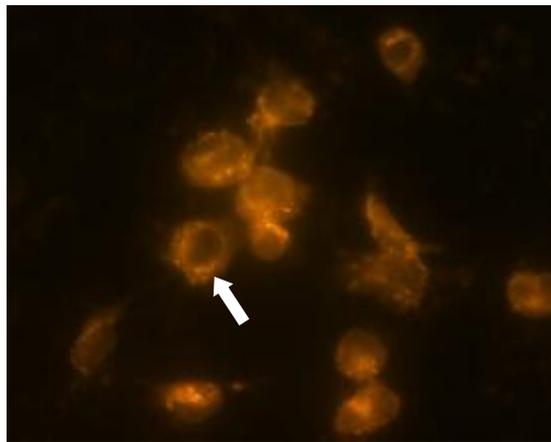


Abb. 30 P30 Reaktion in NS20Y Zellen (400x)

4.13 Weitere untersuchte Organe

4.13.1 Leber

Die Leber ist die größte Drüse und das größte innere Organ. Histologisch ist die anatomische Grundeinheit der Leber das Leberläppchen. Dabei ist die Zentralvene im Mittelpunkt eines Läppchens. Zwischen den in Balken angeordneten Hepatozyten liegen die Sinusoide, welche durch ein gefenstertes Endothel ohne Diaphragma begrenzt sind. Die Hepatozyten sind vom Sinusendothel durch einen schmalen perisinusoidalen Raum abgetrennt. Neben den Hepatozyten des Leberparenchyms sind in der Leber Makrophagen, Kupffer'sche Sternzellen und Ito-Zellen vorhanden, welche Abwehr- und Stoffwechselfunktion in Kooperation mit dem Parenchym übernehmen. Bei der Untersuchung von Rattenleber auf das Vorkommen von P30 wurde das Protein sowohl in den Hepatozyten, als auch in Non-Parenchymzellen gefunden (Pfeil in Abb. 31). P30 findet sich innerhalb der Hepatozyten im Cytoplasma, während der Zellkern areaktiv bleibt. In den Nonparenchymzellen reagieren auch die Zellkerne mit dem Antikörper gegen P30. Um welche Gruppe der Non-Parenchymzellen es sich dabei handelt konnte bisher nicht spezifiziert werden.

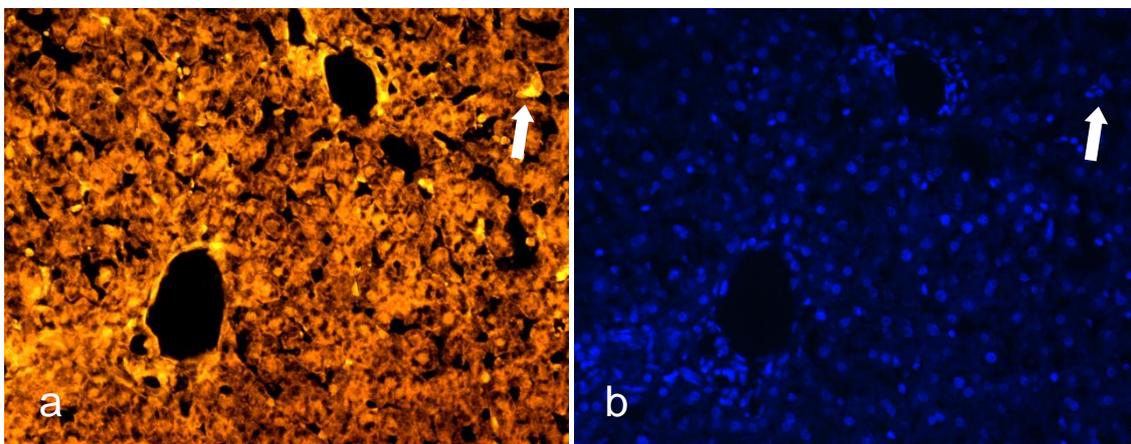


Abb. 31 a) einzelne P30 positive Nonparenchymzellen (Pfeil), sowie Leberparenchym in der Rattenleber b) DAPI Färbung zur Markierung der Zellkerne (a+b 200fach vergrößert)

4.13.2 Großhirn

Im Großhirnkortex der Ratte konnte P30 in einzelnen Zelltypen (Abb. 32a), sowie in dendritischen Strukturen (Abb. 32b) gefunden werden, wobei die genaue Lokalisation in dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurde.

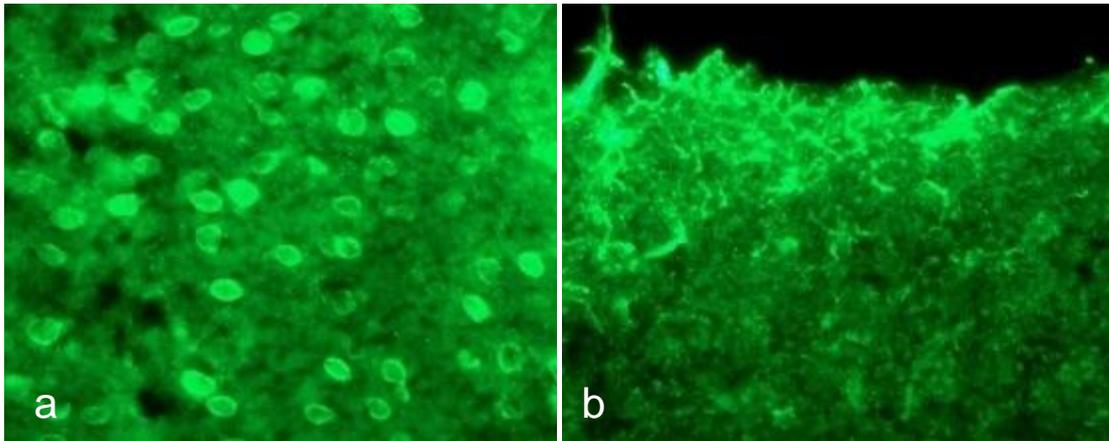


Abb. 32 a) P30 positive Zellen im Großhirn (Kortex) der Maus b) Großhirnrinde (jeweils 400 fach)

4.13.3 Kleinhirn

Das Kleinhirn wird anatomisch in Rinde und Mark unterteilt, welche aus jeweils unterschiedlichen Schichten und Zelltypen bestehen. Die Rinde (Kortex) besteht aus drei Schichten, dem Marklager (Markblätter), dem Stratum granulosum und dem Stratum moleculare. In der Kleinhirnrinde befinden sich die folgenden Zelltypen: Sternzellen, Korbzellen, Purkinjezellen, Körnerzellen, Golgizellen. P30 wurde in den Markblättern und dem Stratum granulosum gefunden. Das nach außen angrenzende Stratum moleculare zeigt keine positive Reaktion mit dem gesuchten Protein.

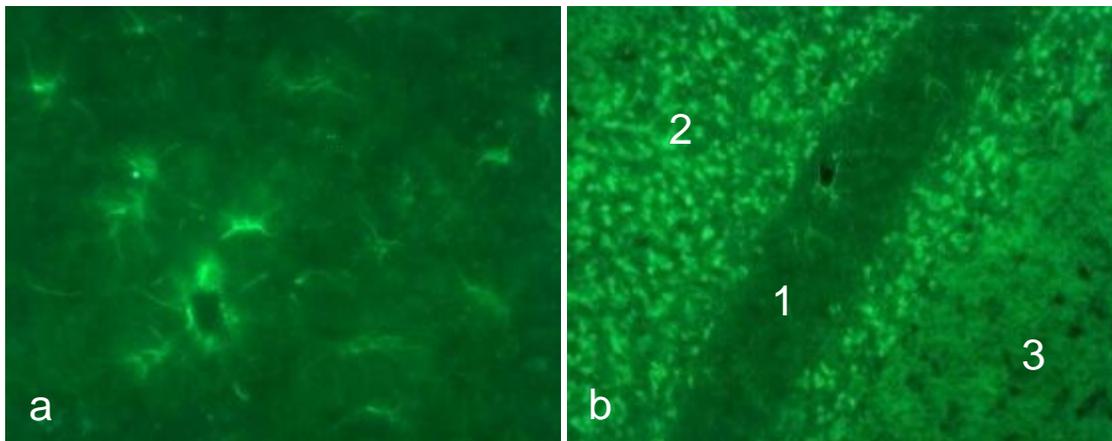


Abb. 33 a) einzelne P30 positive Zellen im Kleinhirnmarkblatt der Ratte (400x) b) 1: Markblätter 2: Stratum granulosum 3: Stratum moleculare (200fach)

4.13.4 Blutausstrich

Im humanen Blutausstrich wurde P30 ausschließlich in den Leukozyten gefunden (Abb. 34), wobei die zum Teil segmentierten Zellkerne keine Reaktion zeigen (ohne Abbildung). Zur genauen Differenzierung der Zelltypen wurde eine Doppelfärbung mit CD14-Antikörper gegen Leukozyten durchgeführt.

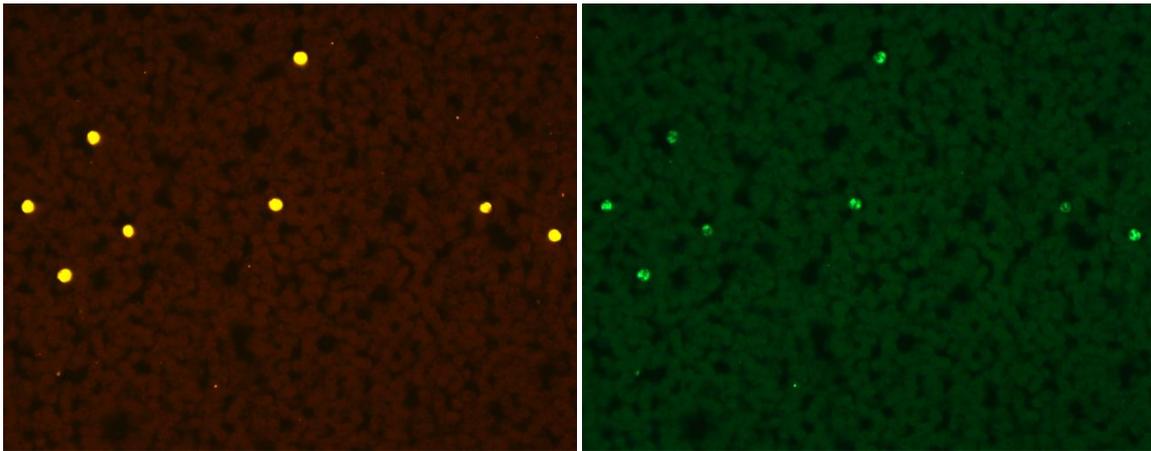


Abb. 34 a) Blutausstrich 200fach vergrößert b) Doppel Färbung mit CD14 Antikörper gegen Leukozyten

5 Diskussion

Das Protein 30 wurde als Interaktionspartner der cytosolisch lokalisierten Protein Tyrosin Phosphatasen von der Arbeitsgruppe Hofer (Biochemie, Universität Konstanz) beschrieben. Erste Untersuchungen weiterer Arbeitsgruppen zu Proteinen mit identischer Gensequenz führten dazu, dass für P30 auf Grund unterschiedlicher Lokalisationen in der Zelle, sowie seinem Vorkommen in unterschiedlichen Organen, verschiedene Namen synonym verwendet werden. Nuclear envelope spectrin repeat protein 1 (Nesprin-1) bezeichnet seine Lokalisation im Bereich der Zellkernmembran zahlreicher Gewebetypen wie Herz, Placenta, Skelettmuskel, Milz und Hoden (Zhang et al. 2001). Es wurde außerdem beobachtet, daß das Protein vermehrt im postsynaptischen Bereich der motorischen Endplatte exprimiert wird, was in dieser Arbeit jedoch nicht uneingeschränkt bestätigt werden konnte. Die daraus resultierende Bezeichnung für das Protein ist Synaptic nuclear envelope protein 1 (Syne-1) (Apel et al. 2000). Durch seine spezielle Lokalisation an der myocytären Kernmembran wird P30 außerdem als Myocyte nuclear envelope protein 1 (Myne-1) (Mislow et al. 2002) oder Enaptin bezeichnet. Die bisher erfolgten Untersuchungen zu P30 basierten größtenteils auf molekularbiologischen Grundlagen und wurden mit Hilfe der PCR, Western- und Northernblots durchgeführt. Es existiert keine Übersicht, die mittels Immuncytochemie einen umfassenden Überblick über das Vorkommen von P30 in verschiedenen Geweben und Organen gibt. Diese Arbeit sollte darüber hinaus zeigen, in welcher Lokalisation P30 in diesen untersuchten Organen und Geweben P30 exprimiert wird, sowie dessen subzelluläre Lokalisation analysieren. Immunhistochemisch unter Verwendung eines speziell für P30 hergestellten Antikörpers wurde ein Organ- und Gewebescreening durchgeführt, welches ein weitreichendes Verteilungsmuster des gesuchten Proteins ergab. Es ist wie seine Synonym verwendeten Formen (Syne-1, Myne-1, Nesprin-1, Enaptin) in Strukturen zu finden, die reich an F-Actin sind (Padmakumar et al. 2004). Nach seiner Entdeckung im Rahmen der Suche nach Interaktionspartnern der TC-PTP/PTP1B mit dem Two-Hybrid-System wurde gezeigt, dass P30 in vitro durch die Src-Kinase phosphoryliert werden kann und damit als Substrat für diese Phosphatasen in Frage kommt. Die Proteinphosphorylierung ist ein wichtiger post-translatinaler Kontrollmechanismus in der Signaltransduktion der Zelle.

Hierzu gehört die Regulation der Aktivität von Enzymen oder Transkriptionsfaktoren, wobei die Phosphorylierung durch Ladungsveränderungen das Zielprotein aktivieren/inhibieren oder seine subzelluläre Lokalisierung determinieren kann. Die physiologischen Mechanismen der Proteinphosphorylierung hängen vom jeweiligen Substrat der Kinase ab. Für P30 konnte mit Hilfe der Affinitätschromatographie (Trennverfahren zur Isolation eines Analyten aus einer Lösung verschiedener Stoffe) eine Interaktion mit der TC-PTP/PTP1B nachgewiesen werden, die aus Schweinelymphocyten isoliert wurde (Porsche 2001).

5.1 Lokalisation von P30

Im Überblick und organunabhängig findet sich das gesuchte Protein 30 ausschließlich intrazellulär. Dort ist es mit der Membran des Zellkernes assoziiert, die eine direkte Verbindung zum Endoplasmatischen Retikulum hat und eine wichtige Rolle im Stoffaustausch zwischen Kern und Cytoplasma spielt. Bei näherer Betrachtung der Assoziation von P30 und dem perinukleären Bereich, sowie der Kernmembran, konnte ein gesteigertes Vorkommen von P30 abhängig vom Aktivitäts- und Differenzierungsgrad des jeweiligen Gewebes nachgewiesen werden.

5.1.1 P30 in Assoziation mit Aktin

Aktin ist ein Strukturprotein, das in allen eukaryotischen Zellen vorkommt. Es ist Bestandteil des Zytoskeletts und gleichzeitig eines der fünf häufigsten Proteine in Eukaryonten. Diese Filamente dienen als Bestandteil des Zytoskeletts der Stabilisierung der äußeren Zellform, intrazellulären Transporten und sind zentraler Bestandteil des Kontraktionsapparats der Muskeln. P30 (Nesprin-1) besitzt eine einzelne Transmembrandomäne an seinem C-Terminus und hat Einfluß auf die frühe Muskeldifferenzierung, wobei es während der Differenzierung eine Kolokalisation mit Lamin A/C zeigt (Mislow et al. 2002). Die Untersuchungen von kultivierten Glucagonzellen, Keratinocyten und Tumorzellen (NS20Y) zeigten, daß P30 in allen untersuchten Zelllinien exprimiert wird. Diese Zellkulturen wurden deshalb gewählt, da sich aufgrund der Zellgrößen und ihrer hohen Proliferationsaktivität die

intrazellulären Vorgänge und Strukturen deutlicher darstellen ließen, als in organisierten Gewebeverbänden und Organen. Hier fand sich allerdings nicht ausschließlich eine Assoziation zur Zellkernmembran, sondern zusätzlich in unterschiedlichen Kompartimenten des Cytoplasmas und der Zellorganelle. Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen Golgin zeigen in hohem Maße eine Kolokalisation von P30 und dem cytoplasmatischen Golgi Apparat. Die parallele Färbung mit PDI-Marker zeigte außerdem eine teilweise Überlagerung mit dem Endoplasmatischen Retikulum. Der Golgi-Apparat steht direkt mit dem ER in Kontakt, in dem sekretorische Proteine in Form kleiner Membranbläschen abgeschnürt werden und das Lumen des ER als Transportvesikel in Richtung Golgi-Apparat verlassen. Bei Erreichen des Golgi-Apparates verschmilzt die Membran des Transportvesikels mit der Membran des Dictyosoms und der Inhalt des Vesikels entleert sich. Vorstufen von funktionellen Proteinen, aber auch membranständige Phospholipide können an der *cis*-Seite des Golgi-Apparates zur weiteren chemischen Abwandlung aufgenommen werden. Der Transport innerhalb der Vesikel ist abhängig von der Interaktion zwischen verschiedenen Proteinen, die sowohl die korrekte Transportrichtung, als auch die Aufnahme des Vesikels an seinem Ziel regulieren (Spang et al. 2001). Syne-1 wird eine wichtige Rolle in der Regulation des retrograden Transportes vom Golgi-Apparat zurück zum ER zugeordnet, bei dem es zur weiteren Interaktion mit regulatorisch aktiven Proteinen kommt (Gough et al. 2004). Der Kurzstreckentransport der Vesikel orientiert sich an cytoplasmatischen Aktinfilamenten, zu denen eine direkte Verbindung mit Syne-1 besteht. Diese Tatsache weist darauf hin, dass P30 sowohl an der Integrität (Kobayashi et al. 2006) als auch an der Interaktion der Zellorganelle, sowie dem Stofftransport innerhalb der Zelle verantwortlich sein könnte, da es auch in cytoplasmatischen Bereichen nachgewiesen wurde, in denen sich keine Assoziation zum Golgi-Apparat oder dem ER nachweisen läßt. Eine weitere Funktion von P30 im Bezug auf seine cytoplasmatische Lokalisation, könnte im Rahmen plastizitärer Veränderungen des Cytoskeletts zu sehen sein. Das Cytoskelett der Wirbeltiere wird von drei Proteinfamilien dominiert: den Mikrofilamenten (Aktine), den Makrofilamenten (Tubuline) und den Intermediärfilamenten (IF-Proteine). IFs gehören zur schwerstlöslichen Proteinfraktion in der Zelle und sind für deren Form verantwortlich. Sie umspannen den Zellkern und durchziehen gerüstartig das Cytoplasma. Durch Desmosomen haben sie außerdem eine Verbindung zur Plasmamembran der Zelle.

Für das Syne-Protein 2 ist eine direkte Interaktion mit dem cytoplasmatischen F-Aktin sowohl in vitro, als auch in vivo nachgewiesen, wodurch es eine Verbindung zwischen Nucleus und Cytoskelett herstellt (Starr et al. 2002). Proteinen der Spektrin-Familie, zu denen auch P30 zählt, werden zahlreiche Funktionen in der Organisation und Funktion des Cytoskeletts und der Kommunikation mit den Zellorganellen zugeordnet, was das spezifische cytoplasmatische Vorkommen von P30 erklären könnte, während ebenfalls deutlich die Assoziation zur Zellkernmembran und somit die Verbindung zwischen Zellkern und Cytoplasma in den Vordergrund tritt (Warren et al. 2005).

5.1.2 Muskulatur

Der 20 Tage stimulierte Muskel der Ratte wies eine deutlich gesteigerte Reaktion mit P30 im Bereich der Kernmembran im Gegensatz zum unstimulierten Muskel auf. Die untersuchte embryonale Muskulatur in den Somiten des Rattenembryos zeigte eine deutlich schwächere Reaktion mit dem untersuchten Protein 30. Dieses läßt sich auf den Differenzierungsgrad der unterschiedlichen Proben zurückführen. Der embryonale Muskel bildet in komplexen Umbauprozessen die spätere Struktur der Sarkomere, indem Aktin-Filamente nach einem definierten Muster in den Myocyten angeordnet werden. Im adulten Muskel ist dieser Aufbauprozess abgeschlossen, wird dieser jedoch stimuliert, erfolgt ein erneuter Umbau der Muskelstrukturen. Schnelle Muskelfasern werden bedingt durch die niedrige Stimulationsfrequenz (10 Hz) zum großen Teil in langsame Typ I Fasern umgewandelt. Das vermehrte Vorkommen von P30 in stimulierter Muskulatur macht deutlich, daß es eine Rolle während des Umbauprozesses und der Reorganisation der Aktinfilamente spielen könnte. Das verstärkte Vorkommen von P30 in den Myocyten der neuromuskulären Junktionszone, wie von Apel et al (2000) beschrieben, konnte jedoch nicht bestätigt werden. In allen untersuchten Muskeln zeigte sich ein homogenes Verteilungsbild von P30 ohne jeglichen Fokus. Sowohl Skelett-, Herz- als auch glatte Muskulatur zeigten eine identische Lokalisation von P30 im Bereich der Kernmembran und im Bereich des Sarkolemmms.

5.1.3 Gefäßsystem

Sowohl im arteriellen, als auch im venösen Gefäßsystem ist P30 zu finden. Die Lokalisation und Intensität der Reaktion mit P30 ist sowohl vom Gefäßtyp (Arterie und Vene), als auch vom Kaliber des Gefäßes abhängig. Die Lokalisation von P30 in den Myocyten der arteriellen großen Gefäße ist analog zum Vorkommen in den übrigen Muskeltypen, jedoch findet sich das Protein zusätzlich im Endothel des Gefäßlumens, sowohl venöser, als auch arterieller Gefäße. Weil Kapillaren aus Endothel bestehen sind auch sie P30 positiv. Die flachen Endothelzellen im Gefäßlumen besitzen ebenfalls ein Cytoskelett aus den bereits genannten 3 Filamenttypen, welches ihnen die Fähigkeit zur Formveränderung gibt. Mit 10,1% besitzen die Endothelzellen einen wesentlich höheren Anteil an Aktin, als alle anderen Zellen des Körpers. Es existieren eine Reihe Aktin-bindender Proteine, die den dynamischen Umsatz des Aktins kontrollieren können und unter anderem Lage und Länge, Aktivierung und Abbruch der Aktinpolymerisation bestimmen. In einer Gruppe von Aktin-assoziierten Proteinen, Filamin und Spectrin, konnten zwei F-Aktin-Bindungsstellen nachgewiesen werden, die durch Quervernetzung von Mikrofilamenten die Bildung von intrazellulären Netzwerken ermöglichen. In Endothelzellen bilden Aktinfilamente mit den filamentären Hauptkomponenten in der Zellperipherie in engem Kontakt mit der Plasmamembran ein dichtes Netzwerk, den Zellkortex. Es zeigt sich hier also erneut die Assoziation von P30 mit dem Cytoskelett, dessen Funktion es durch verschiedene Mechanismen beeinflussen kann. Eine Sonderstellung neben den Endothelien in den Gefäßlumina nehmen die Endothelien in Milz, Placenta und Nebennierenmark ein, da es sich hier um spezialisierte und funktionsadaptierte Endothelien handelt. Auch diese Endothelien exprimieren P30.

5.1.4 Haut

In der humanen Haut kann die Expression von P30 mit dem Aktivitätsgrad des Gewebes in Verbindung gebracht werden, da einzelne Zellen des Stratum basale stärkere Reaktionen in dem zur Dermis hin orientierten Zellkompartiment aufweisen.

Denkbar wäre eine Assoziation mit den in Teilung begriffenen Zellen bzw. mit spezifischen Zellen der Epidermis. Da auch die kernlosen Hornplättchen des Stratum corneum positiv reagieren, kann davon ausgegangen werden, dass das Protein im Zuge der Differenzierung der Zellen zu Hornschuppen nicht abgebaut, bzw. die Expression des Proteins eingestellt wird.

5.1.5 Nebenniere

In der Nebenniere, in der man P30 in den Rindenplexus der subkapsulären Zone und den Arterienästen findet, die in die Tiefe ziehen, zeigt sich ebenfalls eine hohe Reaktivität im Nebennierenmark. Neben den zahlreichenden Kapillaren verfügen die das Mark durchziehenden Drosselvenen über zusätzliche Polster glatter Muskulatur, wodurch die starke Anreicherung von P30 in diesem Bereich erklärt werden kann. Die Drosselvenen haben die Fähigkeit zur Kontraktion und können so den Blutzufuß im Mark regulieren. Die Myocyten der glatten Muskulatur weisen aufgrund ihrer kontraktile Elemente und ihres dynamischen Cytoskeletts eine Assoziation mit P30 auf, welches auch hier Einfluß auf deren Funktion und auf die Regulation des Blutflusses innerhalb des Nebennierenmarks hat. Der komplette Marksinusraum wird von P30 positivem Endothel ausgekleidet, welches zu einem großen Teil fenestriert ist und die Sekretion der gebildeten Hormone in die Sinusräume ermöglicht und regulieren kann.

5.1.6 Kinozilien tragende Epithelien (Ependym und respiratorisches Epithel)

Da P30 im Ependym nicht kontinuierlich in jeder Zelle des einschichtigen Epithels vorkommt und das Protein hier ebenso wie im Epithel von Bronchien und Tube im apikalen Zellkompartiment zu finden ist, kann davon ausgegangen werden, dass es sich dabei nur um die kinozilientragenden Zellen handelt. Kinozilien sind Zellfortsätze, die zu aktiver Bewegung befähigt sind und aus einem System von Mikrotubuli und Dynein gebildet werden. Es wird deutlich, dass P30 mit hoher Wahrscheinlichkeit mit diesem System assoziiert sein muß, da es sich im apikalen Zellkompartiment findet, in dem auch die Kinetosomen als Basis der Zilien angeordnet sind.

Auch das respiratorische Epithel, welches den Großteil des Respirationstraktes lumenseitig auskleidet, zeigt eine deutliche Reaktion im apikalen Bereich der Kinozilien tragenden Zellen. Wie auch beim Ependym sind in dieser Stelle die motorischen Elemente der Zellen zu finden. Becherzellen sind als Lücken zwischen den einzelnen Epithelzellen abzugrenzen, da sie nicht über kontraktile Elemente verfügen und somit reaktionslos bleiben. Gleiches gilt für die Tuba uterina, die ebenfalls von Kinozilien tragendem Epithel ausgekleidet wird. Die Funktion von P30 kann unter Berücksichtigung seiner Zugehörigkeit zur Familie der Spectrine in der Vernetzung der cytoplasmatischen mit den motorischen Proteinen der Epithelzellen gesehen werden. Diese Funktion wurde für Spectrin als Strukturprotein in verschiedenen Arbeiten beschrieben (De Matteis et al. 2000), (Bennett et al. 2001).

5.1.7 Hoden und Spermien

P30 ist im Hoden lediglich in den Spermatischen I zu finden. In diesem Stadium differenziert sich die Akrosomenkappe aus dem Akroblasten und verlagert sich aus Kernnähe in die Akroblastenkappe. Der Akroblast entwickelt sich aus dem Golgi-Apparat, indem eine Aufteilung des Golgi und der Weitertransport in Richtung der zukünftigen Akrosomenkappe vollzogen wird (Ferner et al. 1961). Zu diesem Zeitpunkt finden zahlreiche Umbauprozesse statt, in denen sich die abgeschnürten Golgi-Granula direkt dem Zellkern anlagern, konfluieren und in die endgültige Position an der Akrosomenkappe verlagert werden. Eine direkte Verbindung zum Zellkern bleibt weiterhin bestehen. Zu diesem Zeitpunkt entspricht das Akrosom einem Lysosom und enthält entsprechende lysosomale Enzyme. P30 ist nur während der Bildung der Akrosomenkappe in der Spermatische I zu finden, die noch zum Großteil dem Golgi-Apparat entspricht. Dies entspricht auch den Beobachtungen in den Glucagon sezernierenden INR1G9-Zellen, bei denen P30 wahrscheinlich am Sekretionsprozeß der Golgi Vesikel beteiligt ist. Je weiter sich die Differenzierung zum reifen Spermium vollzieht, also sich der Golgi Apparat in eine Art Lysosom differenziert, desto weniger P30 wird im Bereich der Akrosomenkappe exprimiert. P30 scheint hier direkt vom Entwicklungs- und Differenzierungsstadium des Golgi-Apparates abhängig zu sein. Während der Umwandlung des Golgi Apparates zum Lysosom sind verschiedene Cytoplasmabestandteile an Transport und Regulation

beteiligt (Thorne-Tjomsland et al. 1988). Mit Hilfe von mikrotubuli- und actinbasierten Motorproteinen wird der Vesikeltransport ermöglicht (Kierszenbaum et al. 2003). Während dieser Phase bleiben die Vesikel in engem Kontakt zum Zellkern und werden über F-Actin im sogenannten Acroplaxom an den Kern gebunden (Kierszenbaum et al. 2003). Eine entscheidende Rolle in der Acrosomenentwicklung spielt hier auch das Motorprotein myosin Va, welches auf dem bereits beschriebenen Actin basiert (Kierszenbaum et al. 2003). Im Lysosom, welches nur noch aus Wandbestandteilen des Golgi-Apparates besteht, findet sich P30 nicht mehr. Im Kopfbereich des reifen Spermatozoons kann P30 entlang der Kernmembran nachgewiesen werden, die im oberen Halsbereich mit ihrer Basalplatte eine Verbindung zum Halsstück herstellt.

5.1.8 Nervensystem

Nervenzellen in situ wie in vivo weisen P30 auf. Dabei findet sich das Protein sowohl in den Perikaryen als auch in den Axonen der Neurone. Das Perikaryon als Steuerungszentrum des Axons beinhaltet eine große Dichte an Golgi-Elementen und ER, was hier das Vorkommen von P30 sowohl in der Zellkernumgebung, als auch im übrigen Cytoplasma erklärt. Das neuronale Axon enthält ebenso wie die Dendriten das Cytoplasma der Nervenzelle. Wie in anderen Körperzellen auch, finden sich im Axoplasma Zellorganellen, sowie ein Cytoskelett aus 3 verschiedenen Filamenttypen. Mikrotubuli und Actin sind für den axonalen Stofftransport zuständig, bei dem auch spezielle Vesikel des Endoplasmatischen Retikulums und zahlreiche verschiedene Zellorganellen entlang der Actin-Filamente transportiert werden (Tabb et al. 1998), (Langford 1999). Aufgrund des Reichtums an Actin im Axoplasma liegt wegen des ebenfalls stark exprimierten P30 die Vermutung nahe, dass Protein 30 auch im Axon eine Interaktion mit dem cytoskeletalen Actin eingeht und Anteil am Stoff- und Organelltransport hat, sowie diesen regulieren kann.

5.1.9 Glomerulum

Das innere, viscerale Blatt der Bowman Kapsel im Glomerulum bildet die Filtrationsbarriere bei der Bildung des Primärharns und wird von den Podocyten und einer Basalmembran gebildet. Podocyten haben ihren Ursprung in epithelialen Vorläuferzellen, die sich während der renalen Entwicklung differenzieren. Basis des Podocyten ist das aktinbasierende Cytoskelett. Das Cytoplasma beinhaltet ein Netzwerk aus verschiedenen Aktintypen (Ichimura et al. 2007), während spezielle Adhäsionsmoleküle die Interaktion des Cytoplasmas mit der extrazellulären Matrix vermitteln (Kreidberg et al. 1996). Das Actin-Cytoskelett spielt eine große Rolle in der Plastizität des Podocyten und interagiert mit verschiedenen cytoplasmatischen Proteinen (Faul et al. 2007). Auch P30 könnte hier die Podocytenfunktion beeinflussen und seine Funktionen regulieren, indem es an das Aktin bindet. Das parietale Blatt der Bowman Kapsel wird durch flaches einschichtiges Plattenepithel gebildet. Spezielle Untersuchungen mit Scanning- und Elektronenmikroskopie haben zusätzlich gezeigt, daß außer den flachen Epithelzellen auch podocytenähnliche Zellen im parietalen Blatt vorhanden sind (Gibson et al. 1992). Diese werden aufgrund der starken Ähnlichkeit zu Podocyten auch als parietale Podocyten bezeichnet. Wie oben beschrieben ist die P30 Reaktion in den parietalen Podocyten mit P30 in den visceralen Podocyten gleichzusetzen, da sie einen nahezu identischen Aufbau besitzen und ebenfalls reich an Aktin sind. Die parietalen Epithelzellen, die neben den Podocyten das parietale Blatt bilden, beinhalten Aktin-Verbände, die eine Verbindung vom Cytoplasma nach extrazellulär darstellen und die Basalepithelzellen mit der Basalmembran verbinden (Mbassa et al. 1988). Da auch in diesen Zellen P30 konzentriert vorkommt, liegt erneut die Assoziation zum cytoplasmatischen Aktin nahe, wobei dieses in den Epithelzellen zur Verankerung an der Basalmembran dient. Hier könnte P30 eine Funktion auf der Ebene der Zellstabilität und der interzellulären Konnektivität einnehmen.

5.1.10 Ovar (Oocyte)

P30 konnte im Ovar neben Gefäßen, Bindegewebe und Serosa zusätzlich in der Oocyte des Tertiärfollikels innerhalb des Cytoplasmas gefunden werden. In der Differenzierung und Reifung der Oocyte wird dem Cytoskelett und insbesondere den Interaktionen von Aktin und Spectrin eine große Bedeutung zugeordnet. Während der Reifung der Oocyte kommt es zu dynamischen Interaktionen zwischen Actinfilamenten und Mikrotubuli. Diese Quervernetzungen werden von Proteinen initiiert und gesteuert. Auf diese Weise werden sowohl Zellorganelle, als auch andere Vesikel innerhalb des Cytoplasmas in die nötigen Kompartimente transportiert (Sun et al. 2006). Aktinfilamente in der Oocyte sind außerdem maßgeblich an der Organisation des Chromatins während der Entwicklung beteiligt. P30 als Protein aus der Spectrinfamilie scheint auch hier eine Regulations- und Interaktionsstellung zwischen den verschiedenen Strukturproteinen innerhalb des Cytoskelettes sowie den Zellorganellen einzunehmen. Durch die Verknüpfung des Aktins mit dem Chromatin in der Eizelle läßt sich auch P30 als dessen Interaktionspartner und Regulator mit der Chromatinorganisation direkt in Verbindung bringen. Im Zuge der meiotischen Teilungen findet eine Organisation von F-Aktin und Aktin Filamenten im Bereich des Zellkortex statt. P30 könnte hier also einen Einfluß auf die Reifung der Eizelle und deren Teilungsaktivität haben, da es bereits in anderen Strukturen und Zellen eine eindeutige Assoziation zum F-Aktin und Aktin-Filamenten zeigt.

Zusammenfassend und unter Berücksichtigung aller organ- und subzellulärer Lokalisationen muß P30 als ein cytoskeletales Protein gesehen werden, welches umfangreichen Einfluß auf Struktur, Organisation und Stoffwechsel der Zelle hat. Eine Dysfunktion oder ein Defekt von P30 könnte deshalb zu multiplen Störungen und Erkrankungen führen.

5.2 P30 und Laminopathien

Laminopathien sind Erkrankungen, die durch eine Mutation im Lamin A Gen (LMNA) verursacht werden (Burke et al. 2002). Zu diesen Erbkrankheiten gehören unter anderem die autosomal dominante Emery-Dreifuss Muskeldystrophie (EDMD2/LGMD1B) und die Charcot-Marie-Tooth Disease Typ 2 (CMT2). Die Krankheiten betreffen verschiedenste Organe und Gewebe, wobei sie unterschiedliche Auswirkungen und Folgen für den Erkrankten haben. Die wohl folgenschwerste Laminopathie ist das HGPS-Syndrom (Hutchinson-Gilford Progeria Syndrom), welches äußerst selten ist. Diese Erkrankung betrifft multiple Organe und führt zu vorzeitigem Altern und einem frühen Tod (Eriksson et al. 2003) (Goldman et al. 2004). Es wurde gezeigt, daß das HGPS-Syndrom durch eine Punktmutation im LMNA-Gen verursacht wird, wodurch es zellulär zu Zellkerndeformitäten, verminderten Teilungsraten und Defekten in der Genexpression kommt (Csoka et al. 2004), (Scaffidi et al. 2005). In direkter Verbindung zum Zellkern stehen Lamine, die zur Gruppe der Intermediärfilamente gehören (Aebi et al. 1986). Ihre vermutete Aufgabe ist es, eine direkte Verbindung zwischen Zellkern und cytoplasmatischen Proteinen herzustellen und deren Interaktion zu ermöglichen (Gruenbaum et al. 2005), (Goldman et al. 2004). Lamine besitzen zahlreiche Bindungsstellen für potentielle Interaktionspartner, zu denen auch Actin und Nesprin gehören (Zastrow et al. 2004). Nesprin 1 (P30) und Nesprin 2 werden als Bindungspartner des Emerins mit der Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie in Verbindung gebracht, welche durch eine Unterbrechung, bzw. eine Fehlfunktion der Interaktionen zwischen den einzelnen Proteinen verursacht wird (Wheeler et al. 2007). Eine Störung auf dieser Ebene hat eine Unterbrechung oder aber eine fehlerhafte Interaktion zwischen Zellkern und Cytoskelett bzw. cytoplasmatischen Proteinen zur Folge (Mislow et al. 2002). An dieser Stelle wird deutlich, daß auch P30 (Nesprin) in der zellulären Dysfunktionalität bei Laminopathien eine Rolle spielt und die gestörte Interaktion mit P30 gegebenenfalls zu einer Fehlbildung verschiedener Gewebe im Rahmen dieser Laminopathien führt. In welcher Ausprägung P30 an diesen Dysfunktionen beteiligt ist, muß noch in weiteren Studien geklärt werden.

6 Zusammenfassung

Protein 30 (P30), ein noch nicht lange identifiziertes Protein mit einem Molekulargewicht von 58.4 kDa ist zuerst aus menschlichem Gehirngewebe isoliert worden. Dieses Protein, das multiple Spectrin-Wiederholungen und eine aminoterminalen Aktinbindungsstelle enthält, ist auch bekannt als Syne-1, Nesprin, Myne, Enaptin, MSP-300 oder Ank-1 und kann in Strukturen gefunden werden, die reich an F-Aktin sind, besonders in Strukturen, die kontraktile Funktionen haben oder eine Rolle im intrazellulären Stofftransport und der cytoskeletalen Integrität spielen. P30 ist ein schwer lösliches cytoskeletales Strukturprotein, das in der Lage ist, an die Kernmembran, das endoplasmatische Reticulum und den Golgi Apparat zu binden. Es hat die Funktion eine Strukturverbindung zu Anteilen des rER und zum Golgi Apparat herzustellen und zeigt verschiedene Wechselwirkungen mit Aktinfilamenten. Außerdem wurde für P30 gezeigt, daß es durch src-Kinasen tyrosin-phosphoryliert werden kann und mit der T-Zell PTP interagiert. Obwohl P30 biochemisch gut charakterisiert wurde, ist bisher nicht viel über sein organ- und gewebespezifisches Vorkommen bekannt. Deshalb wurde die Expression von P30 durch die Immunocytochemie, die Elektronenmikroskopie und das Westernblotting auf sein Vorkommen in Organen der Ratte, Maus, Kaninchen und Menschen sowie in Zellkulturen untersucht. Das Verhalten von P30 während der Embryogenese wurde anhand von Mausembryonen studiert. P30 wurde in Geweben gefunden, die reich an F-actin sind. Das Sarkolemm und die Kernmembran aller verschiedenen Faser-Typen des Skelettmuskels waren P30 positiv. Die Faser-Typ-Transformation durch die elektrische Stimulation führte zu einer Zunahme der P30 Expression. Im Gegensatz dazu zeigten embryonale Muskeln und diejenigen von hypothyreoten Tieren ein deutlich niedrigeres Vorkommen von P30. Im Herzmuskel der Ratte zeigte P30 eine identische Lokalisierung wie im Skelettmuskel. Glatte Muskelzellen von Gefäßen (venös und arteriell) sowie im Bronchus exprimierten P30 innerhalb ihres Zytoplasmas. In allen untersuchten Organen, Endothelzellen von venösen sowie arteriellen Gefäßen wurde P30 exprimiert; außerdem waren arterielle und venöse Myocyten ebenfalls P30 positiv. Im peripheren Nervensystem wurde P30 in Ganglienzellen des Ganglion trigeminale und im Axoplasma des peripheren Nerven gefunden. Im Auge wurde das Protein in Ganglienzellen und den versorgenden Gefäßen der Netzhaut, sowie im Hornhautepithel exprimiert. In der Epidermis wurde

P30 in allen verschiedenen Schichten und ebenso im respiratorischen Epithel, sowie in den kinezilientragenden Zellen des Ependyms gefunden. Der weibliche Eileiter zeigte eine positive Reaktion im apikalen Zellpol, in dem die Kinetosomen lokalisiert sind. In der Niere konnte das P30 Protein im visceralen und parietalen Blatt der Bowman Kapsel und im Vas afferens nachgewiesen werden. Die Nebenniere exprimierte P30 in ihrer Kapsel und im Sinusystem des Kortex. Außerdem fand sich P30 in den Ganglienzellen und den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks, sowie in dessen Sinusendothel. P30 wurde in allen weiblichen Fortpflanzungsorganen gefunden. Im Ovar wurde es in Serosa, Stroma und der Oocyte des Tertiärfollikels exprimiert. Der Eileiter zeigte das Protein in Serosa, Stroma und isolierten Teile des Flimmerepithels. Myoepithelzellen der laktierenden Mamma waren ebenfalls P30 positiv. In der Placenta der Ratte wurde P30 im Epithel der Lakunen nachgewiesen und die Gebärmutter zeigte in ihren Myocyten eine identische P30 Reaktion wie die beschriebene glatte Muskulatur. In der Akrosomenbildung befindliche frühe Spermatiden des Keimepithels im Rattenhoden exprimierten P30 ausschließlich in der Kappe, wobei diese im reifen Spermatozoon reaktionslos war. In der Bauchspeicheldrüse wurde P30 im apikalen Zellpol der Azinuszellen gefunden und in der Milz zeigte das Endothel des sinusuidalen Systems eine positive P30 Reaktion. Fibrocyten, Keratinocyten, Glucagonzellen und NS20Y Krebszellen weisen ebenfalls eine positive Reaktion mit P30 innerhalb ihres Zytoplasmas auf, assoziiert mit dem rER und dem Golgi Apparat. P30 wurde auch in non-Parenchymzellen der Leber, in verschiedenen Zellen des Großhirnes und des Kleinhirns, sowie in Leukozyten des peripheren Blutes nachgewiesen. Zusammengefaßt kann P30 eine wichtige Rolle in der intrazellulären Kommunikationen zwischen verschiedenen Zellorganellen und Proteinen während der Organisation des Cytoskelettes und dem Materialtransport zugeordnet werden. Das Protein wurde in Zellen und Geweben gefunden, die reich an Aktin, besonders an F-Aktin sind. In Muskelzellen und Zellen, die kontraktile Elemente enthalten, nimmt P30 die Funktion des Reglers zwischen den miteinander interagierenden Proteinen ein. Die Wichtigkeit dieser Ergebnisse wird zusätzlich durch die Tatsache unterstrichen, dass nesprin-1 (P30) mit emerin interagiert, bei dem es sich um ein Protein der Kernmembran handelt.

Funktionsstörungen auf dieser Ebene können dementsprechend zu einer großen Anzahl von menschlichen Syndromen, den Laminopathien führen. Diese Arten von Erbkrankheiten verursachen Missbildungen in vielen verschiedenen Organen und Geweben.

7 Summary

Protein 30 (P30), a recently identified protein with a molecular weight of 58.4 kDa has been first isolated from human brain tissue. This protein, which contains multiple spectrin repeats and an amino-terminal actin binding site, is also known as Syne-1, Nesprin, Myne, Enaptin, MSP-300 or Ank-1 and can be found in structures which are rich in F-actin, especially in structures that have contractile functions or play a role in intracellular transportation and cytoskeletal integrity. P30 is a detergent-resistant cytoskeletal structure protein, that has the ability to bind to the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. It holds the function as a structural link for tER sites and the Golgi apparatus and shows different interactions with actin filaments. Furthermore, P30 was identified to be tyrosine-phosphorylated by src-kinases and also interacts with the TcellPTP. Although P30 is biochemically quite nicely characterized, not much is known so far about its tissue- and organspecific distribution. Therefore, the expression of P30 was investigated by immunocytochemical staining, electronic microscopy and western blotting for its occurrence in organs of adult rat, mouse, guinea pig and human as well as in cell cultures. The expression of P30 during developmental process was studied by means of mouse embryos. P30 was found in tissues which are rich in F-actin. The sarkolemma and nuclear membrane of all different fiber types of skeletal muscle were P30 positive. Fiber type transformation by electrical stimulation led to an increase in staining-intensity. In contrast, embryonic muscles and those of hypothyroid animals showed a markedly lower expression of P30. In the heart muscle of the rat, P30 showed an identical localization as in the skeletal muscle. Smooth muscle cells of vessels and bronchus also expressed P30 inside of their cytoplasm. In all investigated organs, endothelial cells of venous as well as arterial vessels expressed P30; furthermore arterial and venous myocytes were also positive for P30 protein. In the peripheral nervous system P30 was found in ganglion cells of the trigeminal ganglion and also in the axoplasma of peripheral nerves. In the eye the protein is expressed in ganglion cells and the supplying vessels of the retina and in the corneal epithelium. In the skin P30 was found in all different layers and the respiratory epithelium as well as ciliated cells of the ependyma and the uterine tube showed a positive reaction in the apical cell pole, where the kinetosomes are localized. In the kidney the P30 Protein could be detected in both parts of the

Bowman capsula and the Vas afferens. The adrenal gland expressed P30 in the capsula in sinusoidal system of the cortex and in the sinus, ganglion cells and chromaffin cells of the medulla. P30 was detected in all female reproductive organs. In the ovaries it was expressed in serosa, stroma and oocyte of the tertiary follicle. The uterine tube showed the protein in serosa, stroma and isolated parts of the ciliated epithelium. Myoepithelial cells of lactating mammary gland were also P30-positive. In the rat placenta P30 was detected in epithelium of the lacunae and the uterine myocytes show an identical P30 reaction as the described smooth muscles. Acrosome-phase primary spermatids of seminiferous epithelium expressed P30 exclusively in the cap of early spermatids, whereas the acrosomal cap in the spermatozoon is no more P30 positive. In the pancreas P30 was found in the apical cell pole of the acinus cells and in spleen the endothelial sinusoidal system in P30 positive Fibrocytes, ceratinocytes, glucagon cells and NS20Y cancer cells also show a positive reaction with P30 inside of their cytoplasm, associated with rER and the golgi apparatus. P30 was also detected in non-parenchyma cells of the liver, cerebrum and cerebellum, as well as in leukocytes of peripheral blood. In conclusion, P30 plays an important role in intracellular communications between different cell organelles and proteins during organisation of the cytoskeleton and material transport. The protein was found in cells and tissues, which are rich in actin, especially F-actin. In muscle cells and cells containing contractile elements, P30 takes the function of the regulator between the interacting proteins.

The importance of this study is further underlined by the fact that nesprin-1 (P30) interacts with emerin, which is a protein of the nuclear membrane. It's dysfunctions may contribute to a broad range of human syndromes, the laminopathies. These kinds of hereditary diseases cause malformation of many different organs and tissues.

8 Sequenz von KIAA0796/P30

MATSRGASRCPRDIANVMQRLQDEQEIVQKRTFTKWINSHLAKRKPPMVVDDLDFEDMKDG
VKLLALLEVLSGQKLPCEQGRRMKRIHAVANIGTALKFLEGRKIKLVNINSTDIADGRPS
IVLGLMWTIILYFQIEELTSNLPQLQSLSSSASSVDSIVSSETPSPPSKRKVTTKIQGNA
KKALLKVVQYTAGKQTGIEVKDFGKSWRSGVAFHSVIHAIRPELVDLETVKGRSNRENLE
DAFTIAETELGIPRLDPEDVDVDPKPEKSIMTYVAQFLKHYPDIHNASTDGQEDDEILP
GFPSFANSVQNFKREDRVIFKEMKVWIEQFERDLTRAQMVESNLQDKYQSFKHFRVQYEM
KRKQIEHLIQPLHRDGKLSLDQALVKQSWDRVTSRFLDWHIQLDKSLPAPLGTIGAWLYR
AEVALREEITVQQVHEETANTIQRKLEQHKDLLQNTDAHKRAFHEIYRTRSVNGIPVPPD
QLEDMAERFHFVSSTSELHLMKMEFLELKYRLLSLLVLAESKLKSWIIKYGRRESVEQLL
QNYVSVFIENSKFFEQYEVTYQILKQTAEMYVKADGSVEEAENVMKFMNETTAQWRNLSVE
VRSVRSMLLEEIVISNWDYRGNTVASLQAWLEDAEKMLNQSENAKKDFFRNLPHWIQQHTAM
NDAGNFLIETCDEMVSRLDKQQLLLNGRWRELFMEVKQYAQADEM DRMKEYTDCVVTL
SAFATEAHKKLSEPLEVSFMNVKLLIQDLEDIEQRVPVMDAQYKIITKTAHLITKESPQE
EGKEMFATMSKLKEQLTKVKECYSPLLYESQQLLIPLEELEKQMTSFYDSLKINEIITV
LERAQSSALFKQKHQELLACQENCKKTLTIEKGSQSVQKFVTL SNVLKHFDQTRLRQR
IADIHVAFQSMVKKTGDWKKHVETNSRLMKKFEESRAELEKVLRIAQEGLEEKGDPEELL
RRHTEFFSQLDQRVLNAFLKACDELTDILPEQEQQGLQEAVRKLHKQWKDLQGEAPYHLL
HLKIDVEKNRFLASVEECRTELDRKLMPEQEGSEKIIKEHRVFFSDKGP HHLCEKRLQL
IEELCVKLPVRDPVRDTPGTCHVTLKELRAAIDSTYRKL MEDPKWKDYTSRFSEFSSWI
STNETQLKGIGEAIDTANHGEVKRAVEEIRNGVTKRGETLSWLKSRLKVLTEVSSENEA
QKQGDELAKLSSSFKALVTLSEVEKMLSNGDCVQYKEIVKNSLEELISGSKEVQEQA
KILD TENLFEAQQLLHHQKTKRISAKKRDVQQQIAQAQQGEGGLPDRGHEELRKLEST
LDGLERSRERQERRIQVTLRKRWERFETNKETVVRYLFQTGSSHERFLSFSSLESLSSELE
QTKEFSKRTE SIAVQAENLVKEASEIPLGPQNKQLLQQQAKSIKEQVKKLEDTLEEDIKT
MEMVKT KWDHFGSNFETLSVWITEKEKELNALETSSSAMDMQISQIKVTIQEIESKLSSI
VGLEEEAQSFAQFVTTGESARIKAKLTQIRRYGEELREHAQCLEGTILGHLSQQQKFEEN
LRKIQQSVSEFEDKLAVPIKICSSATETYKVLQE HMDLCALESLSAITAFSASARKVV
NRDSCVQEAALQQYEDILRRAKERQTALENLLAHWQRLEKELSSFLTWLERGEAKASS
PEMDISADRVKVEGELQLIQALQNEVVSQASFYSKLLQLKESLFSVASKDDVKMMKLHLE
QLDERWRDLPQIINKRINFLQSVVAEHQQFDELLLSFSVWIKLFLSELQTTSEISIMDHQ
VALTRHKDHAAEVESKKGELQSLQGHLAKLGLSLGRAEDLHLLQGKAEDCFQLFEEASQVV
ERRQLALSHLAEFLQSHASLSGILRQLRQTVEATNSMNKNESDLIEKDLNDALQNAKALE
SAAVSLDGILSKAQYHLKIGSSEQRTSCRATADQLCGEVERIQNLLGTKQSEADALAVLK
KAFQDQKEELLKSIEDIEERTDKERLKEPTRQALQQRLRVFNQLEDELNSHEHEL CWLKD
KAKQIAQKDVAFAPEVDREINRLEVTWDDTKRLIHENQQGCCGLIDLMREYQNLKSAVSK
VLENASSVIVTRTTIKDQEDLKWAFSKHETAKNMNYKQKDLNFTSKGKHLSELKkih
SSDFSLVKTDMESTVDKWLDVSEKLEENMDRLRVSLSIWDDVLSTRDEIEGWSNNCVPQM

AENISNLDNHLRAEELLKEFESEVKNKALRLEELHASKVNDLKELTKNLETPPDQLQFIAD
LMQKLEHAKEITEVAKGTLKDFTAQSTQVEKFINDITTWFTKVEESLMNCAQNETCEALK
KVKDIQKELQSQQSNISSTQENLNSLCRKYHSAELESGRAMTGLIKKHEAVSQLCSKTQ
ASLQESLEKHFSESMQEFQEWFLGAKAAAKESSDRTGDSKVLEAKLHDLQNILDSVSDGQ
SKLDAVTQEGQTLYAHLKQIVSSIQEQITKANEEFQAFLKQCLKDKQALQDCASELGSF
EDQHRKLNLIWHEMEERFNTENLGESKQHIPEKKNEVHKVEMFLGELLAARESCLKLSQR
GQLLSEEGHGAGQEGRLCSQLLTS HQNLLRMTKEKLRSCQVALQEHEALEEALQSMWFWV
KAIQDRACAESTLGSKDTLEKRLSQIQDILLMKGEGEVKLNMAIGKGEQALRSSNKEGQ
RVIQTQLETLKEVWADIMSSSVHAQSTLESVISQWNDYVERKNQLEQWMESVDQKIEHPL
QPQPGLKEKFLVLLDHLQSILSEAEDHTRALHRLIAKSRELYEKTEDESFKDTAQEELKTQ
FNDIMTVAKEKMRKVEEIVKDHLMYLDAVHEFTDWLHSAKEELHRWSDMSGDSSATQKKL
SKIKELIDSREIGASRLSRVESLAPEVKQNTTASGCELMHTEMQALRADWKQWEDSVFQT
QSCLENLVSQMALSEQEFSGQVAQLEQALEQFSALLKTWAQQLTLLEGKNTDEEIVECWH
KGQEILDALQKAEPRTEDLKSQNLNLCRFSRDLSTYSGKVSLIKEYNCLCLQASKGCQN
KEQILQQRFRKAFRDFQQLVNAKITTAKCFDIPQNISEVSTSLQKIQEFLSESENGQHK
LNMMLSKGELLSTLLTKEKAKGIQAKVTAAKEDWKNFHSNLHQKESALENLKIQMKDFEV
SAEPIQDWLSKTEKMHVHSSNRLYDLPKRREQQKLQSVLEEIHCYEPQLNRLKEKAQQL
WEGQAASKSFRHRVSQLSSQYLALSNTKEKVSRLDRIVAEHNQFSLGIKELQDWMTDAI
HMLDSYCHPTSDKSVLDSRTLKLEALLSVKQEKEIQMKMIVTRGESVLQNTSPEGIPTIQ
QQLQSVKDMWASLLSAGIRCKSQLEGALSKWTSYQDQVRFSGWMDSMEANLNERQHA
ELRDKTTMLGKAKLLNEEVLSYSSLLETIEVKGAGMTEHYVTQLELQDLQERYRAIQERA
KEAVTKSEKLVRLHQEYQRDLKAFEVWLGQEQEKLDQYSVLEGDATHHETTLRDLQELQV
HCAEGQALLNSVLHTREDVIPSGIPQAEDRALESRLQDWQAYQHRLSETRTQFNNVVNKL
RLMEQKFQQVDEWLKTAEEKVSPRTRRQSNRATKEIQLHQMKKWHEEVTAYRDEVEEVA
RAQEILDESHVNSRMGCQATQLTSRYQALLLQVLEQIKFLEEEIQSLEESESLSYSDW
YGSTHKNFKNVATKIDKVDTVMMGKKLKTLEVLLKDMEKGHSLLKSAREKGERAVKYLEE
GEAERLRKEIHDHMEQLKELTSTVRKEHMTLEKGLHLAKEFSKCKALTQWIAEYQEILH
VPEEPMELYEKKAQLSKYKSLQQTVLSHEPSVKS SVREKGEALLELVQDVTLKDKIDQLQ
SDYQDLCSIGKEHVFSLKAKVDHEDYNSELQVEKWLQMSGRLVAPDLETSSLETIT
QQLAHHKAMMEEIAGFEDRLNQLQMGDTLIGQCADHLQAKLKQNVHAHLQGTKDSYSAI
CSTAQRMYQSLEHELQKHVSRQDTLQCCQAWLSAVQPDLEPSPQPPLSRAEAIKQVKHFR
ALQEARTYLDLLCSMCDLSNASVKTAKDIQQTEQTIEQKLVQAQNLQGWEEIKHLKS
ELWIYLDADQQLQNMKRRHSELELNIAQNMVSVKDFVKKLQSKQASVNTIIEKVNKLT
KKEESPEHKEINHLNDQWLDLCRQSNLCLQREEDLQRTRDYHDCMNVVEVFLEKFTTEW
DNLARSDAESTAVHLEALKKALALQERKYAIEDLKDQKQKMIHNLDDKELVKEQTSH
LEQRWFQLEDLIKRIQVSVTNLEELNVVQSRFQELMEWAEEQQPNIAEALKQSPPPDMA
QNLLMDHLAICSELEAKQMLLSLIKDADRVMADLGLNERQVIQKALSDAQSHVNCLSDL
VGQRRKYLKALSEKTQFLMAVFQATSQIQQHERKIMFREHICLLPDDVSKQVKTCKSAQ
ASLKTYQNEVTGLWAQGRELMKEVTEQEKSEVLGKLQELQSVYDSVLQKCSHRLQELEKN
LVS RKHFKEDFDKACHWLKQADIVTFPEINLMNESSELHTQLAKYQNILEQSPEYENLLL
TLQRTGQTILPSLNEVDHSYLSEKLNALPRQFNIVALAKDKFYKVQEAILARKEYASLI

ELTTQSLSELEAQFLRMSKVPTDLAVEEALSLQDGCRAILDEVAGLGEAVDELNQQKEGF
RSTGQPWQPDKMLHLVTLYHRLKRQTEQRVSLEDDTTSSAYQEHEKMCQQLERQLKSVKEE
QSKVNEETLPAEEKLKMYSLAGSLQDSGIVLKRVTIHLEDLAPHLDPAYEKARHQIQS
WQGELKLLTSAIGETVTECESRMVQSIDFQTEMSRSLDWLRRVKAELSGPVYLDLNLQDI
QEEIRKIQIHQEEVQSSLRIMNALSHKEKEKFTKAKELISADLEHSLAELSELDGDIQEA
LRTRQATLTEIYSQCQRYVQVFAANDWLEDAQELLQLAGNGLDVESAEENLKSHMEFFS
TEDQFHSNLEELHSLVATLDPLIKPTGKEDLEQKVASLELRSQRMSRDSGAQVDLLQRCT
AQWHDYQKAREEVIELMNDTEKKLSEFSLKTSSSHEAEEKLSEHKALVSVVNSFHEKIV
ALEEKASQLEKTGNDASKATLSRSMTTVWQRWTRLRAVAQDQEKILEDVDEWTGFNNKV
KKATEMIDQLQDKLPGSSAEKASKAELLTLEYHDTFVLELEQQQSALGMLRQQTLSMLQ
DGAAPTPGEEPPLMQEITAMQDRCLNMQEKVKTNGKLVKQELKDREMVETQINSVKCWVQ
ETKEYLGNPTIEIDAQLEELQILLTEATNHRQNIKMAEEQKEKYLGLYILPSELSLQL
AEVALDLKIRDQIQDKIKEVEQSKATSQELSRQIQKLAKDLTTILTCLKAKTDNVVQAKT
DQKVLGEELDGCNSKLMELDAAVQKFLEQNGQLGKPLAKKIGKLTTELHQQTIRQAENRLS
KLNQAASHLEEYNEMLELILKWIEKAKVLAHGTIAWNSASQLREQYILHQTLLLESKEID
SELEAMTEKLQYLTSVYCTEKMSQQVAELGRETEELRQMIKIRLQNLQDAAKDMKKFEAE
LKKLQAALQAQATLTSPEVGRSLKEQLSHRQHLLSEMESLKPQVAVQLCQSALRIPE
DVVASLPLCHAALRLQEEASRLQHTAIQQCNIMQAAVVQYEQYEQEMKHLQQLIEGAHRE
IEDKPVATSNIQELQAQISRHEELAQKIKGYQEQIASLNSKCKMLTMKAKHATMLLTVTE
VEGLAEGTEDLDGELLPTPSAHPVMMTAGRCHTLLSPVTEESGEEGTNSEISSPPACR
SPSPVANTDASVNQDIAYYQALSAERLQTDAAKIHPSTSASQEFYEPGLEPSATAKLGDL
QRSWETLKNVISEKQRTLYEALERQQKYQDSLQSISTKMEAIELKLSSEPEPGRSPESQM
AEHQALMDEILMLQDEINELQSSLAEEVSESCADPAEQLALQSTLTVLAERMSTIRMK
ASGKRQLLEEKLNQLEEQRQEQALQRYRCEADELDSWLLSTKATLDTALSPPKEPMDME
AQLMDCQNMLVEIEQKVVALSELVHNENLLLEGKAHTKDEAEQLAGKLRRLKGSLELQ
RALHDKQLNMQGTAAQEKEESDVLDTATQSPGVQEWLAQARTTWTQQRQSSLQQQKELEQE
LAEQKSLLRSVASRGEEILIQHSAEETSGDAGEKPDVLSQELGMEGEKSSAEDQMRMKWE
SLHQEFSTKQKLLQNVLEQEQQVLYSRPNRLLSGVPLYKGDVPTQDKSAVTSLLDGLNQ
AFEEVSSQSGGAKRQSIHLEQKLYDGVSATSTWLDDVEERLFVATALLPEETETCLFNQE
ILAKDIKEMSEEMDKNKNLFSQAFPENGDNRDVIEDTLGCLLGRLSLLDSVVNQRCHQMK
ERLQQILNFQNDLKVLFDSLADNKYIILQKLANVFEQPVAEQIEAIQQAEDGLKEFDAGI
IELKRRGDKLQVEQPSMQELSKLQDMYDELMMIIGSRRSGLNQNLTLKSQYERALQDLAD
LLETGQEKMAGDQKIIVSSKEEIQQLLDKHKEYFQGLESHMILTETLFRKIISFAVQKET
QFHTELMAQASAVLKRAHKGVELEYILETWSHLDEDQQLSRQLEVVESSIPSVGLVEE
NEDRLIDRITLYQHLKSSLNEYQPKLYQVLDDGKRLLISISCSDESQNLNQLGECWLSNT
NKMSKELHRLETILKHWTRYQSESADLIHWLQSAKDRLEFWTQQSVTPQELEMVRDHLN
AFLEFSKEVDAQSSLKSSVLSTGNQLLRLKKVDTATLRSELSRIDSQWTDLLTNIPAVQE
KLHQLQMDKLPKRHAISEVMSWISLMENVIQKDEDNIKNSIGYKAIHEYLQKYKGFKIDI
NCKQLTVDFVNQSVLQISSQDVESKRSDKTDFAEQLGAMNKSQWILQGLVTEKIQLLEGL
LESWSEYENNVQCLKTWFETQEKRLKQQRHIGDQASVQNALKDCQDLEDLIKAKEKEVEK
IEQNGLALIQNKKEDVSSIVMSTLRELGQTTWANLDHVMGQLKILLKSVLDQWSSHKVAFD

KINSYLMEARYSLSRFRLTGSLEAVQVQVDNLQNLQDDLEKQERSLQKFGSITNQLLKE
CHPPVTETLTNTLKEVNMRWNNLLEEIAEQLQSSKALLQLWQRYKDYSKQCASTVQQQED
RTNELLKAATNKDIADDEVATWIQDCNDLLKGLGTVKDSLFFLHELGEQLKQQVDASAAS
AIQSDQLSLSQHLCALCALCKQQTSLQAGVLDYETFAKSLEALEAWIVEAEEILQGQDP
SHSSDLSTIQERMEELKGQMLKFSSMAPDLDRNLNELGYRLPLNDKEIKRMQNLNRHWSLI
SSQTTERFSKLQSFLQHQTFLEKCEWMEFLVQTEQKLAVEISGNYQHLLLEQQRAHEL
QAEMFSRQQILHSIIIDGQRLLLEQGQVDDRDEFNLKLTLLSNQWQGVIRRAQQRRGIIDS
QIRQWQRYREMAEKLRKWLVEVSYLPMSGLGSPVPIPLQQARTLFDEVQFKEKVFLRQQGS
YILTVEAGKQLLLSADSGAEAAALQAEIAIEQEKWKSASMRLEEQKKLAFLLKDWEKCEK
GIADSLEKLRTFKKLSQSPLDHHEELHAEQMRCKELENAVGSWTDDLTQLSLLKDTLSA
YISADDISILNERVELLQRQWEELCHQLSLRRQQIGERLNEWAVFSEKNKELCEWLTQME
SKVSQNGDILIEEMIEKLLKDYQEEIAIAQENKIQLQQMGERLAKASHESKASEIEYKLG
KVNDRWQHLLDLIAARVKKLKETLVAVQQLDKNMSSLRTWLAHIESELAKPIVYDSCNSE
EIQRKLEQQELQRDIEKHSTGVASVLNLCEVLLHDCDACATDAECDSIQQATRNLDRRW
RNICAMSMERRLKIEETWRLWQKFLDDYSRFEDWLKSSERTAAFPSSSGVIYTVAKEELK
KFEAFQRQVHECLTQLELINKQYRRLARENRTDSACSLKQMVHEGNQRWDNLQKRVT
SILRRLKHFIGQREEFETARDSILVWLTEMDLQLTNIEHFSECDVQAKIKQLKAFQQEISLNH
NKIEQIIAQGEQLIEKSEPLDAAIIIEELDELRRYQEVFGRVERYHKKLIRLPLPDEH
DLSDRELELEDSAAALSDDLHWHDRSADSLSPQPSSNLSLSLAQPLRSERSGRDTPASVDS
IPLWDHDYDLSRDLESAMSRALPSEDEEGQDDKDFYLRGAVALSGDHSALQSIRQLGK
ALDDSRFQIQQTENIIRSKTPTGPELDTSYKGYMKLLGECSSSIDSVKRLEHKLKEEES
LPGFVNLHSTETQTAGVIDRWELLQAQALSKELRMKQNLQKWQQFNSDLNSIWAWLGDTE
EELEQLQRLELSTDIQTIELQIKKLKELQKAVDHRKAIILSINLCSPEFTQADSKESRDL
QDRLSQMNGRWDRVCSLLEWRGLLQDALMQCQGFHEMESHGLLLMLLENIDRRKNEIVPID
SNLDAEILQDHHKQLMQIKHELLESQLRVASLQDMSCQLLVNAEGTDCLEAKEKVVHIGN
RLKLLLKEVSRHIKELEKLLDVSSSQDLSSWSSADELDTSGSVSPTSGRSTPNRQKTPR
GKCSLSQPGPSVSSPHSRSTKGGSDSSLSEPGPGRSGRGLFRVLRALPLQLLLLLLIG
LACLVPMSEEDYSCALSNNFARSFHPMLRYTNGPPPL

Quelle: UniProt (www.uniprot.org)

9 Literaturverzeichnis

- Aebi, U., J. Cohn, L. Buhle and L. Gerace (1986). "The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments." Nature **323**(6088): 560-4.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-10.
- Apel, E. D., R. M. Lewis, R. M. Grady and J. R. Sanes (2000). "Syne-1, a dystrophin- and Klarsicht-related protein associated with synaptic nuclei at the neuromuscular junction." J Biol Chem **275**(41): 31986-95.
- Barford, D. and B. G. Neel (1998). "Revealing mechanisms for SH2 domain mediated regulation of the protein tyrosine phosphatase SHP-2." Structure **6**(3): 249-54.
- Bennett, V. and A. J. Baines (2001). "Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues." Physiol Rev **81**(3): 1353-92.
- Bucher, W. (1997). Cytologie Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, Verlag Hans Huber.
- Burke, B. and C. L. Stewart (2002). "Life at the edge: the nuclear envelope and human disease." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(8): 575-85.
- Burke, T. R., Jr. and Z. Y. Zhang (1998). "Protein-tyrosine phosphatases: structure, mechanism, and inhibitor discovery." Biopolymers **47**(3): 225-41.
- Champion-Arnaud, P., M. C. Gesnel, N. Foulkes, C. Ronsin, P. Sassone-Corsi and R. Breathnach (1991). "Activation of transcription via AP-1 or CREB regulatory sites is blocked by protein tyrosine phosphatases." Oncogene **6**(7): 1203-9.
- Cohen, C. and D. A. Parry (1994). "Alpha-helical coiled coils: more facts and better predictions." Science **263**(5146): 488-9.

- Csoka, A. B., S. B. English, C. P. Simkevich, D. G. Ginzinger, A. J. Butte, G. P. Schatten, F. G. Rothman and J. M. Sedivy (2004). "Genome-scale expression profiling of Hutchinson-Gilford progeria syndrome reveals widespread transcriptional misregulation leading to mesodermal/mesenchymal defects and accelerated atherosclerosis." *Aging Cell* **3**(4): 235-43.
- De Matteis, M. A. and J. S. Morrow (2000). "Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway." *J Cell Sci* **113 (Pt 13)**: 2331-43.
- Drews, U. (2007). Histo Web, University of Tübingen.
- Eriksson, M., W. T. Brown, L. B. Gordon, M. W. Glynn, J. Singer, L. Scott, M. R. Erdos, C. M. Robbins, T. Y. Moses, P. Berglund, A. Dutra, E. Pak, S. Durkin, A. B. Csoka, M. Boehnke, T. W. Glover and F. S. Collins (2003). "Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome." *Nature* **423**(6937): 293-8.
- Faul, C., K. Asanuma, E. Yanagida-Asanuma, K. Kim and P. Mundel (2007). "Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton." *Trends Cell Biol* **17**(9): 428-37.
- Ferner, H. and I. Mueller (1961). "[The formation of the cap structure (acrosome) in spermatozoa development in the mouse weasel (*Mustela nivalis* L.)]."
Z Zellforsch Mikrosk Anat **54**: 105-17.
- Gibson, I. W., I. Downie, T. T. Downie, S. W. Han, I. A. More and G. B. Lindop (1992). "The parietal podocyte: a study of the vascular pole of the human glomerulus." *Kidney Int* **41**(1): 211-4.
- Glatz-Krieger, K. (2007). PathoPic, University of Basel.
- Goldman, R. D., D. K. Shumaker, M. R. Erdos, M. Eriksson, A. E. Goldman, L. B. Gordon, Y. Gruenbaum, S. Khuon, M. Mendez, R. Varga and F. S. Collins (2004). "Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(24): 8963-8.

- Gough, L. L. and K. A. Beck (2004). "The spectrin family member Syne-1 functions in retrograde transport from Golgi to ER." Biochim Biophys Acta **1693**(1): 29-36.
- Gough, L. L., J. Fan, S. Chu, S. Winnick and K. A. Beck (2003). "Golgi localization of Syne-1." Mol Biol Cell **14**(6): 2410-24.
- Gruenbaum, Y., A. Margalit, R. D. Goldman, D. K. Shumaker and K. L. Wilson (2005). "The nuclear lamina comes of age." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(1): 21-31.
- Grum, V. L., D. Li, R. I. MacDonald and A. Mondragon (1999). "Structures of two repeats of spectrin suggest models of flexibility." Cell **98**(4): 523-35.
- Gyuris, J., E. Golemis, H. Chertkov and R. Brent (1993). "Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2." Cell **75**(4): 791-803.
- Hartwig, J. H. (1994). "Actin-binding proteins 1: spectrin superfamily." Protein Profile **1**(7): 706-78.
- Hunter, T. (1995). "Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling." Cell **80**(2): 225-36.
- Ibarra-Sanchez, M. J., P. D. Simoncic, F. R. Nestel, P. Duplay, W. S. Lapp and M. L. Tremblay (2000). "The T-cell protein tyrosine phosphatase." Semin Immunol **12**(4): 379-86.
- Ichimura, K., H. Kurihara and T. Sakai (2007). "Actin filament organization of foot processes in vertebrate glomerular podocytes." Cell Tissue Res **329**(3): 541-57.
- Jastrow, D. m. H. (2007). Elektronenmikroskopischer Atlas von Zellen, Geweben und Organen im Internet.
- Kierszenbaum, A. L., E. Rivkin and L. L. Tres (2003). "Acroplaxome, an F-actin-keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head." Mol Biol Cell **14**(11): 4628-40.

- Kierszenbaum, A. L., E. Rivkin and L. L. Tres (2003). "The actin-based motor myosin Va is a component of the acroplaxome, an acrosome-nuclear envelope junctional plate, and of manchette-associated vesicles." Cytogenet Genome Res **103**(3-4): 337-44.
- Kobayashi, Y., Y. Katanosaka, Y. Iwata, M. Matsuoka, M. Shigekawa and S. Wakabayashi (2006). "Identification and characterization of GSRP-56, a novel Golgi-localized spectrin repeat-containing protein." Exp Cell Res **312**(16): 3152-64.
- Kreidberg, J. A., M. J. Donovan, S. L. Goldstein, H. Rennke, K. Shepherd, R. C. Jones and R. Jaenisch (1996). "Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis." Development **122**(11): 3537-47.
- Kühnel, W. (1999). Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie, Georg Thieme Verlag.
- Langford, G. M. (1999). "ER transport on actin filaments in squid giant axon: implications for signal transduction at synapse." Faseb J **13 Suppl 2**: S248-50.
- Mbassa, G., M. Elger and W. Kriz (1988). "The ultrastructural organization of the basement membrane of Bowman's capsule in the rat renal corpuscle." Cell Tissue Res **253**(1): 151-63.
- Mislow, J. M., J. M. Holaska, M. S. Kim, K. K. Lee, M. Segura-Totten, K. L. Wilson and E. M. McNally (2002). "Nesprin-1alpha self-associates and binds directly to emerin and lamin A in vitro." FEBS Lett **525**(1-3): 135-40.
- Mislow, J. M., M. S. Kim, D. B. Davis and E. M. McNally (2002). "Myne-1, a spectrin repeat transmembrane protein of the myocyte inner nuclear membrane, interacts with lamin A/C." J Cell Sci **115**(Pt 1): 61-70.
- Mosinger, B., Jr., U. Tillmann, H. Westphal and M. L. Tremblay (1992). "Cloning and characterization of a mouse cDNA encoding a cytoplasmic protein-tyrosine-phosphatase." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(2): 499-503.
- Mustelin, T. and A. Altman (1989). "Do CD4 and CD8 control T-cell activation via a specific tyrosine protein kinase?" Immunol Today **10**(6): 189-92.

- Nagase, T., K. Ishikawa, M. Suyama, R. Kikuno, M. Hirose, N. Miyajima, A. Tanaka, H. Kotani, N. Nomura and O. Ohara (1998). "Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro." DNA Res **5**(6): 355-64.
- Neel, B. G. and N. K. Tonks (1997). "Protein tyrosine phosphatases in signal transduction." Curr Opin Cell Biol **9**(2): 193-204.
- Padmakumar, V. C., S. Abraham, S. Braune, A. A. Noegel, B. Tunggal, I. Karakesisoglou and E. Korenbaum (2004). "Enaptin, a giant actin-binding protein, is an element of the nuclear membrane and the actin cytoskeleton." Exp Cell Res **295**(2): 330-9.
- Pascual, J., J. Castresana and M. Saraste (1997). "Evolution of the spectrin repeat." Bioessays **19**(9): 811-7.
- Porsche, A. (2001). Identifikation von Interaktionspartnern der T-Zell Protein-Tyrosin-Phosphatase durch das Lex-A Two Hybrid, University of Konstanz. **414**.
- Pulido, R., N. X. Krueger, C. Serra-Pages, H. Saito and M. Streuli (1995). "Molecular characterization of the human transmembrane protein-tyrosine phosphatase delta. Evidence for tissue-specific expression of alternative human transmembrane protein-tyrosine phosphatase delta isoforms." J Biol Chem **270**(12): 6722-8.
- Reddy, R. S. and G. Swarup (1995). "Alternative splicing generates four different forms of a non-transmembrane protein tyrosine phosphatase mRNA." DNA Cell Biol **14**(12): 1007-15.
- Scaffidi, P., L. Gordon and T. Misteli (2005). "The cell nucleus and aging: tantalizing clues and hopeful promises." PLoS Biol **3**(11): e395.
- Sonnhammer, E. L. and J. C. Wootton (1998). "Dynamic contact maps of protein structures." J Mol Graph Model **16**(1): 1-5, 33.

- Spang, A., J. M. Herrmann, S. Hamamoto and R. Schekman (2001). "The ADP ribosylation factor-nucleotide exchange factors Gea1p and Gea2p have overlapping, but not redundant functions in retrograde transport from the Golgi to the endoplasmic reticulum." Mol Biol Cell **12**(4): 1035-45.
- Starr, D. A. and M. Han (2002). "Role of ANC-1 in tethering nuclei to the actin cytoskeleton." Science **298**(5592): 406-9.
- Sterba, G. and G. Bruckner (1967). "[On the function of the ependymal glia in the neurohypophysis]." Z Zellforsch Mikrosk Anat **81**(4): 457-73.
- Sun, Q. Y. and H. Schatten (2006). "Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization." Reproduction **131**(2): 193-205.
- Tabb, J. S., B. J. Molyneaux, D. L. Cohen, S. A. Kuznetsov and G. M. Langford (1998). "Transport of ER vesicles on actin filaments in neurons by myosin V." J Cell Sci **111 (Pt 21)**: 3221-34.
- Thorne-Tjomsland, G., Y. Clermont and L. Hermo (1988). "Contribution of the Golgi apparatus components to the formation of the acrosomic system and chromatoid body in rat spermatids." Anat Rec **221**(2): 591-8.
- Warren, D. T., Q. Zhang, P. L. Weissberg and C. M. Shanahan (2005). "Nesprins: intracellular scaffolds that maintain cell architecture and coordinate cell function?" Expert Rev Mol Med **7**(11): 1-15.
- Wheeler, M. A., J. D. Davies, Q. Zhang, L. J. Emerson, J. Hunt, C. M. Shanahan and J. A. Ellis (2007). "Distinct functional domains in nesprin-1alpha and nesprin-2beta bind directly to emerin and both interactions are disrupted in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy." Exp Cell Res **313**(13): 2845-57.
- Zastrow, M. S., S. Vlcek and K. L. Wilson (2004). "Proteins that bind A-type lamins: integrating isolated clues." J Cell Sci **117**(Pt 7): 979-87.
- Zhang, Q., J. N. Skepper, F. Yang, J. D. Davies, L. Hegyi, R. G. Roberts, P. L. Weissberg, J. A. Ellis and C. M. Shanahan (2001). "Nesprins: a novel family of spectrin-repeat-containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues." J Cell Sci **114**(Pt 24): 4485-98.

Zur histologischen Identifikation und Charakterisierung von Organen und Geweben wurden folgende Quellen verwendet:

Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie (Kühnel 1999);

Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen (Bucher 1997);

PathoPic online der Universität Basel (Glatz-Krieger 2007);

<http://alf3.urz.unibas.ch/pathopic/>

Elektronenmikroskopischer Atlas von Zellen, Geweben und Organen im Internet (Jastrow 2007);

<http://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/EMAlles.html>

Histo Web online der Universität Tübingen (Drews 2007) .

<http://www.anatomie.uni-tuebingen.de/project/projII/HistoWeb/>

10 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Akt	Protein Kinase B (im englischen Sprachgebrauch)
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
BSA	Rinderserumalbumin
Ca	Calcium
cDNA	klonale Desoxyribonukleinsäure
cRNA	klonale Ribonukleinsäure
C-terminal	carboxy-terminal
Cy3	Indocarbocyanin

DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
GAP	GTPase aktivierendes Protein
IgG	Immunglobulin G
h	Stunde
kb	Kilo-Basenpaare
M	molar
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
N-terminal	amino-terminal
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pH	negativer dekadische Logarithmus der Aktivität der Oxoniumionen
PKB	Protein Kinase B
PKC δ	Protein Kinase C δ
PSA	Penicillin, Streptomycin, Ampicillin
PTK	Protein Tyrosin Kinase
PTP	Protein Tyrosin Phosphatase
PTPIP	Protein Tyrosin Phosphatase Interagierendes Protein
PTP1B	Protein Tyrosin Phosphatase 1B
Ras	„Rat sarcoma“ (Rattensarkom): ein Proto-Onkogen
Reca1	Endothelzell-Antikörper
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Rowswell Park Memorial Institut: ein Zellkulturmedium
S.	Seite
s.	siehe

s.o.	siehe oben
Src	„Rous sarcoma virus“- eine proto-onkogene Tyrosinkinase
s. u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TCPTP	T-Zell Protein Tyrosin Phosphatase
TNMT	Tris-Natriumchlorid-Magnesiumchlorid-Triton-Base
Tris	Trishydroxymethyl-Aminomethan
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
TTBS	Tris gepufferte Salzlösung mit 0,5ml Tween 20 auf 1l TBS
U	Unit
u. a.	unter anderem
z. B.	zum Beispiel

11 Veröffentlichung

Poster

Schulte T, Tag C, Stenzinger A, Wimmer M

Institute of Anatomy and Cell Biology, Justus-Liebig-University Giessen, 35385
Giessen

Specific tissue- and organ-distribution of P30 - a spectrin-like protein

Kongress der anatomischen Gesellschaft 2007 (30. März bis 2. April 07) in Gießen

12 Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Allen bedanken, die mir geholfen haben, diese Arbeit zu erstellen, insbesondere bei allen Mitarbeitern des Institutes für Anatomie.

Besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Wimmer, die mir das Thema der Arbeit überlassen hat und mich kontinuierlich bei der Durchführung unterstützt hat. Ebenfalls danken möchte ich Frau Claudia Tag, die mir sowohl bei experimentellen, als auch persönlichen Fragen immer zur Seite stand und sich sehr für das Gelingen der Arbeit eingesetzt hat.

Ein herzlicher Dank gebührt auch meiner Familie, meiner Frau Tanja und meinem Sohn Justus, die mich immer unterstützt haben, sowie meinen Eltern, die mir ein Studium ermöglicht haben und ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ebenfalls danken möchte ich meinem Großvater, Günter Wilhelm, der immer an mich geglaubt hat und dessen Vertrauen ein großer Ansporn für mich war.

13 Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

14 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Thomas Schulte-Kreutz
Geburtsdatum	12.11.1978
Geburtsort	Wickede (Ruhr)
Staatsbürgerschaft	deutsch
Familienstand	verheiratet
Eltern	Werner und Gabriele Schulte

Schulbildung

1986-1990	Gemeinschaftsgrundschule St. Johannes Balve
1990-1998	Abitur am Walburgisgymnasium Menden
1998-1999	Zivildienst St. Vincenz Krankenhaus Menden
2000-2006	Studium der Humanmedizin an der Justus Liebig Universität Gießen
Oktober 2006	3. Staatsexamen

Berufliche Tätigkeit

2007	Assistenzarzt der Chirurgie im Evangelischen Krankenhaus in Gießen (Chefarzt Prof. Dr. Karl-Heinz Muhrer)
------	---