

Etablierung und Analyse von „knock-out“  
Mausmodellen der  $\sigma$ 1-Untereinheiten des  
AP-1 Komplexes

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
**Jennifer Baltes**  
aus Saarbrücken

Göttingen 2008

D7

Referent: Prof. Dr. K. von Figura  
Institut für Biochemie II, Zentrum Biochemie und Molekulare Zellbiologie  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

Korreferent: Prof. Dr. R. Ficner  
Institut für Mikrobiologie und Genetik  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

Tag der mündlichen Prüfung: 22.1.2008

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	1
1.1 Vesikulärer Transport	1
1.1.1 Clathrin	4
1.1.2.1 AP-1 vermittelte Vesikelbildung	11
1.1.2.2 Adaptorproteinkomplex-Erkennungsmotive	13
1.1.2.3 Interaktionen von AP-1 mit akzessorischen Proteinen	16
1.1.3 GGA Adaptoren	19
1.1.4 AP-1 vermittelter Transport	22
1.2 Maus „knock-out“ Modelle der AP-1 Adaptine	25
1.2.1 Phänotyp der $\gamma$ -„knock-out“ Mäuse	25
1.2.2 Phänotyp der $\mu 1$ -„knock-out“ Mäuse	26
1.2.3 Phänotyp der $\sigma 1B$ -„knock-out“ Mäuse	26
<b>2. Fragestellung</b>	28
<b>3. Material und Methoden</b>	29
3.1 Häufig verwendete Lösungen und Geräte	29
3.1.1 Puffer	29
3.1.2 Nährmedien	29
3.1.3 Geräte	30
3.1.4 Zentrifugen und Rotoren	30
3.2 Molekularbiologische Methoden	31
3.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien	31
3.2.2 Fällung von DNA durch Ethanol	31
3.2.3 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA	32
3.2.4 RNA Isolierung aus Geweben	32
3.2.5 Quantifizierung von Nukleinsäuren	33
3.2.6 PCR	33
3.2.6.1 PCR-Ansatz zur Genotypisierung der $\sigma 1B^{-/-}$ Mäuse	35
3.2.6.2 PCR zur Genotypisierung der $\sigma 1A$ Gene Trap-Mäuse	36
3.2.7 Restriktionsverdau von DNA	38
3.2.8 Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA auf Agarosegelen	38
3.2.9 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	40
3.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten	41

---

3.2.11 Präparation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> - Zellen .....	42
3.2.12 Transformation chemisch kompetenter <i>E.coli</i> - Zellen .....	42
3.2.13 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> über QIAprep Spin Plasmid Miniprep Säulen.....	43
3.2.14 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> über QIAprep Spin Plasmid Midiprep Säulen.....	43
3.2.15 DNA-Sequenzierung .....	44
3.2.16 Northern-Blot .....	45
3.2.16.1 Auftrennung der RNA mittels Gelelektrophorese .....	45
3.2.16.2 Transfer der RNA auf eine Nylonmembran.....	45
3.2.16.3 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden .....	46
3.2.16.4 Hybridisierung.....	47
3.2.16.5 Strippen der Membran eines Northern-Blot .....	47
3.2.17 Southern Blot.....	48
3.3 Zellbiologische Methoden.....	49
3.3.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen.....	49
3.3.2 Bestimmung der Zellzahl .....	50
3.3.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	51
3.3.4 Herstellung Maus-embryonaler Fibroblasten (MEF) .....	51
3.3.5 Differenzierung von MEF bzw. 3T3-L1-Zellen zu Adipozyten .....	52
3.3.6 ES-Zellkultur .....	53
3.3.6.1 Medien und Lösungen .....	53
3.3.6.2 Gelatinisieren der Zellkulturflaschen .....	54
3.3.6.3 Kultivierung und mitotische Inaktivierung von Neomycin- resistenten Mausfibroblasten.....	54
3.3.6.4 Kultivierung muriner, embryonaler Stammzellen .....	54
3.3.7 stabile Transfektion von 3T3-L1-Zellen.....	55
3.4 Tierexperimentelle Methoden.....	56
3.4.1 Zucht und Analyse der Mäuse .....	56
3.4.2 Gewinnung von Serum .....	56
3.4.3.1 Ermittlung verschiedener Parameter von Mausurin .....	56
3.4.3.2 Assay zur Bestimmung der Harnstoffkonzentration im Mausurin	57
3.4.4 Glukosetoleranz Test.....	57
3.4.5 Fettdiät.....	57
3.4.6 Messung der Triglyceridkonzentration im Serum.....	57

---

3.5 Proteinbiochemische Methoden .....	58
3.5.1 Ganzzellproteinextraktion aus Zellen.....	58
3.5.2 Herstellung von Gewebehomogenat.....	58
3.5.3 Proteinbestimmung nach Bradford .....	59
3.5.4 Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) nach Laemmli.....	59
3.5.5 Proteintransfer auf Nitrozellulose ( Western Blot ) .....	62
3.5.5.1 Halbtrockenblot.....	63
3.5.5.2 Nassblot.....	63
3.5.5.3 Immunfärbung auf Nitrozellulose/PVDF-Membranen.....	64
3.6 sonstige Methoden .....	66
3.6.1 ELISA zur Messung von Serumkonzentrationen verschiedener Adipokine .....	66
3.6.2 FACS ( <i>fluorescence-activated cell sorting</i> ) – Analyse von isolierten Adipozyten.....	67
3.6.3 Anfärbung von Adipozyten mit Oil Red O .....	67
<b>4. Ergebnisse</b> .....	69
4.1 Phänotypisierung des $\sigma$ 1B-defizienten Mausstamms.....	69
4.1.1 Wasserhaushalt der $\sigma$ 1B-defizienten Mäuse.....	69
4.1.2 Serumanalyse $\sigma$ 1B-defizienter Mäuse.....	78
4.1.3 $\sigma$ 1B-abhängige Funktion von Fettgeweben.....	79
4.1.3.1 Charakterisierung des Fettgewebes .....	80
4.1.3.2 Funktionelle Untersuchung des Fettgewebes.....	83
4.1.3.2.1 Glukosetoleranz der $\sigma$ 1B-defizienten Mäuse .....	83
4.1.3.2.2 Konzentrationen von Adipozytokinen im Serum .....	85
4.1.3.2.3 Einfluss einer fettreichen Diät auf das Gewicht $\sigma$ 1B-defizienter Mäuse .....	87
4.1.3.3 Differenzierung des Fettgewebes .....	90
4.1.4 Verhaltensstudien an $\sigma$ 1B-defizienten Mäusen .....	100

---

## Abkürzungen

Å	Ångström
Abb.	Abbildung
ad	„auf Endvolumen auffüllen“
a.d.	aqua destillata
ADP	Adenosindiphosphat
AP	Adaptorproteinkomplex
APS	Amoniumpersulfat
ARF	ADP-ribosylation factor
BFA	Brefeldin A
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CCV	„clathrin coated vesicle“
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie ( $2.22 \times 10^6$ „counts per minute“)
COP	„coat protein“
c-terminal	carboxyterminal
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	Desoxyribonukleotid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

---

EGF	„epithelial growth factor“
ELISA	„Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay“
En	„engrailed“
ENTH	„epsin N-terminal homology“
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	ER-Golgi „intermediate compartment“
ES	embryonale Stammzellen
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat.: und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	„fluorescence-activated cell sorting“
FKS	foetales Kälberserum
g	Gramm
GAE	„ $\gamma$ -adaptin-ear-homologous“
GAP	GTPase-aktivierende Proteine
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAT	„GGA and TOM1“
GDP	Guanosintriphosphat
GEF	GDP-nukleotide exchange factor
GGA	„Golgi-localised, $\gamma$ -ear-containing, ARF-binding proteins“
GLUT4	Glukose Transporter 4
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
HRP	Meerrettichperoxidase
IgG	ImmunglobulinG
i.p.	intraperitoneal
k	Kilo
kb	Kilobasen
ko	„knock out“
L	Liter
LB	„lysogeny broth“
M	Molar

---

mA	Milliampere
MEF	Maus embryonale Fibroblasten
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilber
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
mRNA	„Messenger“ Ribonukleinsäure
µg	Microgramm
µL	Microliter
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
n-terminal	aminoterminal
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PI-3-P	Phosphatidylinositol-3-phosphat
PI-4-P	Phosphatidylinositol-4-phosphat
PI-4,5P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PM	Plasmamembran
pM	Picomolar
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
rpm	„rounds per minute“
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat



---

SNARE	"SNAP and NSF attachment receptors"
SSC	„Standard Saline Citrate“
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TE	Tris/HCl EDTA
TEMED	N, N, N', N'Tetramethyldiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Enzymeinheit (Unit)
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
vgl.	vergleiche
VHS	Vps27p, Hrs und STAM
<i>WT</i>	Wildtyp
w/v	Gewicht zu Volumen
v/v	Volumenverhältnis
xg	x fache Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel

## **1. Einleitung**

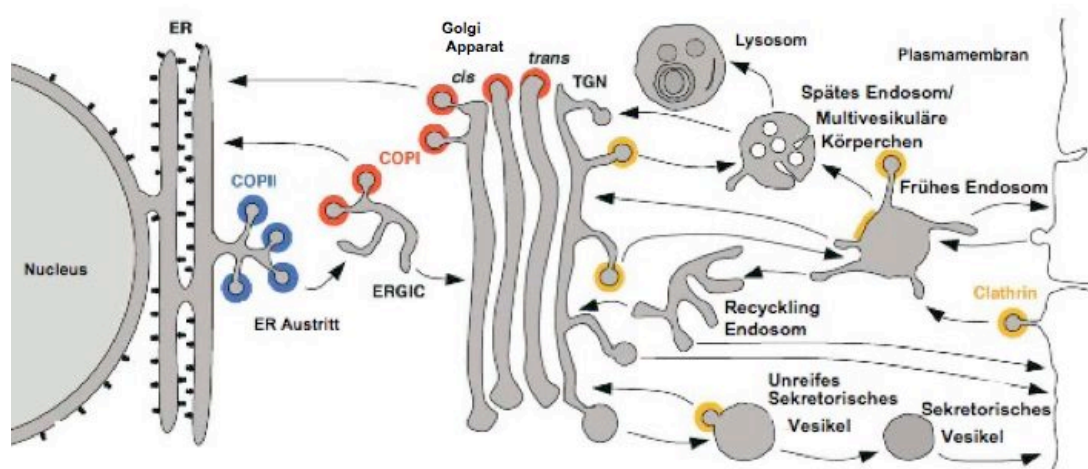
Der vesikuläre Transport in der eukaryotischen Zelle spielt sowohl eine zentrale Rolle in der Bildung als auch der Aufrechterhaltung von Kompartimenten sowie in der Kommunikation von Zellen. Im biosynthetisch-sekretorischen Transportweg der Zelle werden neu synthetisierte Proteine vom endoplasmatischen Retikulum (ER) über den Golgi-Apparat zu Endosomen und Lysosomen, der Plasmamembran oder sekretorischen Organellen sortiert. Der endozytotische Weg führt umgekehrt von der Plasmamembran zu den genannten intrazellulären Kompartimenten.

Die einzelnen Transportschritte werden von Vesikeln übernommen, deren Bildung einem generellen Mechanismus folgt: Die spezifische Lipidzusammensetzung und die zytoplasmatisch angelagerten Proteine bewirken eine Krümmung der „Donor“-Membran. Die Anlagerung weiterer Proteine führt zur Knospung des Vesikels. Die Endphase ist charakterisiert durch die Trennung des „Membranstiels“ der Knospe. Daran beteiligt sind mechanoaktive Proteine und Zytoskelettkomponenten. Entlang einem Netzwerk aus Zytoskelettfilamenten transportieren Motorproteine das Vesikel zum Zielkompartiment. Spezifische Interaktionen führen dort zum Andocken und Fusionieren mit der „Acceptor“-Membran. Zuvor muss allerdings die Schicht aus angelagerten Proteinen auseinanderfallen. Um Protein-Sortierungsfunktionen zu erfüllen, muss jedes gebildete Vesikel spezifische Komponenten enthalten. Es darf nur die adäquaten Proteine tragen, um mit der richtigen Zielmembran fusionieren zu können. Dies erfordert zahlreiche konzertierte und regulierte Proteininteraktionen.

### ***1.1 Vesikulärer Transport***

Genetische und biochemische Studien in den vergangenen vierzig Jahren haben zu einem detaillierten Bild der molekularen Mechanismen des selektiven Proteintransports zwischen Zellorganellen geführt. Die den sekretorischen Transportweg bildenden Vesikel sind alle mit spezifischen

Proteinhüllen besetzt, die die Knospung der Membran und die selektive Erkennung der zu transportierenden Proteine (Cargo) steuern. Der Transport vom ER zum Golgi-Apparat wird von COP-II („coat protein“-umhüllten Vesikeln vermittelt (vgl. Abbildung 1). Sie werden an speziellen Stellen des ER, Ribosomen-freies Übergangs-ER genannt, zusammengebaut. Hefe-Studien schreiben dem Übergangs-ER eine wichtige Rolle in der Golgi-Morphologie zu (Glick, 2002). COP-II besteht aus zwei dimeren Unterkomplexen und einer kleinen GTPase, die in einem stöchiometrischen Verhältnis eingebaut ist. COP-I-Vesikel bewegen sich zwischen den einzelnen Golgi-Zisternen und sind für den Rücktransport vom Golgi zum ER verantwortlich. Der COP-I-Komplex setzt sich aus sieben, stabil miteinander verbundenen Untereinheiten zusammen. Sie sind in einem trimeren und zwei dimeren Subkomplexen organisiert. Auf dem Weg vom ER zum Golgi oder zurück wird das Zwischenkompartiment, „ER-Golgi intermediate compartment“ (ERGIC), passiert (siehe Abbildung 1).



### Abbildung 1: Vesikulärer Transport in einer Säugertierzelle

Dieses Schema beschreibt den Proteintransport in sekretorischen, endozytotischen und lysosomalen Kompartimenten. Die Pfeile stellen die einzelnen Transportschritte dar. Die Lage der Coatproteine ist farblich kodiert. (COP-I – rot; COP-II – blau; Clathrin – gelb) Clathrin bildet heterogene Komplexe mit verschiedenen Adaptorproteinen an unterschiedlichen Membranen (vgl. hierzu Abbildung 3). ER – Endoplasmatisches Retikulum; ERGIC - „ER-Golgi intermediate compartment“; TGN – trans-Golgi-Netzwerk (modifiziert nach Bonifacino und Glick, 2004)

Clathrin, in Gemeinschaft mit unterschiedlichen Adaptorproteinkomplexen, vermittelt den Transport auf verschiedenen Routen zwischen dem trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und der Plasmamembran (PM). Wie in der Abbildung 1 zu sehen, dient das TGN als Sortierungsstelle und Ausgangspunkt für verschiedene Transportwege. Welchen Weg ein Vesikel nimmt, wird vom Cargo und dem assoziierten Adaptorproteinkomplex bestimmt.

Um sicherzustellen, dass ein Vesikel von einer bestimmten Membranstelle knospt und dabei selektiv seine zu transportierenden Proteine einschließt, leisten viele weitere regulatorische Proteine ihren Beitrag zur Vesikelbildung. Integrale Membranproteine dienen den Hüllproteinen als Andockstelle. Auch Membraneigenschaften beeinflussen diesen Prozess. Durch biosynthetische Enzyme wird eine Kompartiment-Domänen-spezifische Zusammensetzung von Phospholipiden geschaffen. Viele Proteine der Transportmaschinerie enthalten bestimmte Erkennungsmotive für Phosphatidylinositolphosphate.

Die Membranbindung der Cargo-sortierenden Proteine wird zusätzlich durch monomere GTPasen, den ARF-Proteinen („ADP-ribosylation factor) reguliert (Nie und Randazzo, 2006). G-Proteine gehen von einer inaktiven GDP-gebundenen Form in eine GTP-gebundene, aktive Form über und umgekehrt. Dieser GDP-GTP Kreislauf der kleinen GTPasen ist Bestandteil der räumlichen und zeitlichen Ausprägung der Vesikelbildung. Auf der einen Seite binden verschiedene GDP-Nukleotid-Austausch-Faktoren (GDP-nucleotide exchange factor) oder GEFs für eine GTPase an unterschiedlichen Membranen und führen zu bestimmten Vesikelpopulationen. GTPase-aktivierende Proteine (GAP) oder GDP-Dissoziations-Inhibitoren (GDI) determinieren auf der anderen Seite das Zeitfenster für die Etablierung spezifischer Interaktionen.

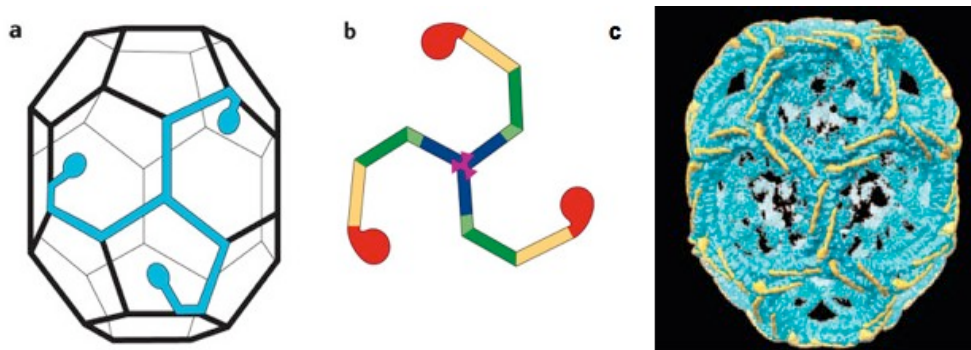
Einige der Proteine, die während der Vesikelformation als Cargo-Proteine eingestuft sind, gehören auch zur Transportmaschinerie. Rab Proteine, eine zweite Familie der kleinen GTPasen, verknüpfen die Vesikel mit dem Zytoskelett und regeln ihr korrektes Andocken an der Zielmembran. SNARE-Proteine vermitteln den letzten Schritt des Transports, die Fusion der Membranen. SNARE-Proteine sitzen in der Vesikel- und in der Zielmembran. Spezifisches Andocken setzt die Bildung des korrekten SNARE-Komplexes

voraus, was gleichzeitig die Membranoberflächen einander annähert und die Fusion vorbereitet (zusammengefasst in Jahn *et al.*, 2003).

### 1.1.1 Clathrin

Transportvesikel werden anhand der Komponenten ihrer sie umgebenden Proteinhülle klassifiziert. Eine der bekanntesten und am genauesten charakterisierten Klasse sind die sogenannten dreischichtigen Clathrin umhüllten Vesikel (clathrin-coated vesicles; CCV). Ihren Namen haben diese Vesikel von dem Protein Clathrin, welches den Hauptbestandteil der Vesikelhülle darstellt, indem es ein polymeres Gerüst an der Vesikeloberfläche bildet. Die innenliegende Membran-Schicht mit ihren eingebetteten Cargo-Proteinen wird mit der Clathrinschicht durch eine mittlere Ebene verbunden. Diese Schicht kann aus verschiedenen Clathrin-Adaptor-Proteinen und deren Bindepartnern gebildet werden, die unterschiedliche, z.T. regulatorische Funktionen während des Vesikelzusammenbaus haben. Bislang wurden zwanzig verschiedene Adaptoren beschrieben (Owen *et al.*, 2004). Viele von ihnen interagieren mit einer Vielzahl weiterer Proteine, so dass ein kompliziertes Netzwerk möglicher Wechselwirkungen entsteht.

Eine Clathrinhülle ist eine dreidimensionale Anordnung von sogenannten Triskelia. Jedes Triskelion besteht aus drei schweren Ketten (190 kDa) und drei leichten Ketten (25 kDa). Diese Triskelia polymerisieren in gleichmäßige, polyedrische Gitter. Dabei liegt das Zentrum jeder Einheit auf einer Ecke und die Beine führen strahlenförmig auf die Kanten des Vielecks (vgl. Abbildung 2). Die N-terminalen Domänen der schweren Ketten zeigen nach innen, um einen Kontakt zu den Adaptorproteinen herzustellen, die Clathrin an die Membran rekrutieren.



### Abbildung 2: Clathrin-Aufbau:

(a) Schema eines Clathrin-Käfigs mit der Position eines blau hervorgehobenen Triskelions; (b) eine schematische Darstellung eines Triskelions, die die einzelnen Domänen farblich codiert: rot – terminale Domäne:  $\beta$ -Propeller; gelb – Knöcheldomäne: „Clathrin-heavy-chain-repeat“ (CHCR) Module 0-2; dunkelgrün – distale Domäne: CHCR 3-5; Knie-Domäne: CHCR5; blau - proximale Domäne: CHCR6,7; violett – Trimerisationsdomäne: Helikaler Dreifuß; (c) Rekonstruktion eines Clathrin-Käfigs aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen und Röntgenstrukturen; die leichten Ketten sind in gelb hervorgehoben. Modifiziert nach (Heldwein *et al.*, 2004)

Aufgereinigtes Clathrin kann *in vitro* bei leicht saurem pH spontan Polyeder bilden (Kirchhausen und Harrison, 1981). Unter physiologischen Bedingungen sind Adaptorproteine nötig, um eine Polymerisation zu erreichen. Die entstehenden Hüllen sind kleiner und regelmäßiger (Pearse und Robinson, 1984).

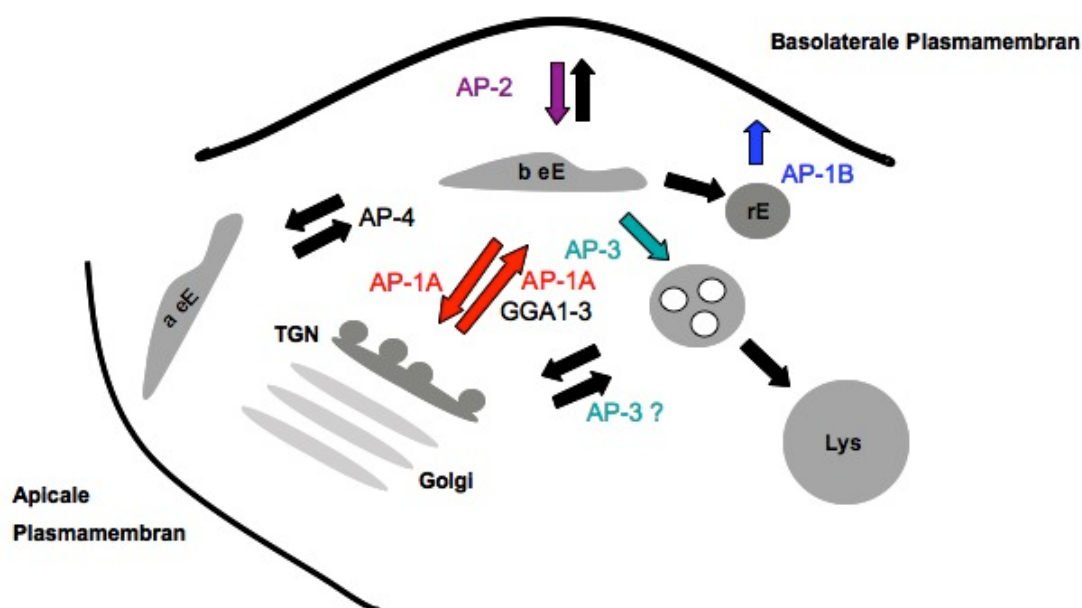
Clathrin spielt eine Rolle in zahlreichen Transportschritten, vor allem bei der Endozytose an der Plasmamembran und bei den Sortierungsmechanismen zwischen dem TGN und den endosomalen Kompartimenten. Clathrin umhüllte Vesikel an der Plasmamembran und am TGN sind nicht statisch, sondern dynamische Strukturen. Mit Hilfe von „fluorescence recovery after photobleaching“ (FRAP) konnte gezeigt werden, dass Clathrin und Adaptine an Membranen, zusammen und unabhängig voneinander, schnell durch freie Moleküle aus dem Zytosol ausgetauscht werden (Wu *et al.*, 2003). Eine weitere Studie hat durch elektronenmikroskopische Aufnahmen von Clathrin-defizienten Zellen gezeigt, dass Membrandomänen, die mit Adaptorproteinen dekoriert sind, keine Krümmung aufweisen (Hinrichsen *et al.*, 2006). Dies

weist darauf hin, dass Clathrin notwendig ist, um eine Einstülpung der Membran zu erreichen und dass eine Rekrutierung von Proteinen, die eine Beugung der Membran bewirken (z.B. wie Epsin), durch Clathrin stabilisiert wird. Abgesehen von der wichtigen Rolle, die Clathrin im vesikulären Transport spielt, wurden kürzlich zwei neue, unkonventionelle Aufgaben von Clathrin beschrieben: Die schwere Kette von Clathrin wurde in Proteomanalysen an der mitotischen Spindel gefunden (Andersen *et al.*, 2003) und später eine für sie stabilisierende Rolle beschrieben (Royle *et al.*, 2005). Eine kürzlich erschienene Studie kann dieses Ergebnis zwar in der humanen Zelllinie HEK293 verifizieren, nicht jedoch in einer B-Lymphomzelllinie aus Huhn, so dass eine zellspezifische Funktion diskutiert wird (Borlido *et al.*, 2008). Gemeinsam mit AP-1 bildet Clathrin ein stabilisierendes Gerüst für die initiale Faltung von von Willebrand-Faktor Multimeren zu Filamenten, die die Bildung eines „Zigarren-förmigen“ Weibel-Pallade Körperchens steuern (Lui-Roberts *et al.*, 2005).

### 1.1.2 Adaptorprotein-Komplexe

Ursprünglich wurden zwei Adaptorprotein-Komplexe, AP-1 und AP-2, aus Clathrin-umhüllten Vesikeln aufgereinigt (reviewed in (Hirst und Robinson, 1998; Robinson und Bonifacino, 2001; Schu, 2001)). Da sie den Zusammenbau von Clathrinkäfigen *in vitro* fördern, wurden sie auch „assembly polypeptides“ oder Adaptine genannt (Pearse und Robinson, 1984). AP-1 bindet am TGN und an Endosomen, wohingegen AP-2 an der Plasmamembran sitzt. Zwei weitere Mitglieder der Familie, AP-3 und AP-4, wurden bei Recherchen in cDNA-Datenbanken gefunden (Pevsner *et al.*, 1994; Hirst *et al.*, 1999). Ursprünglich wurde eine perinukleäre Lokalisation von AP-3 beschrieben, wie sie für das TGN üblich ist (Dell'Angelica *et al.*, 1997a; Simpson *et al.*, 1997). Neuere Studien zeigen aber eine hauptsächlich endosomale Verteilung in der Zelle und ein AP-3 vermittelter Transport von den frühen Endosomen zu Lysosomen konnte für das virale Protein gp48 gezeigt werden (Reusch *et al.*, 2002; Peden *et al.*, 2004). Die Rolle von Clathrin an der AP-3-Vesikelbildung ist nicht geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass AP-3 mit Clathrin interagiert (Dell'Angelica *et al.*, 1998) und

kolokalisiert ist (Simpson *et al.*, 1997; Peden *et al.*, 2004). In aufgereinigten CCVs aus Hirngewebe konnte bisher kein AP-3 gefunden werden (Simpson *et al.*, 1996; Dell'Angelica *et al.*, 1997b; Blondeau *et al.*, 2004). Funktionelle Studien mit mutiertem AP-3 Clathrin-Bindemotiv zeigten ebenfalls keine Interaktion. Es scheinen jedoch Clathrin-assoziierte, wie auch Clathrin-freie Populationen in der Zelle zu existieren (Peden *et al.*, 2004). Aus der humanen, epithelialen Tumorzelllinie HeLa konnten AP-3 gebundene CCVs isoliert werden (Borner *et al.*, 2007). Es könnte daher sein, dass die Clathrin-AP-3 Bindung sehr fragil ist oder die Menge an AP-3-bindenden, Clathrin-umhüllten Vesikeln in unterschiedlichen Zelltypen variiert (Newell-Litwa *et al.*, 2007). Der AP-4 Komplex besitzt keine klassische Clathrin-Box und es wurde auch keine spezifische Interaktion nachgewiesen. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde jedoch AP-4 in der Nachbarschaft von Clathrin detektiert (Barois und Bakke, 2005).



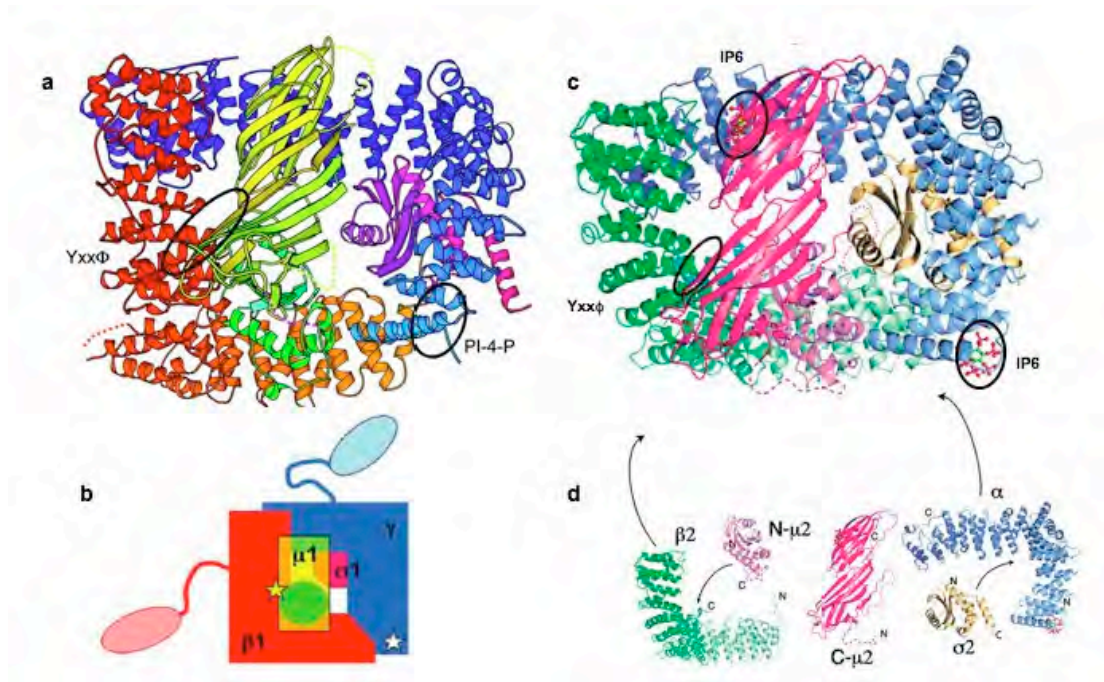
**Abbildung 3: Spezifische, von Adaptorproteinen vermittelte Transportwege**

TGN: Trans-Golgi-Netzwerk; b eE: basolaterales frühes Endosom; a eE: apicales frühes Endosom; Lys: Lysosom, rE: recycling Endosom weitere Erklärungen siehe Text (nach Schu, 2005).



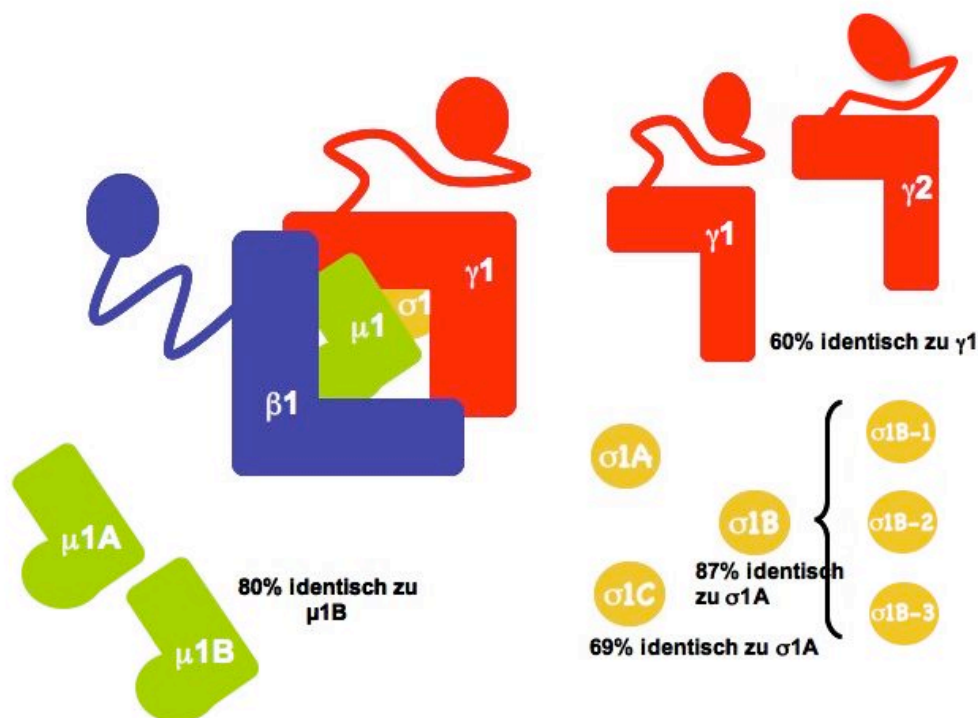
Alle Adaptorproteinkomplexe bestehen aus 4 verschiedenen Untereinheiten (Adaptinen). Die jeweils zwei großen Untereinheiten  $\gamma/\alpha/\delta/\epsilon$ , entsprechend den Komplexen AP-1 bis 4 zugeordnet, und  $\beta$ 1-4 sind ungefähr 100 kDa schwer. Ihr amino-terminales Ende bildet eine globuläre „trunk“(Rumpf)-Domäne, die über eine unstrukturierte „hinge“(Scharnier)-Domäne mit der carboxy-terminalen „ear“(Ohr)-Domäne verbunden ist. Die beiden „trunk“-Domänen bilden zusammen mit den mittelgroßen Untereinheiten  $\mu$ 1-4 (ca. 50 kDa) und den kleinen Untereinheiten  $\sigma$ 1-4 (ca. 20 kDa) den Kern des Komplexes. Zwischen AP-1 und AP-2 sind  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2, mit einer Sequenzhomologie von 84%, die am höchsten konservierten Untereinheiten. Die Sequenzen der  $\mu$ - und  $\sigma$ -Adaptine sind zu 40% identisch, wohingegen nur 25% der Aminosäurereste von  $\gamma$  und  $\alpha$  (AP-1 und AP-2) konserviert sind. Diese geringere Übereinstimmung liegt vor allem in den Unterschieden der Ohr-Domänen begründet. Vergleiche der Kristallstrukturen von AP-1 und AP-2 zeigen jedoch übereinstimmende Tertiärstrukturen und Komplextopologien, so dass diese Kristallstrukturen als Modell für die gesamte Familie dienen. Die großen Untereinheiten bilden aus  $\alpha$ -Helices gebogene Bereiche, in deren jeweiliger Krümmung die globuläre Domäne von  $\sigma$ 1 und  $\sigma$ 2 an  $\gamma$  bzw.  $\alpha$  und der N-Terminus der  $\mu$ -Untereinheiten an den  $\beta$ -Adaptinen binden.  $\sigma$ 2 und N- $\mu$ 2 bestehen beide aus einem zentralen 5-strängigen  $\beta$ -Faltblatt, umgeben von  $\alpha$ -Helices, wobei die Sequenzen keine signifikanten Homologien aufweisen. N- $\mu$ 2 ist durch eine 23-Aminosäuren lange Schleife mit der carboxyterminalen Domäne verbunden. Diese besteht nur aus  $\beta$ -Faltblättern. Alle Untereinheiten haben innerhalb des Komplexes Kontakt zueinander, aber die Bindungen zwischen  $\alpha$  und  $\sigma$ 2 sowie  $\beta$ 2 und  $\mu$ 2 sind stabiler. Phylogenetische Analysen weisen daraufhin, dass sich die AP- und COP-Komplexe ausgehend von einem Dimeren-Komplex aus einer großen und einer kleinen Untereinheit entwickelt haben (Schledzewski *et al.*, 1999). Am Kern des AP-2 Komplexes befinden sich zwei PI-4,5-P<sub>2</sub> Bindestellen, eine in der C-terminalen Domäne von  $\mu$ 2 und eine am amino-terminalen Ende der  $\alpha$ -Untereinheit (siehe Abbildung 4). Die von Heldwein *et al.* 2004 veröffentlichte Röntgen-Kristallstruktur des AP-1 zeigt, dass die  $\gamma$ -Untereinheit eine PI-4-P

Bindungsstelle besitzt, aber die  $\mu$ 1-Untereinheit, im Gegensatz zu  $\mu$ 2, kein Phosphatidylinositolphosphat-Bindemotiv trägt.



**Abbildung 4: Struktur und Zusammensetzung von (a) AP-1 und (b) AP-2**  
 Einzelne Untereinheiten sind durch die entsprechenden Farben, wie sie den Schemata (b) und (d) zu entnehmen sind, gekennzeichnet. Die jeweilige Yxx $\Phi$  Bindestelle ist durch ein Oval und die PI-4-P Bindestelle im AP-1 und die durch D-myo-inositol-hexakisphosphate (IP6) besetzte PI-4,5-P<sub>2</sub> –Bindestelle im AP2 durch einen Kreis hervorgehoben. In der  $\mu$ 1-Untereinheit des AP-1 fehlt im Vergleich zur  $\mu$ 2-Untereinheit die Phosphatidylinositol-Bindestelle. (Collins *et al.*, 2002; Heldwein *et al.*, 2004)

Der Kern der Adaptorkomplexe misst ungefähr 100 Å x 80 Å, wobei sich die Scharnier-Domäne der beiden großen Untereinheiten wahrscheinlich bis zu 200-300 Å weit erstrecken kann, da sie keine stabile Sekundärstruktur hat. Daher können sich die Ohr-Domänen weit entfernt vom membrangebundenen Kern des Komplexes befinden und im Zytoplasma mit anderen Proteinen interagieren.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Isoformen der Untereinheiten des AP-1.**

Sowohl für  $\gamma$  als auch für  $\mu$  sind je zwei Isoformen bekannt. Für  $\sigma$  sind sogar drei Isoformen beschrieben.  $\sigma$ 1B wurde in drei Spleißvarianten nachgewiesen.

Für viele der Adaptine sind bei Säugetieren Isoformen beschrieben, die durch mehrere Gene kodiert sind. Lediglich für  $\alpha$ -Adaptin wurden zusätzlich Spleißvarianten gefunden. Im Fall des AP-1 wird für alle beteiligten Proteine, außer der  $\beta$ 1-Untereinheit, mindestens eine alternative Isoform exprimiert. Eine schematische Zusammenstellung dieser Proteine zeigt Abbildung 5. Die  $\gamma$ 2-Isoform ist zu 60% homolog zum  $\gamma$ 1-Adaptin. Sie ist in der variablen Scharnier-Region verkürzt. Im Gegensatz zur  $\gamma$ 1-Untereinheit kann im „yeast-two-hybrid“-System keine Interaktion von  $\gamma$ 2 zur  $\beta$ -Untereinheit nachgewiesen werden. Dies deutet daraufhin, dass es keinen *in vivo* Komplex mit  $\gamma$ 2 gibt.

Drei Gene sind für das  $\sigma$ 1-Adaptin bekannt,  $\sigma$ 1A, -B und -C. Sie zeigen eine 70-80%-ige Identität auf Proteinebene (Riel, 2004). *In vitro* binden  $\sigma$ 1A und  $\sigma$ 1B an beide  $\gamma$ -Isoformen (Takatsu *et al.*, 1998; Takatsu *et al.*, 2001). Darüberhinaus wurden in unserem Labor drei unterschiedlich Spleißvarianten

für das  $\sigma$ 1B-Gen beschrieben. Sie zeigen ein gewebsspezifisches Expressionsmuster. Die mRNA von  $\sigma$ 1B1 wurde hauptsächlich im Herz und in Fettgewebe nachgewiesen,  $\sigma$ 1B2 vor allem im Gehirn und  $\sigma$ 1B3 ist am dominantesten im Skelettmuskel exprimiert (Riel, 2004).

Zusätzlich zur ubiquitär vorhandenen Untereinheit  $\mu$ 1A wird in polarisierten, epithelialen Zellen  $\mu$ 1B exprimiert und in den abweichenden Komplex AP-1B eingebunden (Fölsch *et al.*, 1999; Ohno *et al.*, 1999; Eskelinen *et al.*, 2002).  $\alpha$ -Adaptin existiert in zwei verschiedenen Varianten,  $\alpha$ A und  $\alpha$ C, die zu 80% identisch sind (Ball *et al.*, 1995). Zusätzlich zu einer ubiquitären Isoform von  $\sigma$ 3,  $\sigma$ 3B sind neuronale Untereinheiten für  $\mu$ 3-Adaptin,  $\mu$ 3B und  $\beta$ 3-Adaptin bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass diese Untereinheiten einen alternativen AP-3B Komplex in Neuronen bilden (Faundez *et al.*, 1998). Für AP-4 wurden keine Isoformen beschrieben.

### 1.1.2.1 AP-1 vermittelte Vesikelbildung

Der Mechanismus der Bildung von Clathrin-umhüllten Vesikeln und den sich anschließenden Vorgängen wurde am ausführlichsten für AP-2 im Verlauf der Endozytose untersucht, da diese experimentell leicht zugänglich ist. Aufgrund der Themenstellung dieser Arbeit wird im Folgenden aber ausschließlich der Mechanismus der Vesikelbildung durch den AP-1 im Detail beschrieben.

Die hochaffine Membranbindung von AP-1 benötigt drei Faktoren: Cargo-Protein, PI-4-P und ARF-1<sup>GTP</sup>. Die Reihenfolge, in der diese Bindungen etabliert werden, ist nicht bekannt. Wahrscheinlich wird die Bildung der Hülle durch eine Rekrutierung von ARF1 an die Membran initiiert. Dort wird es mit Hilfe eines Brefeldin A (BFA)-sensitiven GEF in seine GTP gebundene Form überführt. Unter den vielen für ARF1 bekannten GEF Proteinen scheint BIG2 ein guter Kandidat, da seine Überexpression den Effekt von BFA auf AP-1, aber nicht auf COP-I beeinflusst. Aktiviertes ARF1 bindet direkt an  $\gamma$ -Adaptin und an  $\beta$ -Adaptin (Shinotsuka *et al.*, 2002). Aber Letzteres kann auch mit anderen ARFs interagieren (Austin *et al.*, 2002).

AP-1 erkennt Sortierungsmotive in der zytoplasmatischen Domäne von Cargo-Proteinen, um diese anzukonzentrieren und in Vesikel zu verpacken (siehe 1.1.2.2). Tyrosin-basierte Motive binden an die  $\mu$ -Untereinheit, vor allem nach seiner Phosphorylierung. Dies bewirkt eine Konformationsänderung, bei der die C-terminale Domäne aufklappt, wodurch die Bindestelle zugänglich wird (Collins *et al.*, 2002; Ricotta *et al.*, 2002; Ghosh und Kornfeld, 2003 b). Die Kinase GAK/Auxilin2 bindet an die  $\gamma$ -Adaptin Ohr-Domäne des AP-1 und gilt daher als Kandidat für die Phosphorylierung (Umeda *et al.*, 2000).  $\beta$ 1,  $\mu$ 1-Adaptine und ein Dimer aus  $\gamma$  und  $\sigma$ 1 wurden als Bindepartner für Leucin-basierte Motive beschrieben (Bremnes *et al.*, 1998 ; Rapoport *et al.*, 1998; Janvier *et al.*, 2003). Da Cargo-Proteine und ARF1 *in vivo* in verschiedenen Membrankompartimenten sind, können sie nicht die Stelle des Hüllenzusammenbaus bestimmen. Zusätzlich zu diesen Interaktionen muss eine direkte Bindung von AP-1 an ein Phosphatidylinositolphosphat, nämlich PI-4-P, stattfinden (Wang *et al.*, 2003). Analog zu AP-2, dessen Membranlokalisation durch PI-4,5-P<sub>2</sub>-Bindung gesteuert wird, könnte die Phospholipid-Interaktion von  $\gamma$  und  $\mu$ 1 vermittelt werden (Collins *et al.*, 2002). Bisher wurde aber nur eine Bindestelle in der  $\gamma$ -Untereinheit beschrieben (Heldwein *et al.*, 2004). Die Phospholipidzusammensetzung ist eine individuelle und dynamische Eigenschaft jeden Kompartiments, da die sie bildenden und abbauenden Enzyme spezifisch verteilt und reguliert sind. So spielt PI-4,5-P<sub>2</sub> eine wichtige Rolle in der Plasmamembran, wohingegen PI-3-P in Endosomen und PI-4-P im Golgi-Apparat angereichert sind. Die Bindung von AP-1 an die Membran ist also von mehreren Komponenten abhängig, eine genaue Abfolge der Interaktionen ist aber nicht bekannt. Da für ARF1 und Clathrin eine Aufgabe in der Regulation des Phosphatidylinositolphosphatmetabolismus diskutiert wird, könnte es eine „Feedback“-Aktivierung geben (Godi *et al.*, 1999; Gaidarov *et al.*, 2001).

Clathrin wird durch eine Bindung an die beiden großen Untereinheiten von AP-1 an den umhüllten Membranausstülpungen fixiert. Jede „hinge“-Region enthält zwei „clathrin-box“ Motive der Sequenz LL(N/D)L(D/L), die *in vitro* eine Clathrin Zusammenlagerung bewirken (ter Haar *et al.*, 1998; Doray und

Kornfeld, 2001). Weitere Schritte des Knospens der Vesikel sind nur unzureichend verstanden. Es ist wahrscheinlich die Aktivität der GTPase Dynamin notwendig. Das Ablösen der Proteinhülle von den fertig geformten Vesikeln erfordert die Phosphorylierung der  $\beta$ 1-Untereinheit, wodurch die Bindung an Clathrin zerstört wird (Wilde und Brodsky, 1996; Ghosh und Kornfeld, 2003 b). Die Rekrutierung von Hsc70 („heat shock cognate protein“) (Hannan *et al.*, 1998) durch Auxilin und die folgende ATP-Hydrolyse sowie die Dephosphorylierung der  $\mu$ 1-Untereinheit durch die Proteinphosphatase PP2A (Doray und Kornfeld, 2001; Ricotta *et al.*, 2008) und damit ihre geringere Affinität für Erkennungsmotive spielen eine wichtige Rolle im Ablöseprozess von Clathrin und AP-1.

### 1.1.2.2 Adaptorproteinkomplex-Erkennungsmotive

Mindestens drei Klassen von Sortierungssignalen im Zusammenhang mit AP-1 vermitteltem Transport wurden bisher beschrieben (Bonifacino und Traub, 2003). Am besten untersucht sind die Tyrosin-basierten Motive mit der Konsensussequenz Yxx $\phi$  (Y entspricht Tyrosin,  $\phi$  steht für einen sperrigen, hydrophoben Aminosäurerest), die ausschließlich von der mittleren Untereinheit  $\mu$  erkannt werden. Eine Kokristallisation der  $\mu$ 2-C-terminalen Domäne mit Peptiden, die ein Tyr-Motiv enthalten, bestätigten die Bindestelle (Owen und Evans, 1998). Yxx $\phi$ -Motive sind an vielen Transportschritten beteiligt, darunter Endozytose, lysosomaler Transport und Sortierung zur basolateralen Membran (Marks *et al.*, 1996; Bonifacino und Traub, 2003). Alle vier Adaptorproteinkomplexe binden *in vitro* übereinstimmend an Yxx $\phi$ -Motive, zeigen dabei aber unterschiedliche Präferenzen für bestimmte Motive (Ohno *et al.*, 1998). Die umliegenden Reste als auch die Lage des Motivs innerhalb der zytoplasmatischen Domäne des Cargo-Proteins tragen zur Spezifität bei. Endozytotische Motive wurden meist 10-40 Aminosäuren von der Transmembrandomäne entfernt gefunden, nicht jedoch am C-Terminus des Proteins. Im Gegenteil dazu liegen Motive für den lysosomalen Transport nur 6-9 Reste von der Transmembrandomäne entfernt oder nah am C-Terminus. Wie für das lysosomale Membranprotein Lamp1 gezeigt wurde,

interferiert eine Veränderung der Distanz des GYQTI-Signals von der Membran mit der Sortierung in die Lysosomen, aber nicht mit der Internalisierung an der Plasmamembran (Rohrer *et al.*, 1996).

Ein weiteres Tyr-basiertes Motiv mit der Konsensussequenz FxNPxY ist nur an der Clathrin-vermittelten Endozytose beteiligt. Peptide, die dieses Signal einschließen, können *in vivo* an die N-terminale Domäne der schweren Kette von Clathrin und an aufgereinigtes AP-2 binden. Es ist aber noch unklar, ob diese Interaktion *in vivo* an der Sortierung beteiligt ist. Außerdem gibt es eine Gruppe von monomeren Adaptorproteinen, wie ARH, Dab2 und numb, die initial „akzessorische Proteine“ genannt und als Tyrosin-bindende Proteine beschrieben wurden (siehe 1.1.2.3). Funktionell sind sie an den intrazellulären Signalwegen von Rezeptortyrosinkinasen beteiligt. Sie zeigen eine Affinität für das unphosphorylierte Peptid FxNPxY und werden über Interaktionen mit AP-2, Phospholipiden und Clathrin in umhüllte Vesikel eingebaut.

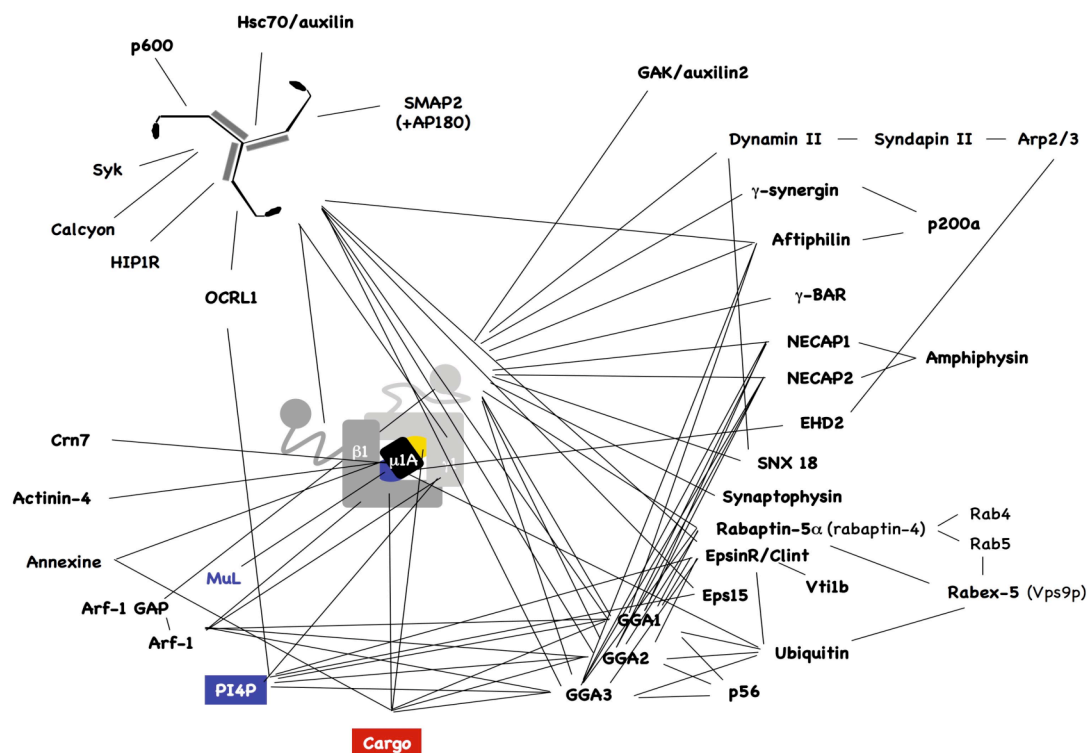
Leucin-basierte Motive wurden als bestimmender Faktor für die Sortierung an der Plasmamembran und am TGN zu den Endosomen und Lysosomen identifiziert. Es gibt offenbar zwei unterschiedliche Klassen. (D,E)xxxL(L,I)-Signale binden, wie Yxx $\phi$ , an Adaptor Komplexe und zeigen Präferenzen für bestimmte Komplexe. Diese Peptide liegen sowohl nahe an Transmembrandomänen als auch am C-Terminus. Der saure Rest an der ersten Position ist nicht unbedingt notwendig, aber bevorzugt. Konkurrenzexperimente mit Tyr- und Leu-Motiven haben gezeigt, dass sie von unabhängigen Bindestellen erkannt werden (Marks *et al.*, 1996). Es wurde von einigen Untereinheiten gezeigt, dass sie eine solche Bindestelle besitzen. Mehrere *in vitro* Studien zeigen dies für  $\mu$ , und  $\beta$  wurde an dieses Peptid über „crosslinker“ gebunden (Rapoport *et al.*, 1998; Hofmann *et al.*, 1999). In Yeast-3-Hybrid-Experimenten konnte eine Interaktion zwischen (D,E)xxxL(L,I)-Signalen und einem Dimer aus  $\gamma$ 1- $\sigma$ 1,  $\alpha$ - $\sigma$ 2 und  $\delta$ - $\sigma$ 3 nachgewiesen werden, wohingegen keine der Untereinheiten von AP-1, AP-2 oder AP-3 alleine an dieses Motiv gebunden hat (Janvier *et al.*, 2003; Doray *et al.*, 2007). Die zweite Klasse der Leu-basierten Motive, DxxLL scheint für den Transport zwischen dem TGN und den Endosomen benötigt zu werden (Reusch *et al.*, 2002). Da den Leucinen innerhalb dieser Sequenz im

Allgemeinen mehrere saure Aminosäurereste vorangehen, werden diese auch saure-Cluster-Dileucin Motive genannt. In diesem Fall kann das Aspartat (D) nicht ersetzt werden. Im Gegensatz zu den (D,E)xxxL(L,I)-Signalen bindet DxxLL *in vitro* nicht an AP-Komplexe, aber an die monomeren Adaptoren der GGA-Familie (Puertollano *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2001) (s.1.1.3).

Eine weitere Familie von Sortierungsmotiven besteht aus einer Folge von Aminosäuren, die ein bis drei Phosphorylierungsstellen für die Caseinkinase II (CKII) enthält. Dieses Motiv ist in vielen Transmembranproteinen zu finden, die zwischen dem TGN und Endosomen zirkulieren. Eine Phosphorylierung durch CK-II ist vor allem für den Rücktransport von den Endosomen zum TGN notwendig. Für das Protein PACS1 (phosphofurin acidic cluster sorting protein 1) konnte gezeigt werden, dass es sowohl phosphorylierte, saure Gruppen als auch AP-1 und AP-3 bindet. Die Bindungsfläche am AP-1 wurde auf  $\mu$  und  $\sigma$  identifiziert (Wan *et al.*, 1998; Crump *et al.*, 2001).



### 1.1.2.3 Interaktionen von AP-1 mit akzessorischen Proteinen



**Abbildung 6: Das Netzwerk aus AP-1 und seinen Interaktionspartnern**  
Die Verbindungslinien zwischen den einzelnen Proteinen symbolisieren eine Interaktion.

Es wurden zusätzliche Interaktionspartner beschrieben, von denen angenommen wird, dass sie ein für AP-1 CCVs spezifisches Umfeld generieren. Die meisten dieser „accessory proteins“ binden an die Ohr-Domänen der großen Untereinheiten von AP-1, wobei  $\gamma$ 1 Interaktionen die höchste Affinität besitzen. Da diese Domänen unter den Adaptinen die geringste Ähnlichkeit aufweisen, werden sehr spezifische Verbindungen eingegangen. In Abbildung 6 sind die AP-1 bindenden Proteine dargestellt und die Interaktionen zwischen den Komponenten durch Linien symbolisiert. Von diesen Proteinen können nicht alle im Folgenden ausführlich diskutiert werden, so dass ich mich auf die beschränke, über die die meisten Informationen vorliegen. Von den meisten dieser Proteine sind die Funktionen nicht bekannt und auch die Bedeutung der Bindung an AP-1 ist nur für einige untersucht. Zur letzteren Gruppe gehört das ARF1GAP, welches für die Auflösung der Proteinhülle benötigt wird. Des Weiteren kann man Rabaptin5

dazu zählen, das *in vitro* an die Ohrdomänen von  $\gamma 1$  und  $\gamma 2$  bindet. Es dient als bivalenter Linker zwischen Rab5 und Rab4, zwei GTPasen, die im endosomalen Transport wichtig sind (Stenmark *et al.*, 1995). Es wurde gezeigt, dass es mit einem Dimer aus  $\gamma 1$  und  $\sigma 1$  an Endosomen interagiert und diesen mit Rab4 verbindet (Deneka *et al.*, 2003). Ob dies während der Hüllenbildung stattfindet oder bei späteren Transportprozessen eine Rolle spielt, ist nicht bekannt.

Nach derzeitigem Kenntnisstand kann man die weiteren Proteine in zwei Klassen einteilen. Solche, denen ebenfalls Proteinsortierungsfunktionen zugeschrieben werden und solche, die keine Sortierungsfunktion im Laufe der Vesikelbildung zu zeigen scheinen. Zu denen mit Sortierungsfunktion zählen die GGA-Proteine, die im folgenden Kapitel genauer beschrieben werden. EpsinR und Eps15 könnten ebenfalls Sortierungsfunktionen erfüllen. Eps15 wurde vor allem im Kontext der Clathrin vermittelten Endocytose charakterisiert. Obwohl es schon länger bekannt war, dass es eine BFA-sensitive, perinukleäre Anfärbung zeigt (Kent *et al.*, 2002), ist erst kürzlich *in vivo* eine Interaktion mit AP-1 beschrieben worden, die im MPR-abhängigen Transport (siehe 1.1.4) wichtig zu sein scheint (Chi *et al.*, 2008). EpsinR (synonym zu Enthoprotin/Clint) gehört zu einer Gruppe von Proteinen, die mit ihren „epsin N-terminal homology“ oder ENTH-Domänen mit PI-4-P interagieren (Hirst *et al.*, 2003; Mills *et al.*, 2003). Überraschenderweise zeigte die Kristallstruktur der verwandten Epsin1 ENTH-Domäne in der Anwesenheit von Phospholipidmolekülen, im Vergleich zur lipidfreien Form, eine zusätzliche amphipathische  $\alpha$ -Helix (Ford *et al.*, 2002). Bei einer Inkubation mit Liposomen erzeugt diese ENTH-Domäne dünne, tubuläre Strukturen. Diese Beobachtung führte zu dem Schluss, dass ENTH Proteine eine amphipathische Helix in die Membran einbauen können und damit eine Krümmung erzeugen. Obwohl EpsinR scheinbar mit geringerer Affinität an Membranen bindet, ist die bewegliche Helixregion konserviert. Ähnlich zu Eps15 ist EpsinR in CCVs angereichert und wird ARF-abhängig, aber AP-1-unabhängig an die Membran gebunden. Es kann sogar direkt an Clathrin (Mills *et al.*, 2003) und das SNARE Protein Vti1b (Chidambaram *et al.*, 2004) binden. Dies stützt die Rolle als „tethering“- und Stabilisierungsfaktor der

Hüllenbildung. Alle Mitglieder interagieren und kolokalisieren mit AP-2 und Clathrin (Chen *et al.*, 1998). Die beiden Hefeproteine der Epsinfamilie, Ent1p und Ent2p, vermitteln die Endozytose von ubiquitinylierten Rezeptoren. Epsine in Säugern besitzen ein Ubiquitin-Interaktionsmotiv (UIM), so dass sie wahrscheinlich ebenfalls die Endozytose ubiquitinylierter Rezeptoren, wie „epithelial growth factor receptor“ (EGFRs), steuern. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass in Säugetierzellen mit einem gleichzeitigen „knock-down“ durch RNAi von eps15/eps15R und Epsin ubiquitinylierte EGF-Rezeptoren in der Zellmembran verbleiben (Sigismund *et al.*, 2005). Sowohl Epsin als auch eps15 interagieren preferentiell mit polyubiquitinylierten Ketten (Hawryluk *et al.*, 2006). Die anderen Mitglieder dieser Gruppe haben kein UIM. Zudem konnte bislang keine direkte Interaktion mit Cargomolekülen beobachtet werden, so dass eine hauptsächlich die Vesikelhülle stabilisierende und formgebende Funktion denkbar ist (Ahle und Ungewickell, 1986; Meyerholz *et al.*, 2005).

$\gamma$ -synergine assoziiert mit cytosolischem und membrangebundenen AP-1 und ist in CCVs angereichert. Sowohl eine GTPase als auch AP-1 sind für eine Rekrutierung zur Membran notwendig. Des Weiteren enthält es eine Eps15-Homologie (EH) Domäne, ein unter Endozytose-Proteinen übliches Modul, das an die Tripeptidyl-Sequenz NPF bindet. Dies legt eine Funktion als Verknüpfungsprotein nahe (Page *et al.*, 1999; Hirst *et al.*, 2003).  $\gamma$ -synergine und EspinR Bindemotive an der  $\gamma$ 1-Ohr-Domäne überlappen und eine Aminosäure ist an der Bindung beider beteiligt.

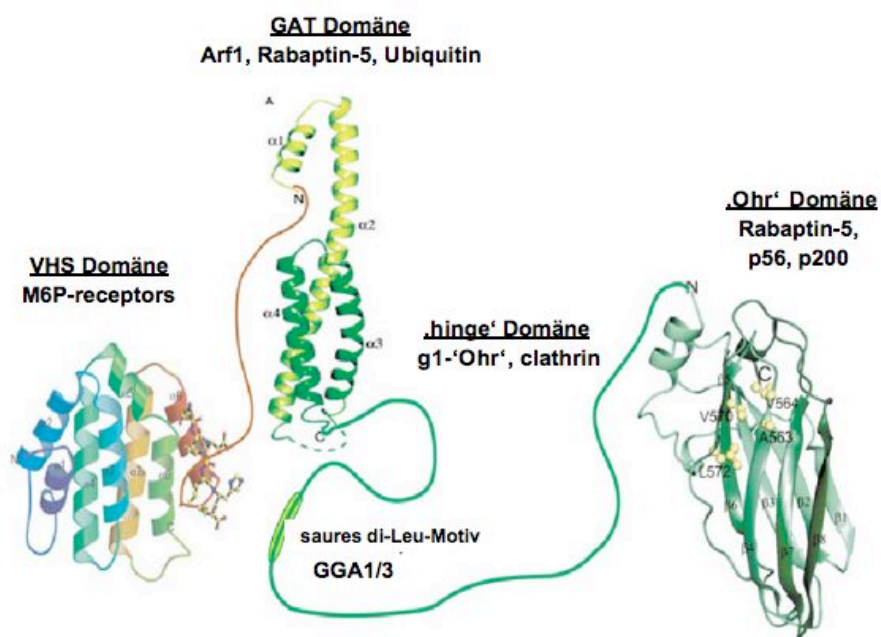
Für „Sorting nexin 9“ (Snx9) wurde gezeigt, dass Snx9 die Membran zu tubulären Strukturen formen kann und Dynamin2 und Actin bindende Proteine, wie Arp2/3 und N-Wasp, bindet (Lundmark und Carlsson, 2003; Shin *et al.*, 2008).

$\gamma$ -BAR ( $\gamma$ 1-adaptin Brefeldin A Resistance) interagiert mit der  $\gamma$ 1-Ohr-Domäne, aber nicht mit der sehr homologen GAE Domäne von GGA1 und reguliert die Dynamik der AP-1 Membranbindung (Neubrand *et al.*, 2005). Für andere Proteine, wie aftiphilin und NECAP (adaptin-ear-binding coat-associated protein) 1 und 2 wurde gezeigt, dass sie sowohl die  $\gamma$ 1-Ohr Domäne als auch die GAE Domäne von GGA1 sowie die  $\alpha$ -Ohr Domäne mit unterschiedlichen Affinitäten binden. Es wird spekuliert, dass diese Unterschiede durch saure

Reste verursacht werden, die abwärts der identifizierten Motive, WVQF und WGDF, dieser assoziierten Proteine liegen (Mattera *et al.*, 2004).

### 1.1.3 GGA Adaptoren

Die monomeren GGA Proteine (Golgi-localised,  $\gamma$ -ear-containing, ARF-binding proteins) wirken an der Bildung von Clathrin-umhüllten Proteinen am TGN mit. Die GGA-Proteine wurden aufgrund der Homologie einer ihrer Domänen zur  $\gamma$ -Adaptin-Ohr-Domäne in Datenbanken identifiziert und im Hinblick auf ihre Rolle in Sortierungsprozessen am TGN hin untersucht (Bonifacino, 2004). Zusätzlich befinden sie sich auch an Endosomen. In Säugern sind drei Gene beschrieben, die für GGA1, GGA2 und GGA3 kodieren. Die Familie ist in Eukaryoten konserviert, und auch die Hefe besitzt zwei GGA-Proteine. Die GGA-Proteine sind modular aufgebaut (siehe Abbildung 7). Ihre drei gefalteten Domänen sind durch unstrukturierte Sequenzen verbunden.



#### Abbildung 7 : Modell der Struktur von GGA1

Die Strukturen der einzelnen Domänen wurden hier zu einem Modell zusammengefügt und den einzelnen Domänen wurden ihre Bindepartner zugeordnet. Modifiziert nach (Ghosh und Kornfeld, 2004)

Am N-Terminus enthalten sie eine VHS-Domäne (eine Abkürzung der ersten drei Mitglieder der Familie: Vps27p, Hrs und STAM), die auch in anderen am Membrantransport beteiligten Proteinen zu finden ist. Es folgt eine GAT-Domäne (GGA and TOM1) und am C-terminalen Ende die GAE-Domäne ( $\gamma$ -adaptin-ear-homologous). Die einzelnen Domänen haben Eigenschaften, die denen des AP-1 ähneln. Die VHS-Domäne erkennt Cargo-Proteine, wie Sortilin und die Mannose-6-phosphat-Rezeptoren (Nielsen *et al.*, 2001; Puertollano *et al.*, 2001). Diese Interaktion hängt vom Motiv des DxxLL-Typs ab. Das essentielle Aspartat ist dabei von sauren Resten umgeben und die Phosphorylierung eines aufwärts liegenden Serinrestes wirkt sich verstärkend aus. Mit Hilfe der GAT-Domäne binden die GGAs an ARF1 und ARF3 in ihrer GTP-gebundenen Form. Des Weiteren wird PI-4-P von der GAT-Domäne gebunden. Beide Interaktionen sind für eine Rekrutierung an das TGN notwendig (Wang *et al.*, 2007). Clathrin bindet an Clathrin-Box Motiven in der unstrukturierten Region und zusätzlich eine Stelle in der GAT-GGA1-Domäne. Analog zu den Ohrdomänen der Adaptinen ist die GAT-Domäne für Interaktionen mit akzessorischen Proteinen zuständig. Darunter sind p56 und Rabaptin5. Während *in vitro* p56 und  $\gamma$ -synergine sowohl mit GGA und AP-1 interagieren, kolokalisiert *in vivo* p56 ausschließlich mit GGA und  $\gamma$ -synergine nur mit AP-1, und ihr Erscheinen an der Membran hängt jeweils vom Vorhandensein von GGA oder AP-1 ab (Liu *et al.*, 2001). Rabaptin5 assoziiert mit GGA-Proteinen über GAT und GAE-Domänen und ist an der endosomalen Verteilung der GGAs beteiligt (Mattera *et al.*, 2003).

Trotz der Ähnlichkeit der drei GGAs sind sie nicht komplett redundant. Kristallstrukturen und die Bestimmung von Cargo-Affinitäten haben gezeigt, dass die VHS-Domäne von GGA2 sich erheblich von GGA1 und GGA3 unterscheidet. Im Gegensatz zu GGA2 werden die beiden anderen durch eine Phosphorylierung reguliert, die eine Konformationsänderung bewirkt. Die Phosphorylierung eines Serinrests, der einem internen, im Linker liegenden, sauren Dileucin-Motiv benachbart liegt, ermöglicht es eben diesem Motiv an der VHS-Domäne die Cargo-Bindestelle zu blockieren. Da dies auch andere Bindestellen, z.B. für ARF, verdeckt, wird dieser Zustand als geschlossene, zytosolische Konformation von GGA1 und GGA3 bezeichnet. Wahrscheinlich

führt eine Dephosphorylierung durch PP2A zur Membranassoziation, wohingegen die AP-1 assoziierte Kinase CKII die Phosphorylierung bewirkt (Doray *et al.*, 2002; Ghosh *et al.*, 2003 a). Es konnte gezeigt werden, dass alle GGAs in Ausstülpungen am TGN kolokalisieren und dass die membrangebundenen Proteine über mehrere Domänen interagieren untereinander. Die Depletion eines GGA-Proteins resultiert in einer gesteigerten Degradation der anderen zwei (Ghosh *et al.*, 2003 a). Obwohl GGA-Proteine die grundlegenden Eigenschaften von Adaptoren zeigen und in elektronenmikroskopischen Aufnahmen unter Überexpressionsbedingungen in Clathrin-umhüllten Gruben und/oder Vesikeln zu sehen sind, konnten sie bislang nicht in aufgereinigten CCVs nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigt eine Studie, dass die GGA Scharnier-Region an die  $\gamma$ -Ohr-Domäne von AP-1 bindet. Dies läßt vermuten, dass AP-1 und GGA-Proteine interagieren und bei den gleichen Transportwegen kooperieren (Doray *et al.*, 2002). In Studien konnte gezeigt werden, dass stabil mit GGA2 transfizierte Zellen eine Kolokalisation von GGA2 und AP-1 in umhüllten Krümmungen am TGN aufweisen. Mutierte MPRs, die nicht mehr an GGA-Proteine binden können, werden nicht in AP-1-Vesikel sortiert. Dies führte zu der These, dass GGA-Proteine nicht zwangsweise auch in die Vesikel mit aufgenommen werden, sondern nur beim Rekrutieren von Hüllkomponenten und beim Verpacken von Cargo-Proteinen in Vesikel helfen. Zusätzlich führten Beobachtungen, bei denen eine Phosphorylierung von GGA1 und 3 einen selbstinhibierenden Zustand zur Folge hatte, zu der Hypothese, dass GGAs Adaptoren sind, die AP-1 beim Verpacken von Transmembranproteinen in Vesikel unterstützen. Dieses Modell läßt sich aber nicht auf GGA2 übertragen, da hier der entsprechende Serinrest, der zyklisch phosphoryliert und dephosphoryliert wird, fehlt. Unklar ist, ob GGA-Proteine unabhängig von AP-1 Transportvesikelbildung vermitteln oder ob sie ausschließlich akzessorische Funktionen haben. Es wird eine Konzentrierung von Proteinen durch die GGA-Proteine diskutiert, die diese Proteine an den AP-1 weiterreichen, um eine effiziente Vesikelbildung zu ermöglichen.

Für alle drei GGA-Proteine wurde eine Interaktion mit ubiquitinylierten Proteinen gezeigt, wobei GGA3 die höchste Affinität hat. Eine Depletion von GGA3 verlangsamt die Degradation von EGF in Lysosomen. GGA3 bindet

zudem an eine Untereinheit des ESCRT-Komplexes, so dass eine Rolle in der Ubiquitin vermittelten Sortierung wahrscheinlich ist (Puertollano und Bonifacino, 2004). Ubiquitylierung von endozytierten Proteinen bestimmt diese für einen lysosomalen Abbau. Die Auswahl des Cargo findet in den frühen Endosomen statt. Darin involviert sind die ESCRT-Maschinerie und spezielle mit Clathrin besetzte Membranabschnitte, die durch den monomeren Adaptor Hrs initiiert werden (Raiborg *et al.*, 2001a). Im Gegensatz zu anderen umhüllten Gruben generieren diese Regionen keine Vesikel, häufen aber eventuell Komponenten von multivesikulären Körperchen an (Sachse *et al.*, 2004). Wie die GGA-Proteine enthält Hrs eine VHS-Domäne, gefolgt von einem FYVE-Modul, welches eine Zink-Finger Faltung hat und spezifisch an PI-3-P bindet. Ein Ubiquitinbindemotiv sammelt ubiquitylierte Proteine für den Abbau in Lysosomen. Außerdem gibt es zwei „coiled-coil“-Domänen, gefolgt von einem C-terminalen Clathrin-Box-Motiv. Die endosomale Lokalisation von Hrs benötigt eine funktionelle FYVE-Domäne und die „coiled-coil“-Domänen (Raiborg *et al.*, 2001b).

#### 1.1.4 AP-1 vermittelter Transport

Nach der Identifizierung von AP-1 und AP-2 als Hauptbestandteil von CCVs wurde ihre Bindung an zu transportierende Proteine *in vitro* nachgewiesen. Dies waren die MPR und LAP (lysosomal acidic phosphatase) (Sosa *et al.*, 1993; Höning *et al.*, 1997). Immunfluoreszenz und elektronenmikroskopische Aufnahmen des AP-1 zeigen eine Lokalisation in Clathrin-umhüllten Ausstülpungen am TGN. Experimente mit AP-1 defizienten Zelllinien von „knock out“ Tieren zeigten, dass AP-1 sowohl anterograden als auch retrograden Transport vermittelt (Meyer *et al.*, 2000). Video-Mikroskopie mit fluoreszierenden Untereinheiten des AP-1 zeigte, dass AP-1 den TGN in Vesikeln oder tubulären Strukturen verlässt. Ähnliche Carrier werden auf dem Rücktransport zum TGN beobachtet (Huang *et al.*, 2001; Waguri *et al.*, 2003). Biochemisch konnte eine Beteiligung von AP-1 tragenden Vesikeln im retrograden Weg bislang nicht nachgewiesen werden (Medigeschi und Schu, 2003).

Das TGN als Austrittspunkt des Golgi-Apparats ist morphologisch ein tubuläres, verzweigtes System. Legt man das Modell der reifenden Zisternen zugrunde, wird die gesamte Organelle ständig in Richtung der endosomalen Kompartimente und der Plasmamembran zerstreut und durch neue nachkommende Zisternen ersetzt. Einige Bestandteile werden dabei zu medialen Golgi Elementen zurück transportiert. Zu den vom TGN ausgehenden Transportstrecken gehört die konstitutive und regulierte Sekretion an der Plasmamembran und die Zuführung von Proteinen in die Lysosomen über die Endosomen. Das endosomale Kompartiment besteht aus vesikulären und tubulären Elementen, die kontinuierlich fusionieren und sich abspalten. Durch bestimmte Rab-Proteine und ihre Effektoren definierte Mikrodomänen spielen eine entscheidende Rolle im endosomalen Sortierungsmechanismus.

Es wurde eine große Anzahl an Cargoproteinen beschrieben, die mit AP-1 am TGN interagieren und in Clathrin und AP-1 umhüllten Vesikeln vom TGN zu den Endosomen transportiert werden. Die klassischen sind die MPRs (Mannose-6-Phosphat Rezeptoren MPR46 und MPR300), die variablen Ketten des MHC- II Komplexes, Furin, das virale Glycoprotein gp48 und das HIV-1-Protein Nef. MPRs werden selektiv am TGN in CCVs sortiert (Geuze *et al.*, 1984; Sosa *et al.*, 1993) und verlassen dieses Kompartiment in AP-1 umhüllten Vesikeln. MPRs sind in aufgereinigten CCVs angereichert (Le Borgne und Hoflack, 1997). Elektronenmikroskopische Aufnahmen haben gezeigt, dass beide MPRs und AP-1 oder Clathrin in knospenden Strukturen des TGN kolokalisieren. Es gibt eine direkte Interaktion zwischen dem zytoplasmatischen Erkennungsmotiv des MPR300 und AP-1 (Höning *et al.*, 1997). AP-1 vermittelter Transport stellt sicher, dass neu synthetisierte, lysosomale Hydrolasen, die im TGN an die MPRs binden, von den an der Plasmamembran sezernierten Proteinen getrennt und effizient zu den Lysosomen transportiert werden. Lange Zeit war AP-1 der einzige bekannte Adaptor am TGN, der Mannose-6-Phosphat abhängigen Transport vermittelt (Hille-Rehfeld, 1995). Aber seit die GGA-Proteine mit ähnlichen Eigenschaften beschrieben wurden, ist die genaue Funktion dieser beiden Adaptoren für den Transport zwischen TGN und den endosomalen Kompartimenten kontrovers diskutiert worden.



Der Transport von MPRs in  $\mu$ 1A „knock out“ Mäusen (Meyer *et al.*, 2000) erbrachte den ersten Hinweis für eine Aufgabe von AP-1 im retrograden Transport von den Endosomen zum TGN. Würde AP-1 den anterograden Transport, also vom TGN zu den Endosomen, vermitteln, würde man erwarten, dass in AP-1 defizienten Zellen die MPRs im TGN stecken blieben. Überraschenderweise verlassen die MPRs den Golgi, erreichen auch die Plasmamembran und können zirkulieren, akkumulieren aber in frühen Endosomen, die das Markerprotein EEA1 enthalten. Dass AP-1 den retrograden Transport vom TGN vermittelt, wird unterstützt durch *in vitro* Transportexperimente. Der retrograde Transport von frühen Endosomen zum TGN des bakteriellen Shiga-Toxins ist jedoch AP-1 unabhängig. Es benötigt aber sowohl EpsinR als auch Clathrin (Saint-Pol *et al.*, 2004).

In polarisierten, epithelialen Zellen müssen Cargoproteine zwischen zwei strukturell unterschiedlichen, getrennten Plasmamembranen, der apikalen und der basolateralen Membran, sortiert werden. Der Adaptorkomplex AP-1B, der sich durch eine alternative Untereinheit  $\mu$ 1B definiert, vermittelt hier den basolateralen Transport einiger Proteine, wie dem “low-density-lipoprotein (LDL)-receptor” (Fölsch *et al.*, 1999). Manche dieser Proteine werden aufgrund des Yxx $\phi$  Motivs erkannt, andere binden mit unkonventionellen Motiven (Sugimoto *et al.*, 2002). AP-1B bindet am TGN und an Endosomen, kolokalisiert aber nicht mit AP-1A. Scheinbar kann  $\mu$ 1B  $\mu$ 1A in Fibroblasten teilweise substituieren. So werden die MPRs wieder richtig sortiert, Furin aber nicht gebunden (Fölsch *et al.*, 2001; Eskelinen *et al.*, 2002).

Neben AP-1B scheint auch AP-4 eine Sortierung zur basolateralen Membran zu vermitteln. Die transportierten Proteine überlappen dabei zumindest teilweise, aber AP-4 ist auch in polarisierten Zellen zu finden, in denen AP-1B nicht exprimiert ist (Simmen *et al.*, 2002), z.B. in Neuronen (Dilaver *et al.*, 2003; Matsuda *et al.*, 2008). Es ist daher nicht klar, ob es sich um einen gemeinsamen oder alternativen basolateralen Transportweg handelt.

Der AP-1 Komplex wurde weiterhin auf unreifen sekretorischen Granula gefunden. Eine Funktion scheint in der Reifung der Granula zu liegen, indem AP1 gebundene CCV Proteine entfernen. Kürzlich wurde eine essentielle Funktion bei der Biogenese von Weibel-Palade-Bodies (WPB) nachgewiesen

(Lui-Roberts *et al.*, 2005). Ein „Knock-down“ von aftiphilin und  $\gamma$ -synergien hat gezeigt, dass von Willebrand-Faktor aus reifen WPB unreguliert freigesetzt wird. Es wird postuliert, dass AP-1 die Rekrutierung von Clathrin, welches als Gerüst für die initiale Granulabildung fungiert, mit der Rekrutierung von aftiphilin verbindet, welches WPB zum regulierten, sekretorischen Transportweg dirigiert (Lui-Roberts *et al.*, 2008). Des Weiteren wird eine Beteiligung von Adaptor-Proteinen an der Sortierung vom Glukosetransporter 4 (GLUT4) in Insulin-abhängig ausgeschüttete Granula der Adipocyten und des Skelettmuskel diskutiert. Zwar konnten AP-1 und ARF1 an aufgereinigten GLUT4-Vesikeln nachgewiesen werden (Marsh *et al.*, 1998; Gillingham *et al.*, 1999) und in Yeast-2-Hybrid Experimenten wurde eine Bindung von GLUT4 an  $\mu$ 1 gefunden (Al-Hasani *et al.*, 2002), aber eine Funktion ist nicht bekannt. „Knock-down“-Experimente ergaben Hinweise auf eine funktionelle Beteiligung von GGA-Proteinen an der GLUT4-Vesikelbildung (Li und Kandror, 2005; Hou *et al.*, 2006). Für GGA-Fusionsproteine wurde ebenfalls eine Lokalisation an GLUT4-Vesikeln beschrieben, jedoch keine direkte Interaktion mit GLUT4 (Li und Kandror, 2005). Letztere wurde dagegen für Sortilin beschrieben, das über seine Vps10p-Domäne an GLUT4 binden kann und eine wichtige Rolle bei der Insulin-abhängigen Ausschüttung GLUT4-haltiger Granula spielt (Shi und Kandror, 2005; 2007).

## **1.2 Maus „knock-out“ Modelle der AP-1 Adaptine**

### **1.2.1 Phänotyp der $\gamma$ 1-„knock-out“ Mäuse**

Trotz der starken Konservierung von AP-1 von der Hefe bis zum Säuger verursacht die Depletion der Adaptine in Hefen keinen ernsthaften Phänotyp (Yeung *et al.*, 1999). Wohingegen Mäuse, deren Allele des  $\gamma$ -Adaptin-Gens durch eine nicht funktionelle DNA ersetzt wurden, zwischen Tag 3,5 und 4,5 in ihrer embryonalen Entwicklung sterben. Wahrscheinlich fehlt diesen Mäusen nicht nur die  $\gamma$ -Untereinheit, sondern der gesamte AP-1 Komplex, da in heterozygoten Zellen, in denen die Menge an  $\gamma$ -Adaptin auf 50% reduziert

ist, trotz unveränderter mRNA-Mengen keine freien  $\beta$ 1- oder  $\mu$ 1-Untereinheiten oder Teilkomplexe gefunden wurden. Tiere, die für den  $\gamma$ -Genlocus heterozygot sind, zeigen ein verlangsamtes Wachstum, solange sie von der Mutter ernährt werden. Im Gegensatz zu ES-Zellen, gewonnen aus Wildtyp-Embryonen, waren Zellen der 3,5 Tage alten „ko“-Embryonen in Kultur nicht überlebensfähig. Es findet keine Komplementierung durch die vorhandenen Adaptorproteine statt, d.h. AP-1 ist essentiell für die Entwicklung eines multizellulären Organismus (Zizioli *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu sind Mäuse mit defizientem AP-3 Komplex lebensfähig und fertil (Kantheti *et al.*, 1998; Odorizzi *et al.*, 1998).

### 1.2.2 Phänotyp der $\mu$ 1-„knock-out“ Mäuse

Der „knock-out“ des  $\mu$ 1-Gens ist im Mausmodell in der Embryonalphase letal. Die Entwicklung der homozygot defizienten Embryonen bricht nach Tag 13,5 ab. Es treten Einblutungen in den Rückenmarkskanal und die Ventrikel auf, deren Ursache noch ungeklärt ist. Die im Vergleich zum  $\gamma$ 1-„knock-out“ deutlich fortgeschrittene Entwicklung kann durch die epithelspezifische Isoform  $\mu$ 1B bedingt sein. In  $\mu$ 1A-depletierten, embryonalen Mausfibroblasten tritt eine Veränderung in der Verteilung AP-1 abhängig sortierter Proteine auf. Beide Mannose-6-Phosphat Rezeptoren (MPR) können verstärkt im endosomalen Kompartiment nachgewiesen werden, da der Rücktransport zum TGN blockiert ist. MPR-bindende, lysosomale Enzyme werden vermehrt sezerniert. Eine vermehrte Endozytoserate des MPR300, aufgrund einer rascheren Internalisierung, führt zu einer vermehrten Aufnahme von M6P-reichen Enzymen in die Zelle (Meyer *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2001).

### 1.2.3 Phänotyp der $\sigma$ 1B-„knock-out“ Mäuse

Zur Analyse der  $\sigma$ 1-Funktionen wurden in einer vorhergehenden Doktorarbeit unserer Arbeitsgruppe das  $\sigma$ 1B-Gen auf dem X-Chromosom durch Einfügen einer Neomycinresistenzkassette in Exon 3 zerstört (Riel, 2004).  $\sigma$ 1B

---

defiziente Mäuse beiderlei Geschlechts wurden gezüchtet. Es wurden keine offensichtlichen Unterschiede zu Geschwistern mit Wildtypallelen gefunden. Auch erste histologische Untersuchungen zeigten keine Auffälligkeiten (Riel, 2004). Dies deutete eine Redundanz der  $\sigma$ 1-Adaptine an.

## 2. Fragestellung

Der Adaptor-Proteinkomplex AP-1 ist Bestandteil des Clathrin vermittelten Transports zwischen dem TGN und dem endosomalen Kompartiment. Der Komplex besteht aus vier Untereinheiten, die alle unterschiedliche Funktionen in der Bildung von Transportvesikeln wahrnehmen.  $\gamma 1$  und  $\beta 1$  binden Clathrin und weitere Hilfsproteine und  $\mu 1$  bindet Carga-Proteine. *In vitro* konnte nachgewiesen werden, dass auch  $\gamma 1/\sigma 1$  Hemikomplexe Cargo-Protein Sortierungsmotive erkennen können. Gleiches ist für die Komplexe AP-2 und AP-3 beschrieben.  $\sigma 1$  besitzt im Vergleich zu seinem nächsten Homologen  $\sigma 2$  des AP-2-Komplexes, jedoch zusätzliche Domänen, so dass funktionelle Unterschiede angenommen werden müssen. Für die kleinste Untereinheit  $\sigma 1$  sind drei Isoformen beschrieben, deren *in vivo* Funktionen unklar sind. Da in der Dissertation von Frau C. Riel eine gewebsspezifische Expression der  $\sigma 1$ -Isoformen beschrieben ist, sollten die entsprechenden Organe genauer auf ihre Funktionen überprüft werden. Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe von „knock-out“ Mausmodellen zur Aufklärung der Funktionen von  $\sigma 1$  beizutragen. Dazu wurde auch ein  $\sigma 1A$ -defizientes Mausmodell etabliert.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Häufig verwendete Lösungen und Geräte

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen mit aqua dest. angesetzt, das über eine spezielle Anlage (MilliQ, Millipore) deionisiert und sterilfiltriert worden ist.

##### 3.1.1 Puffer

PBS ( <i>phosphate buffered saline</i> ) :	140 mM NaCl	
	2,5 mM KCl	
	6,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
	1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	pH 7,5
TE ( <u>T</u> ris- <u>E</u> DTA-Puffer) :	10 mM Tris	
	1 mM EDTA	pH 8,0
10xSSC:	1,5 M NaCl	
	0,15 M Na-Citrat	pH 7,4
10xTBS:	100 mM Tris/HCl	
	10 mM EDTA	pH 7,6

##### 3.1.2 Nährmedien

Lysogenic-Broth-Medium (LB):	1% (w/V) Trypton	
	0,5% (w/V) Hefeextrakt	
	1,72 M NaCl	ad 1 L a.d.
SOC-Medium:	0.5% (w/V) Yeast Extract	
	2% (w/V) Tryptone	
	10 mM NaCl	
	2.5 mM KCl	
	10 mM MgCl <sub>2</sub>	
	10 mM MgSO <sub>4</sub>	
Ampicillin-Stocklösung:	20 mM Glucose	
	25 mg/mL (Sigma, Deisenhofen) in a.d.	

Die Lösung wurde steril filtriert und aliquotiert bei -20°C gelagert.

Kanamycin-Stocklösung: 25 mg/mL in a.d.

Die Lösung wurde steril filtriert und aliquotiert bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Nach dem Autoklavieren wurde zur Herstellung von Selektionsmedien eine dieser Antibiotikalösungen in einer Endkonzentration von 50  $\mu\text{g/mL}$  zugegeben.

Agarplatten enthielten 15 g Agar (Roth, Karlsruhe) auf einem Liter LB-Medium.

### 3.1.3 Geräte

Acrylamidgel-Elektrophoresekammer	Biorad, München
Agarosegel-Elektrophoresekammer	Werkstatt des Instituts
Bio-Photometer	Eppendorf, Hamburg
Branson Sonifier 450	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Durchlicht-Mikroskop	Zeiss, Jena
Heizblock Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
LAS-1000 Gel Dokumentationssystem	Fuji, Japan
Laser Scan Mikroskop TCS Sp2 AOBS	Leica, Heidelberg
Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Nassblot-Kammer	Biorad, München
Sensoquest	Labcycler, Göttingen
Semi-Dry Western Blot Kammer	Werkstatt des Instituts
Phosphoimager PMI	Biorad, München
Procise cLC sequenator	Applied Biosystems, USA
Tecan Mikrotiterplatten Photometer Spectra II	Tecan, SLT, Schweiz
Vakuumkonzentrator Sped Vac SVC100H	Bachofer, Reutlingen

### 3.1.4 Zentrifugen und Rotoren

Kühlzentrifuge 5804R mit Rotor A-4-44	Eppendorf, Hamburg
---------------------------------------	--------------------

---

Tischkühlzentrifuge Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen
Kühlzentrifuge J2-MC mit Rotor JA-10	Beckmann Coulter, Krefeld
Tisch-Ultrazentrifuge TL-100 mit Rotor TLA-45	Beckmann Coulter, Krefeld

### **3.2 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien**

Lysispuffer:	100 mM NaCl 10 mM Tris pH 8,0 25 mM EDTA pH 8,0 0,5% SDS
Stocklösung Proteinase K:	2 mg/mL in 100 mM NaCl 10 mM Tris pH 8,0 25 mM EDTA pH 8,0

Im Alter von 4-6 Wochen wurde den Mäusen circa 0,5 cm der Schwanzspitze abgeschnitten. Dieses Stück wurde in 450 µL Lysispuffer und 50 µL Proteinase K-Stocklösung bei 56°C unter Schütteln über Nacht verdaut. Das Lysat wurde 5 min bei 13000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 500 µL Isopropanol zugegeben. Nach mehrmaligem Invertieren bildet sich eine milchige Wolke aus. Die DNA wurde auf eine verschlossene und gebogene Pasteurpipette gewickelt und in 70% Ethanol getaucht. Danach wurde die DNA bei RT getrocknet und schließlich in 50-200 µL Wasser bei 37°C gelöst.

#### **3.2.2 Fällung von DNA durch Ethanol**

Natriumacetat-Lösung: 3 M Natriumacetat pH 5,5  
100% und 70% Ethanol  
1xTE-Puffer



Die Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren aus wässriger Lösung erfolgte durch Fällung. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 0,1 Volumen 3M Natriumacetat pH 5,5 gemischt und anschließend zwei Volumina 100%-iger Ethanol zugegeben, gut gemischt und für zehn Minuten bei -20°C inkubiert. Die präzipitierte DNA wurde durch zehnmünütige Zentrifugation bei 13.000 rpm sedimentiert. Der Niederschlag wurde zweimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur oder im Speed Vac Concentrator (Bachofer, Reutlingen) getrocknet und in einem kleinen Volumen (z.B. 20-100 µL) 1xTE-Puffer oder H<sub>2</sub>O gelöst.

### **3.2.3 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA**

P/C/TE: Phenol/Chloroform im Verhältnis 1:1, mit 1xTE-Puffer äquilibriert und überschichtet.

Proteine und andere Verunreinigungen wurden aus einer wässrigen DNA-Lösung durch Extraktion mit Phenol/Chloroform entfernt. Dazu wurde die Probe mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform/TE gut gemischt (Vortex) und anschließend zur Phasentrennung fünf Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige, DNA-haltige Phase wurde in ein neues Reagenzgefäß überführt. Die extrahierte DNA wurde mit Natriumacetat und Ethanol präzipitiert (siehe 3.2.2).

### **3.2.4 RNA Isolierung aus Geweben**

Diethylpyrocarbonat (DEPC Roth, Karlsruhe)

Trizol® (Invitrogen, Karlsruhe)

Chloroform

Isopropanol

75% Ethanol

Alle Lösungen für die Arbeiten mit RNA wurden, soweit nicht anders vermerkt, in Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem a.d. angesetzt. Hierzu wurde 1 mL DEPC auf 1 L a.d. gegeben, die Lösung über Nacht bei

Raumtemperatur gerührt und anschließend für 30 min autoklaviert. Es wurde nur RNase-freies Material verwendet und die Geräte wurden zuvor über Nacht in 1 M NaOH gereinigt und mit DEPC-H<sub>2</sub>O gespült. 100 mg Gewebe wurden mit einem Milliliter Trizol<sup>®</sup> versetzt und mit einem Ultraturrax homogenisiert. Handelte es sich um die Aufarbeitung von Fettgewebe wurde das Homogenat zehn Minuten bei 4°C und 12.000 rpm zentrifugiert. Das eingelagerte Fett konnte anschließend als oberste Schicht abgenommen werden.

Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µL Chloroform hinzugegeben, mindestens fünfzehn Sekunden stark geschüttelt und erneut drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer fünfzehnminütigen Zentrifugation bei 4°C und 12.000 rpm enthält die obere, wässrige Phase die RNA. Diese wurde durch Zugabe von 500 µL Isopropanol präzipitiert, mit 75% Ethanol gewaschen und in RNase freiem H<sub>2</sub>O aufgenommen. Dazu folgte eine zehnminütige Inkubation bei 60°C.

### **3.2.5 Quantifizierung von Nukleinsäuren**

Die Quantifizierung der DNA erfolgte spektrometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm. Die Probe wurde hierzu 1: 50 mit Wasser verdünnt und gegen Wasser als Leerwert gemessen. Eine OD von 1,0 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/mL doppelsträngiger DNA bzw. einer RNA-Konzentration von 40 µg/mL.

### **3.2.6 PCR**

Die Polymerasekettenreaktion (engl. Polymerase chain reaction; PCR) ist eine Methode zur selektiven enzymatischen Amplifizierung eines DNA-Bereichs, der von Regionen bekannter Sequenz flankiert wird. Der PCR-Ansatz wird zunächst für fünf Minuten auf 95°C erhitzt, so dass die doppelsträngige Ausgangs-DNA denaturiert wird. Anschließend erfolgt bei einer niedrigeren Temperatur die spezifische Anlagerung der Oligonukleotide an die komplementären Sequenzen der Ziel-DNA. Die gewählte

Hybridisierungstemperatur ist abhängig von der Länge und Sequenz des jeweiligen Primer. Nach diesem, in der englischen Terminologie als Annealing bezeichneten Prozess, findet die Primerextension statt. Das heißt, die freien 3'OH-Enden der Oligonukleotide werden bei 72°C von einer hitzestabilen DNA-Polymerase verlängert. Durch abermaliges Denaturieren werden nun die neusynthetisierten Doppelstränge in Einzelstränge zerlegt und der Zyklus kann erneut beginnen. Die Polymerasekettenreaktion führt letztlich zu einer exponentiellen Amplifikation der Ziel-DNA.

Taq-DNA-Polymerase: 5 U/µL (Roche Applied Science, Indianapolis, USA)

10xPCR Reactionbuffer (Roche)

10mM dNTP-Mix ( aus je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, Roche)

PCR-Maschinen:

Sensoquest, Labcycler oder Eppendorf, Mastercycler gradient

#### **Standardansatz:**

ca. 100 ng DNA-Template

5 µL Reaktionspuffer

2 µL 3'-terminaler Primer (20 pM pro Ansatz)

2 µL 5'-terminaler Primer (20 pM pro Ansatz)

2 µL dNTP-Mix

0,5 µL Taq DNA-Polymerase

mit dH<sub>2</sub>O auf 50 µL auffüllen

#### **Standard-PCR-Programm :**

	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>
Denaturierung	94°C	3 Minuten
	94°C	45 Sekunden
Anlagerung	54°C	45 Sekunden
Extension	72°C	1 Minute/kb
Anzahl der Zyklen		25x
Ende	4°C	Unendlich

### 3.2.6.1 PCR-Ansatz zur Genotypisierung der S1B<sup>-/-</sup> - Mäuse

Der Nachweis der Allele zur Genotypisierung erfolgte mittels PCR. Die beiden eingesetzten Oligonucleotidprimer waren so gewählt, das von einem Wildtyp-Allel ein DNA-Fragment der Länge von 90 bp amplifiziert wird. Ist in diesem Bereich aber die NEO-Kassette inseriert ((-/-)-Allel), ist die Fragmentlänge statt dessen 1,2 kb.

#### Ansatz: (50 µL)

- 1-5 µL genomische DNA
- 10 µL Reaktionspuffer
- 2,5 µL Primer s1be3de
- 2,5 µL Primer s1be3u2
- 1 µL dNTP-Mix
- 0,5 µL Taq-DNA-Polymerase
- 2,5 µL DMSO
- mit dH<sub>2</sub>O auf 50 µL auffüllen

#### Programm:

	Temperatur	Dauer
Denaturierung	94°C	3 Minuten
	94°C	30 Sekunden
Anlagerung	62°C	30 Sekunden
Extension	72°C	4 Minuten
Anzahl der Zyklen		30x
Ende	4°C	unendlich

### 3.2.6.2 PCR zur Genotypisierung der S1A Gene Trap-Mäuse

Der Nachweis der Genotypen der S1A Gene Trap Mäuse erfolgte durch zwei PCRs mit einem gemeinsamen 5'-Oligonucleotidprimer und zwei Allel-spezifischen 3'-Oligonucleotidprimern (s. 4.2.4).

#### Ansatz: (50 µL)

1-5 µL genomische DNA  
5 µL Reaktionspuffer  
2 µL Primer s1aF1  
2 µL Primer s1aR3 bzw. s1aR1  
2 µL dNTP-Mix  
1 µL Taq-DNA-Polymerase  
2,5 µL DMSO  
2,5 µL 20% Triton X-100  
mit dH<sub>2</sub>O auf 50 µL auffüllen

#### Programm:

	Temperatur	Dauer
Denaturierung	94°C	3 Minuten
	94°C	30 Sekunden
Anlagerung	54°C	30 Sekunden
Extension	72°C	1 Minute
Anzahl der Zyklen		30x
Ende	4°C	Unendlich

Name	Sequenz	Beschreibung	T <sub>m</sub> der PCR
s1be3de	CAG ATA TGC CAG TCT ATA TTT TTG CTG	Genotypisierungs-PCR $\sigma$ 1b-Maus	62°C
s1be3u2	CTT GTC AAG TAA TTC CAC GTA ACG A	Genotypisierungs-PCR $\sigma$ 1b-Maus	62°C
S1AF1	CTG CAG GAC ACC TCC AAG AA	Genotypisierungs-PCR $\sigma$ 1a-Maus	54°C
S1AR1	TGT CCT CCA GTC TCC TCC AC	Genotypisierungs-PCR $\sigma$ 1a-Maus	54°C
S1AR5	CAC AGA CCC CTC ATG TCA GA	Genotypisierungs-PCR $\sigma$ 1a-Maus	54°C
S1A for exon3	ATG TCC AGG ACA CCT CCA AGA	Identifizierung Gene Trap Insertion	52°C
GT R1	CAC TCC AAC CTC CGC AAA CTC	Identifizierung Gene Trap Insertion	52°C
GT R2	CGG GAG AGG CCT GGC CTGCTC	Identifizierung Gene Trap Insertion	52°C
GAPDH mus F2	CGC ATC TTC TTG TGC AGT GC	Generierung der Northern Sonde	56°C
GAPDH mus R3	GGT GGT CCA GGG TTT CTT AC	Generierung der Northern Sonde	56°C
AK 30	TTT CCC TGC CAG CCT CTG CAG AAG	Nachweis der Neomycinkassette	62°C
AK 31	CTT GAT GTC AGT TGT GGA ATC CAT	Nachweis der Neomycinkassette	62°C

**Tabelle 1: verwendete Oligonucleotidprimer**

### 3.2.7 Restriktionsverdau von DNA

Beim Restriktionsverdau wird DNA mit Hilfe von Enzymen, die ursprünglich aus Bakterien isoliert wurden, gespalten. Die unterschiedlichen Enzyme erkennen spezifische Sequenzen der DNA und schneiden diese somit in genau definierte Bruchstücke.

Restriktionsenzyme (NEB, New English Biolabs, Frankfurt am Main)

10 x Restriktionspuffer für Restriktionsenzyme (NEB)

1 mg/mL BSA (NEB)

Je nach Art der Anwendung wurde ein Gesamtreaktionsvolumen von 100  $\mu$ L für präparative Verdau, bzw. 20  $\mu$ L für einen analytischen Verdau gewählt. Die Menge an Reaktionspuffer und BSA betrug jeweils ein Zehntel des Gesamtvolumens, die Menge der DNA variierte je nach Anwendung. Für einen präparativen Verdau wurden immer 10  $\mu$ g DNA eingesetzt, bei einem analytischen Verdau nach einem Minipräp s. 3.2.13 wurden 5  $\mu$ L DNA-Lösung eingesetzt. Das Volumen wurde mit a.d. aufgefüllt, der Ansatz gevortext und kurz zentrifugiert. Zuletzt wurde das Restriktionsenzym zugegeben und der Ansatz vorsichtig mit der Pipettenspitze gemischt. Bei der Menge der verwendeten Enzyme ist zu beachten, dass höchstens ein Zehntel des Gesamtvolumens verwendet wurde, um inhibitorische Effekte einer zu hohen Glycerolkonzentration zu vermeiden.

Die Reaktionsansätze wurden bei 37°C für 2h, bzw. 6h oder ü.N., wenn es sich um genomische DNA für einen Southernblot handelte, im Wärmeschrank inkubiert.

### 3.2.8 Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA auf

#### Agarosegelen

DNA weist durch ihre Phosphatgruppen eine negative Ladung auf und kann somit in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Dazu trägt man die DNA auf ein Agarosegel auf. Agarose ist ein Polysaccharid, das sich bei Erhitzen in

Wasser löst und beim Abkühlen ein dreidimensionales Netzwerk bildet. Die Agarosekonzentration bestimmt dabei die Porengröße.

Kleine DNA Moleküle wandern dabei schneller durch die Gelmatrix als größere. Aber auch die Molekülstruktur hat Einfluss auf die Geschwindigkeit. So wandern linearisierte DNA Moleküle schneller als Plasmide.

Durch die Zugabe des Interkalators Etidiumbromid (EtBr) kann man unter Bestrahlung mit UV-Licht die DNA sichtbar machen und durch den Vergleich mit einem DNA-Standard-Marker die Größe der einzelnen Fragmente abschätzen (s. Abbildung 8).

50 x TAE-Puffer:

2 mM Tris-Essigsäure pH 8,0

100 mM EDTA

EtBr-Lösung: 10 mg/mL

Agarose: (Carl Roth GMBH, Karlsruhe)

DNA Auftragspuffer:

0,4% (w/v) Bromphenolblau oder

0,4% (w/v) Xylencyanol

50% (v/v) Glycerin

1 mM EDTA, pH 8.0

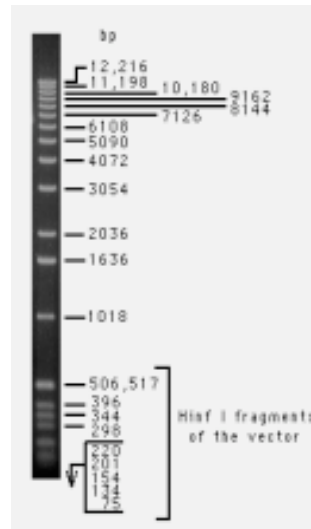
Die Agarose wurde abgewogen und mit 1xTAE in einem Erlenmeyerkolben vermischt. Die Mengen richteten sich dabei nach Konzentration und Größe der Gele. (0,8% - 3% Agarose, 50 mL oder 350 mL) Nach Erhitzen des Gemischs in der Mikrowelle und 50 µg/L EtBr zugegeben. Die Lösung wurde in einen zuvor abgedichteten Gelträger mit zuvor eingesetztem Probenkamm gegossen. Durch Abkühlen auf Raumtemperatur polymerisierte das Gel und der Probenkamm konnte anschließend entfernt werden. Danach wurde das Gel in eine mit TAE gefüllte Gelkammer eingesetzt. Die DNA-Proben wurden 6:1 mit DNA Auftragspuffer versetzt und in die Probenaschen gefüllt. Bei einer konstanten Spannung von 100 V lief das Gel je nach Größe 1-3 h. Die Auswertung erfolgte durch Fotografieren des Gels auf einem UV-Schirm.



### DNA-Größenstandard

1 kb DNA-Leiter 1,0 mg/mL (Invitrogen) (Abb.8)

Von diesem Größenstandard wurden je 10  $\mu$ L auf ein Agarosegel aufgetragen.



**Abbildung 8: 1 kb DNA-Leiter aufgetrennt auf einem 1%-igen Agarosegel.**

### 3.2.9 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

QIAquick Gel Extraktion Kit<sup>®</sup> (Quiagen, Hilden) mit QG-Puffer, QIAquick-Säulen, PE-Puffer)

Isopropanol (Riedel de Haen, Niederlande)

TE-Puffer: s. 3.1.1

Die DNA-Isolierung erfolgte gemäß den Angaben im Herstellerprotokoll. Die aufzureinigenden Banden wurden auf dem UV-Schirm möglichst zügig ausgeschnitten und in ein 15 mL-Plastikgefäß überführt und gewogen.

Anschließend wurde das dreifache Volumen an QG-Puffer zu den Gelstücken zugegeben und für 10 min bei 50°C im Wasserbad erwärmt. Anschließend wurde das Gemisch auf die QIAquick-Säule pipettiert und für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde dann einmal mit QG-Puffer und einmal mit PE-Puffer gewaschen. Um die DNA wieder zu eluieren, wurden 30 µL TE-Puffer auf die Säulenmitte gegeben, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde in einem Eppendorfgefäß aufgefangen.

### 3.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4-Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem 5'-Phosphat und dem 3' Hydroxyl-Ende einer doppelsträngigen DNA. Dabei werden meist kohäsive, durch Restriktionsverdau entstandene Enden der Vektor-DNA und des zu integrierenden Fragments, miteinander verknüpft.

10xLigasepuffer (NewEnglandBiolabs, Frankfurt am Main)

T4-DNA-Ligase (NewEnglandBiolabs, Frankfurt am Main)

**Ligationsansatz:** 2 µL linearisierte Vektor-DNA  
4 µL Insert  
1 µL Puffer  
0,5 µL Ligase  
ad 10 µL H<sub>2</sub>O

Der Ligationsansatz wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 15°C im Wasserbad inkubiert. Für eine anschließende Transformation in kompetenten E.coli (DH5α) wurden 1-5 µL eingesetzt.

### 3.2.11 Präparation von chemisch kompetenten *E. coli*- Zellen

Lösung 1:

30 mM KoAcetat

100 mM RbCl<sub>2</sub>

10 mM CaCl<sub>2</sub>

50 mM MnCl<sub>2</sub>

15% Glycerol

pH 5,8 eingestellt mit Essigsäure

Lösung 2:

10 mM MOPS

75 mM CaCl<sub>2</sub>

10 mM RbCl<sub>2</sub>

15% Glycerol, pH 6,5 eingestellt mit NaOH

Eine Übernachtskultur wird 1:100 in frischem LB-Medium verdünnt und anschließend bei 37°C in einem Schüttler angezogen. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,45 wurden die Bakterienkultur 15 min auf Eis gelagert. Danach wurden die Zellen bei 4°C und 3500 rpm 10 min abzentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in der eiskalten Lösung 1 resuspendiert (30 mL/100 mL Kultur). Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurde die Suspension erneut 15 min bei 4°C und 300rpm zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in eiskalter Lösung 2 aufgenommen (5 mL/100 mL Kultur). Es folgte eine 10-minütige Inkubation auf Eis. Aliquots dieser Lösung wurden im Trockeneisbad eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 3.2.12 Transformation chemisch kompetenter *E.coli*- Zellen

Zunächst wurden 100 mL Zellsuspension langsam auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 10 µL Ligationsansatz oder 1µg Vektor-DNA erfolgte eine 20 minütige Inkubation auf Eis. Die Probe wurde danach exakt 2 sec bei 65°C inkubiert und anschließend sofort wieder 20 min auf Eis gestellt. Es wurde 1 mL LB-Medium zugegeben und 1h bei 37°C auf dem Drehrad inkubiert.

50 µL-250 µL dieses Transformationsansatzes wurden anschließend auf eine LB-Träger-Platte mit entsprechendem Selektionsantibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin) pipettiert und mit einem Drigalsky-Spatel verstrichen. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert.

### **3.2.13 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* über**

#### **QIAprep Spin Plasmid Miniprep Säulen**

QIAprep Spin Säulen, Puffer aus QIAprep Spin Plasmid Miniprep Set (Fa. Qiagen, Hilden). Genaue Angaben zu Puffern und Säulenmaterial sind der Anleitung des Herstellers zu entnehmen.

2-3 mL einer *E. coli*-Übernachtskultur in LB-Ampicillin oder -Kanamycin Medium.

Die *E. coli*-Übernachtskulturen wurden abzentrifugiert und in 250 µL gekühltem P1 Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µL P2 Lysepuffer und anschließend 350 µL N3 Neutralisationspuffer wurde das Zelllysat bei 13000 rpm 10 Minuten sedimentiert, der klare Überstand auf eine QIAprep Minisäule aufgetragen und wieder 1 Minute zentrifugiert. Die an die Säulenmembran gebundene Plasmid-DNA wurde mit 750 µL PB Puffer und gewaschen und die DNA am Ende durch Zugabe von 30-50 µL H<sub>2</sub>O eluiert.

### **3.2.14 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* über**

#### **QIAprep Spin Plasmid Midiprep Säulen**

QIAprep Spin Säulen, Puffer aus HiSpeed Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) Genaue Angaben zu Puffern, Säulenmaterial und Vorgehensweise sind dem HiSpeed Plasmid Midi Kit zu entnehmen.

50-100 mL einer *E. coli*-Übernachtskultur in LB-Ampicillin- oder -Kanamycin-Medium wurden zur Aufreinigung eingesetzt.

### 3.2.15 DNA-Sequenzierung

Plasmid-DNA wurde mit einem ABI PRISM<sup>®</sup> 3100 Sequenzierautomat (Applied Biosystems, Foster City, USA) nach Sanger sequenziert. Der Sequenziermix beinhaltet ein Gemisch aus allen vier unmarkierten und Fluoreszenz-markierten Nukleotiden.

#### Standard Sequenzieransatz:

- 1 µL Plasmid-DNA (0,2-0,5 mg)
- 1 µL 5'- oder 3'- Primer (10 pmol/µL)
- 1.5 µL Sequenzierpuffer (ABI PRISM<sup>®</sup>)
- 1.5 µL ABI PRISM<sup>®</sup> Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Premix
- ad 10 µL HPLC-H<sub>2</sub>O

#### Sequenzier-Programm:

	Temperatur	Dauer
Denaturierung	96°C	10 Sekunden
Anlagerung	50°C	5 Sekunden
Extension	60°C	4 Minuten
Anzahl der Zyklen		25x
Ende	4°C	unendlich

Danach wurde die Sequenzierreaktion von überschüssigen, freien Fluoreszenz-markierten dNTPs gereinigt. Das PCR-Produkt wurde mit 2 µL 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 50 µL 95% Ethanol für 5 Minuten bei Raumtemperatur gefällt. Das Präzipitat wurde bei 13.000 rpm für 20 Minuten sedimentiert. Das Pellet wurde danach mit 250 µL 75% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (13000 rpm, 10 min), getrocknet und anschließend in 15 µL HighDye<sup>®</sup> gelöst.

### 3.2.16 Northern-Blot

#### 3.2.16.1 Auftrennung der RNA mittels Gelelektrophorese

DEPC-H <sub>2</sub> O:	1:1000; autoklaviert
10 x MOPS-Puffer:	0,2 M MOPS 50 mM NaAc 10 mM EDTA pH8,0 ad 1 L in DEPC-H <sub>2</sub> O (dunkel gelagert)
37% Formaldehyd	
RNA-Probenpuffer:	10 mL Formamid 3.5 mL 37% Formaldehyd 2 mL 10x MOPS-Puffer 2 3.8 mg Xylencyanol 3.8 mg Bromphenolblau (steril filtriert)
Laufpuffer:	1xMOPS-Puffer

Für 100 mL Agarose-Formaldehydgel wurden 1,23 g Agarose in 87 mL DEPC-H<sub>2</sub>O in der Mikrowelle aufgeköcht. Nachdem die Lösung auf ungefähr 65°C abgekühlt war, wurden 9,6 mL 10xMOPS-Puffer und 2,87 mL 37% Formaldehyd hinzugegeben und anschließend in einen Gelschlitten gegossen. Zu 10-20 µg RNA wurden 15 µL Probenpuffer hinzugegeben und anschließend 15 min bei 65°C denaturiert. Die am Gel anliegende Spannung betrug 60-100 V.

#### 3.2.16.2 Transfer der RNA auf eine Nylonmembran

10xSSC-Puffer  
50 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,0  
RNA-Färbelösung: 0,04% Methylenblau in 0,5 M Natriumacetat pH 5,5 (steril filtriert)  
Filterpapier (Whatman, GB002)  
Parafilm  
Hybond<sup>+</sup>N-Membran (Amersham Pharmacia)

Der Transfer beruht auf Kapillarkräften, die die zuvor, wie unter 3.2.16.1 beschrieben, aufgetrennte RNA aus dem Gel auf eine Membran transferieren. Dazu wurde auf eine mit 10xSSC gefüllte Wanne eine Glasplatte gelegt, die mit einem Filterpapier bedeckt war, dessen beide Enden in den Puffer ragten. Das Gel wurde mit der Befüllungsseite nach unten auf dieses Filterpapier gelegt und seitlich mit Parafilm begrenzt. Auf das Gel kamen wiederum die Hybond<sup>+</sup>N-Membran und drei in 10xSSC getränkte Filterpapiere. Zur Erzeugung der Kapillarkräfte wurden trockene Papiertücher aufgelegt und der gesamte stapel durch ein Gewicht beschwert. Nach 12 Stunden wurde der Blot abgebaut. Die Membran wurde danach kurz in 50 mM Na.Phosphaat-Puffer gewaschen und anschließend getrocknet. Die Membran wurde zehn Sekunden mit UV-Licht bestrahlt um die RNA zu fixieren. Als Qualitätskontrolle diente eine zwei- bis dreiminütige Anfärbung mit Methyleneblau. Die Membran wurde mit Wasser entfärbt.

### 3.2.16.3 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Rediprime II Random Prime Labelling System (Amersham Pharmacia, GE Healthcare)

<sup>32</sup>P-dCTP (10 µCi/µL, Hartmann Analytic, Braunschweig)

Quick Spin S300 (Amersham Pharmacia)

1xTE-Puffer

Heringssperma-DNA (9-12 mg/mL, Sigma)

1x TE-Puffer

100 ng DNA wurden in einem Endvolumen von 45 µL Wasser aufgenommen, fünf Minuten bei 90°C denaturiert und auf Eis abgekühlt (mindestens 5 min). Ein lyophilisierte Aliquot des Rediprime II Random Prime Labelling System wurde mit dieser DNA gelöst und mit 50 µCi <sup>32</sup>P-dCTP gemischt. Es erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150 µL TE-Puffer gestoppt. Die <sup>32</sup>P-markierten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe einer Sephadex-Säule (Quick Spin S300) von freien Nukleotiden gereinigt. Die radioaktivmarkierte DNA wurde mit 30 µL Heringssperma

gemischt und fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Eventuell wurden die Sonden bei 4°C in einem Bleibehälter bis zur Verwendung gelagert.

### **3.2.16.4 Hybridisierung**

Rapid-hyb Buffer (GE Healthcare)

2xSSC-Puffer, 0,2% SDS

0,2xSSC-Puffer, 0,2% SDS

Zur Prähybridisierung wurde die Membran mit 5 mL Rapid-hyb Buffer in einer Hybridisierungsröhre für mindestens fünfzehn Minuten bei 65°C inkubiert. Die denaturierte DNA wurde danach zugegeben und über Nacht bei 65°C im Hybridisierungssofen unter Rotation inkubiert.

Die Membran wurde zunächst dreimal zehn Minuten mit 2xSSC-Puffer, 0,2% SDS bei RT und anschließend dreimal mit auf 65°C vorgewärmtem 0,2xSSC-Puffer, 0,2% SDS gewaschen. Der Erfolg des Waschvorgangs wurde mit dem Geigerzähler überprüft, es sollten noch ungefähr 100 CPS gezählt werden. Anschließend erfolgte eine Exposition der Membran auf einer Phosphoimagerplatte. Die Dauer variierte mit der Qualität der Hybridisierung und lag zwischen zwei Stunden bei GAPDH und zwei bis drei Tagen. Die Auswertung erfolgte in einem Phosphoimager (PMI™ System, Biorad).

### **3.2.16.5 Strippen der Membran eines Northern-Blot**

Die Membran wurde mit kochender 0,1%-iger SDS-Lösung übergossen und unter Schwenken abgekühlt. Das Ergebnis wurde durch eine Exposition der Membran über Nacht kontrolliert.



### 3.2.17 Southern Blot

Hybond<sup>+</sup>N-Membran (GE Healthcare, München)

Filterpapier (Whatman, GB002)

0,25 M Salzsäure

Denaturierungspuffer: 0,5 M NaOH

1,5 M NaCl

Neutralisierungspuffer: 0,5 M NaCl

1 M Tris/HCl, pH 7,2

20xSSC-Puffer: 3 M NaCl

300 mM Trinatriumcitrat-2-hydrat, pH 7,0

50 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7.0

Hybond<sup>+</sup>N-Membran (Amersham Pharmacia)

Filterpapier (Whatman, GB002)

Der Southern Blot diente zum Nachweis von bestimmten DNA-Abschnitten in genomischen DNA-Proben. Durch einen über Nacht durchgeführten Restriktionsverdau wurden spezifische Fragmente erzeugt, die anschließend in einem 0,8%-igen Agarosegel aufgetrennt wurden. Um die DNA partiell zu depurinieren wurde das Gel 20 Minuten in 0.25 M Salzsäure geschwenkt. Zur Denaturierung der DNA wurde das Gel anschließend zweimal 20 Minuten in 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl gewaschen. Nach einer 20-minütigen Neutralisierung in 0,5 M NaCl, 1 M Tris/HCl, pH 7,2, wurde das Gel zehn Minuten in 20xSSC äquilibriert. Der Blotaufbau erfolgte wie unter Methode 3.2.16.2 beschrieben. Allerdings wurde beim Southern Blot 20xSSC-Puffer für den Transfer der DNA auf die Membran eingesetzt. Der Kapillarblot erfolgte wiederum über Nacht. Die DNA wurde auf der Membran durch UV-Licht (312 nm) fixiert.

### 3.3 Zellbiologische Methoden

#### 3.3.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
S1B111 D5	Primäre embryonale Mausfibroblasten, Genotyp +/-	Eigene Präparation aus Embryonen Tag 12,5
S1B111 E8	Primäre embryonale Mausfibroblasten, Genotyp -/-	Eigene Präparation aus Embryonen Tag 12,5
3T3-L1	Maus embryonale Fibroblasten; Entwicklung zu Adipozyten induzierbar	European Collection of Cell Cultures (ECACC)
Feederzellen	Neomycin-resistente, embryonale Mausfibroblasten	Transgenic Research Facility, University Stanford
ES-Zellklon AZ0216	Murine embryonale Stammzelllinie mit einer Gene Trap-Insertion im Intron 1 des AP1S1 Gens	Mutant Mouse Regional Resource Center (MMRRC) at UC Davis

**Tabelle 2: Verwendete Zelllinien**

#### Lösungen und Medien:

PBS:	150 mM NaCl
	120 mM KCl
	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,1 g Phenolrot      pH 7,4
Trypsin-EDTA Lösung:	(Gibco Invitrogen, Karlsruhe)
	0,5 g/L Trypsin
	0,2 g/L EDTA
Medium:	Dulbecos modifiziertes Eagle Medium , 4,5 g/L (DMEM) (Gibco Invitrogen, Karlsruhe)

- 10% (v/v) Fötale Kälberserum (FKS) (PAN, Aidenbach)
- 1% (v/v) Penicilin/Streptomycin (100x Stocklösung) (Gibco Invitrogen, Karlsruhe)
- 1% (v/v) Glutamin (200 mM, 100x Stocklösung) (Gibco Invitrogen, Karlsruhe)

**Plastikwaren:**

- Gewebekulturschalen: Gewebekulturflaschen und -platten (Greiner, Nürtingen)
- Zellschaber: (Sarstedt, USA)

Die Zellen wurden in einem Brutschrank in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37°C unter Begasung mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Die Zellen wurden im Allgemeinen bei Erreichen der Konfluenz unter sterilen Bedingungen passagiert. Dazu wurden die adhärennten Zellen mit 37°C warmem PBS gewaschen und mit 1 mL Trypsin-Gebrauchslösung von der Kulturschale gelöst. Durch Zugabe von 9 mL auf 37°C vorgewärmtem Kulturmedium wurde der Vorgang gestoppt. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Aufsaugen mit einer Pipette vereinzelt und anschließend in der gewünschten Dichte ausgesät.

### 3.3.2 Bestimmung der Zellzahl

#### Zählung in der Neugebauer-Kammer

Die Neugebauer-Kammer fasst ein bestimmtes Volumen, mit ihrer Hilfe kann die Zellzahl pro Volumeneinheit bestimmt werden.

Mit einer Pasteurpipette wird die Zellsuspension in die mit einem Deckgläschen abgedichtete Zählkammer eingefüllt. Am Phasenkontrastmikroskop wird dann die Zellzahl in 16 Kleinstquadraten der Kammer ermittelt. Multipliziert mit dem Faktor 10.000 ergibt sich die Zellzahl pro Milliliter.

### 3.3.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur langfristigen Lagerung wurden Zellen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  oder in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierzu wurden die Zellen wie unter 2.2.2 beschrieben vom Boden der Zellkulturschalen abgelöst, das Medium zum Abstoppen der Trypsinreaktion hatte Raumtemperatur um die Zellen schrittweise auf Lagerungstemperatur abzukühlen. Anschließend wurden die Zellen 3 min bei  $500 \times g$  zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in 1 mL eisgekühltem Einfriermedium resuspendiert. Das Einfriermedium bestand aus dem normalen Kulturmedium mit zusätzlichen 10% (v/v) Serum und 5% (v/v) Dimethylsulfoxid. Nach 15 min auf Eis wurden die Zellen in Kryoröhrchen überführt; diese wurden zur Isolation mehrmals mit Alufolie umwickelt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Gemeinsam mit dem Dimethylsulfoxid im Medium dient dies zur Vermeidung der Bildung von schädlichen Eiskristallen.

Beim Auftauen von Zellen ist ein zügiges Arbeiten wichtig um Zellschädigungen zu vermeiden. Die Zellen wurden in einem auf  $37^{\circ}\text{C}$  erwärmten Wasserbad aufgetaut zu 10 mL vorgewärmtem Medium zugegeben. Nach einer 3-minütigen Zentrifugation bei  $500 \times g$  wurde das Pellet in frischem Medium gelöst und normal ausgesät.

### 3.3.4 Herstellung Maus-embryonaler Fibroblasten (MEF)

1xPBS

DMEM s. 3.3.1

Trypsin s. 3.3.1

Glasperlen (4-5 mm) (Schütt, Göttingen)

Am Tag 12,5 nach der Befruchtung (festgestellt durch eine Plaque-Kontrolle) wurden die schwangeren Mäuse mit  $\text{CO}_2$  betäubt und anschließend durch Genickbruch getötet. Dann wurden die Embryonen mit ihrer Amnionhülle aus dem Uterus der Mutter entnommen und in sterilem PBS gewaschen. Nach dem Entfernen der Amnionhülle wurden die Köpfe abgetrennt. Aus diesem Material wurde später DNA zur Genotypisierung isoliert. Im nächsten Schritt wurden die Organanlagen entfernt und die restlichen Gewebe mit Hilfe

von Pipetten zerkleinert. Diese Stücke wurden in einen kleinen Erlenmeyerkolben überführt, der zuvor schon mit Glasperlen und 5 mL Trypsinlösung gefüllt war. Zum Verdau des Gewebes wurden diese Kolben 15 min bei 37°C geschüttelt. Durch Zugabe von 5 mL Kulturmedium wurde die Reaktion gestoppt. Die Zellen wurden anschließend durch mehrmaliges auf- und abpipettieren vereinzelt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation mit 500xg wurde das entstandene Pellet in Kulturmedium resuspendiert und in 6 cm Platten kultiviert.

Die primären Fibroblasten wurden üblicherweise jeden zweiten Tag 1:2 passagiert.

### 3.3.5 Differenzierung von MEF bzw. 3T3-L1-Zellen zu Adipozyten

DMEM s. 3.3.1

Induktionsmedium: DMEM  
Insulin from bovine pancreas 25 µM (Stocklösung 25 mM in Hepes, Sigma)  
Dexamethason 1 µM (Stocklösung 10 mM in Ethanol, Sigma)  
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) 0,5 mM (Stocklösung 0,5 M in DMSO, Fluka)

DMEM /Insulin: DMEM  
Insulin from bovine pancreas 25 µM (Stocklösung 25 mM in Hepes, Sigma)

Frisch gewonnene, primäre Fibroblasten (s. 3.3.4) wurden spätestens nach 3 Passagen zur Differenzierung in Adipozyten zwei Tage nach Erreichen der Konfluenz induziert. Dazu wurden sie 48 Stunden lang mit Induktionsmedium kultiviert. Anschließend erfolgte ein Wechsel zu DMEM/Insulin. Nach sieben Tagen wurde die Effizienz der Differenzierung anhand einer Anfärbung mit Oil Red (s. 3.6.3) bestimmt. Analog hierzu wurden Fibroblasten der Zelllinie 3T3-L1 induziert. Die Differenzierung wurde allerdings bereits nach 3-4 Tagen DMEM/Insulin überprüft.

### 3.3.6 ES-Zellkultur

#### 3.3.6.1 Medien und Lösungen

MEF-Medium:

500 mL DMEM (Knock-Out DMEM; Gibco invitrogen, Karlsruhe 10829-018)  
6 mL MEM non-essential amino acids (100x; Gibco 11140-035)  
6 mL L-Glutamine (100x; Gibco invitrogen, Karlsruhe 25030-024)  
3 mL Penicillin/Streptomycin (100x; Gibco 15140-122)  
6 mL  $\beta$ -Mercaptoethanol-Stocklösung  
diese Lösung wurde vor FKS-Zugabe sterilfiltriert (0,2  $\mu$ m)  
95 mL FKS (entspricht 15%; Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Schwerte)

für ES-Zellen Zugabe von:

65  $\mu$ L ESGRO *leukocyte inhibitory factor* (LIF) – 1000 U/mL  
(Chemicon, Millipore, Schwalbach/Ts.)

Es wurde eine 48-stündige Sterilkontrolle angelegt und alle 7 Tage erneut L-Glutamin zugegeben.

$\beta$ -Mercaptoethanol-Stocklösung: 7,2  $\mu$ L einer 14 M Lösung (Sigma, München) in PBS

PBS s. 3.3.1

Gelatine-Stocklösung: 1 g Gelatine (Sigma G-1890) in 100 mL Wasser, autoklaviert

Gelatine-Gebrauchslösung: 0,1% Gelatinelösung in PBS

Trypsin: Trypsin-EDTA 1x (0,5%; Gibco invitrogen, Karlsruhe 25300-054)

Mitomycin C (Sigma Aldrich M0503) 0,5 mg/mL in PBS (50x)

### **3.3.6.2 Gelatinisieren der Zellkulturflaschen**

Es wurde genug Gelatine-Gebrauchslösung, um die gesamte Oberfläche der Flasche zu bedecken, in die jeweilige Kulturflasche hinein pipettiert. Nach einer mindestens zweistündigen Inkubationszeit bei RT wurde die Lösung wieder entfernt und einmal mit PBS gespült.

### **3.3.6.3 Kultivierung und mitotische Inaktivierung von Neomycin-resistenten Mausfibroblasten**

Die Neomycin-resistenten Mausfibroblasten wurden kultiviert wie unter 3.3.1 beschrieben und nach einer Behandlung mit Mitomycin C zur mitotischen Inaktivierung als Feederzellen für embryonale Stammzellen benutzt. Dazu wurden die Zellen nach Erreichen der Konfluenz maximal zweieinhalb Stunden mit Mitomycin C-haltigem (0,01 mg/mL) Medium bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit Trypsin behandelt. Nach gründlichem Vereinzeln wurden die Zellen mit der doppelten Zelldichte ausgesät wie zuvor.

### **3.3.6.4 Kultivierung muriner, embryonaler Stammzellen**

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) werden direkt nach dem Auftauen auf einen Zellrasen aus mitotisch inaktivierten Fibroblasten ausgesät. Es wurde jeden Tag das Medium gewechselt, auch drei bis vier Stunden vor dem Passagieren. Bei 80%-iger Konfluenz wurden die Zellen mit 1 mL Trypsin/EDTA abgelöst. Nachdem diese Reaktion durch Mediumzugabe beendet wurde, erfolgte eine fünfzehn minütige Inkubation bei 37°C. In dieser Zeit setzen sich nur die wesentlich schwereren Fibroblasten auf dem Gefäßboden ab, so dass die ES-Zellen im Medium abgenommen werden konnten und auf einem frischen Feederrasen im benötigten Verdünnungsverhältnis (1:2 – 1:10) ausgesät wurden.

Die Mikroinjektion der auf diese Weise kultivierten ES-Zellen und der Retransfer der injizierten Blastocysten in Ammen erfolgte im Tierhaus des Max-Planck-Instituts für experimentelle Medizin durch Frau Monika Schindler.

### **3.3.7 stabile Transfektion von 3T3-L1-Zellen**

1xPBS

DMEM s. 3.3.1

Trypsin s. 3.3.1

MATra-A-reagent (IBA, Göttingen)

Universal Magnet-Platte, 8x13 cm (IBA, Göttingen)

Zeocin™ 1:200 (Stocklösung 1000 mg/mL, Invitrogen)

Zur Transfektion der adhärennten Zellen in Zellkultur wurde die "Magnet Assisted Transfection" (MATra) - Reagenz verwendet. Die Transfektion wurde auf 10 cm-Zellkulturschalen nach den Vorgaben des Herstellers (MATra-Handbuch, Stand Mai 2005, IBA, Göttingen) durchgeführt. Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion mit 30%-Konfluenz ausgesät. Für die Transfektion wurden 17,2 µg DNA mit 1mL serumfreien Medium vermischt und zu 17,2 µL Transfektionsreagenz hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde zwanzig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zu dem frischen Zellkulturmedium zugetropft. Es folgte eine 15-minütige Inkubation der Zellen bei 37°C auf der Magnet-Platte.

Zur Selektion der transfizierten Zellen wurde das Medium 24 h nach erfolgter Transfektion gewechselt. Die Zellen wurden mit DMEM mit 50mg/mL Zeocin inkubiert. Als Sterbekontrolle wurden zusätzlich untransfizierte Zellen unter den gleichen Selektionsbedingungen kultiviert. Das Medium wurde alle 48 h ausgetauscht. Nachdem die Zellen der Kontrolle vollständig abgestorben waren, wurden Zellklone, die sich durch starkes Wachstum im Selektionsmedium auszeichneten und sich gut von anderen Zellen abgrenzten, gepickt und in einer 24-well-Platte ausplattiert. Die Zellen eines Klons wurden vermehrt und kryokonserviert.



### **3.4 Tierexperimentelle Methoden**

#### **3.4.1 Zucht und Analyse der Mäuse**

Die Mäuse wurden entweder in der Zentralen Tierexperimentalen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen oder in den Mausställen der Abteilung Biochemie 2 gezüchtet. Sie wurden unter standardisierten Bedingungen, mit 21-23°C, 45-60% Luftfeuchte und einem 12h Tag/Nachtrhythmus gehalten. Wasser und Futter waren unbeschränkt zugänglich.

#### **3.4.2 Gewinnung von Serum**

Den Mäusen wurde mit Hilfe einer Glaskapillare hinterm Auge Blut entnommen. Dieses wurde zur Gerinnung 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend 15 min bei 4°C und 3000 rpm zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgenommen und bei -80°C gelagert.

##### **3.4.3.1 Ermittlung verschiedener Parameter von Mausurin**

Die ausgewerteten Urinproben wurden über 24 Stunden in speziellen Stoffwechsellkäfigen gesammelt. Die Tiere hatten unbegrenzten Zugang zu Futter und Wasser. Diese speziellen Käfige ermöglichten die Messung der Trinkmengen und der Mengen an ausgeschiedenem Urin in einem Zeitraum von 24 Stunden. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bradford-Assay (s. 3.5.3).

Urin-Teststreifen (Heike Urban-Diagnostics, Mannheim) zur Bestimmung von Urobilinogen, Glukose, Bilirubin, Keton, pH, Blut, spezifischem Gewicht, Protein, Nitrit und Leukozyten

### **3.4.3.2 Assay zur Bestimmung der Harnstoffkonzentration im Mausurin**

QuantiChrom™ Urea Assay (DIUR-500 Fa. BioAssay Systems, Hayward, USA)

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers. Es wurde eine chromophore Lösung eingesetzt, die mit Harnstoff einen farbigen Komplex bildet. Diese Färbung wurde bei 520 nm gemessen und ist proportional zur Konzentration an Harnstoff im Urin.

### **3.4.4 Glukosetoleranz Test**

Nachdem die Mäuse 16h (über Nacht) gehungert wurden, wurde ihnen 2 g/kg Körpergewicht Glucose intraperitoneal injiziert. Zu den Zeitpunkten 0 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 75 min, 90 min, 120 min, 150 min wurde aus der jeweiligen Schwanzspitze ein Tropfen Blut entnommen. Die Blutglukosekonzentration wurde mit Hilfe eines Glucometers (Ascenia Contur®, Bayer) bestimmt.

### **3.4.5 Fettdiät**

Den Mäusen wurde ab dem 30. Tag nach der Geburt ein mit Fett angereichertes Futter (ssniff EF D12108 R/M; statt 5% hier 21% Fett) gegeben. Die Menge des Futters war unbeschränkt. Alle 7 Tage wurden die Mäuse gewogen.

### **3.4.6 Messung der Triglyceridkonzentration im Serum**

Triglycerin-Assay TG (Roche/Hitachi)

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers. Dabei wurden 500 µL der Reagenz mit 5 µL Serum vermischt und zehn Minuten bei 25°C inkubiert. Die entstandene Färbung wurde im

Photometer bei 546 nm gegen einen Reagenzlerwert gemessen und verhält sich proportional zur Serumkonzentration von Triglyceriden.

### **3.5 Proteinbiochemische Methoden**

#### **3.5.1 Ganzzellproteinextraktion aus Zellen**

Proteinase-Inhibitor-Cocktail, PIC (Fa. Sigma, Deisenhofen)

Lysispuffer 1xPBS

PIC 1:100

Die Zellen wurden durch Trypsinbehandlung abgelöst und pelletiert. Dieses Pellet wurde zweimal mit PBS gewaschen und in 200-500 µL eiskaltem Lysispuffer aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension 10x durch eine 22G Nadel aufgezogen, um die Zellen zu homogenisieren. Bei einer kleinen Zellmenge wurde diese alternativ 3x 10 sec sonifiziert. Das Homogenat wurde 10 min bei 4°C und 13.000 rpm abzentrifugiert.

#### **3.5.2 Herstellung von Gewebehomogenat**

Proteinase-Inhibitor-Cocktail, PIC (Sigma, Deisenhofen)

Lysispuffer 1xTBS

PIC 1:100

Ultra-turrax T8 (IKA Labortechnik, Staufen)

Zur Gewinnung von Gewebehomogenaten wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet. Nach der Entnahme wurden die Gewebe gewogen und neun Volumen Lysispuffer zugesetzt. Alle folgenden Schritte fanden auf Eis statt. Zur Homogenisierung wurden die Gewebe mit einem Ultraturax zerkleinert, 3x20 Sekunden sonifiziert und anschließend 15 min bei 4°C und 12.000 rpm zentrifugiert. Die Proteinbestimmung im Überstand erfolgte, wie unter 3.5.3 beschrieben.

### 3.5.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die von Bradford beschriebene Methode verwendet. Durch Bindung an Protein verschiebt sich das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliant-Blau G250 von 465 nm nach 595 nm. Die Extinktion ist dabei proportional zur Menge an Protein in der Lösung.

Biorad-Farbreagenz: Fa. Biorad, München

Proteinstandardlösung: 1 mg/mL Rinderserumalbumin (BSA)

Mit Hilfe der Standardlösung wurde eine Verdünnungsreihe der Proteinkonzentrationen von 0-16 µg/mL hergestellt. 2-10 µL der Proteinlösung wurde jeweils eingesetzt. Das Gesamtvolumen jeder Probe wurde mit Wasser auf 800 µL ergänzt. Danach wurden 200 µL der Farbreagenz zugegeben, der gesamte Ansatz gevortext und 5 min bei RT inkubiert. Zur Bestimmung der Absorption bei 595 nm wurden 200 µL in Doppelwerten auf eine 96-well-Platte pipettiert und im ELISA-Reader ausgelesen.

### 3.5.4 Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) nach Laemmli

Bei der Gelelektrophorese werden geladene Moleküle, in diesem Fall Proteine, in einer Gelmatrix unter dem Einfluss eines äußeren elektrischen Feldes bewegt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine ist dabei abhängig von der Feldstärke des angelegten Stroms, der Ladung der Moleküle und der Reibung, wobei letztere von der Matrix beeinflusst wird.

Bei Polyacrylamidgelen besteht die Matrix aus inerten Acrylamidpolymeren, die über N'N'-Methylenbisacrylamid quervernetzt sind. Dabei entstehen Poren, deren Größe von der Konzentration der Polyacrylamidmonomere und dem Grad der Quervernetzung abhängig ist. Die Polymerisation wird durch den radikalischen Zerfall von Peroxidsulfationen eingeleitet. Diese wiederum aktivieren Tetramethylethyldiaminmoleküle, die in Form ihrer Radikale die eigentlichen Starter der Radikalkettenpolymerisation bilden.

Bei einer denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese werden die Proteine in Gegenwart eines Überschusses an Natriumdodecylsulfat (SDS) und an reduzierenden Thiolverbindungen, die Disulfidbrücken zwischen Cysteinen spalten, nahezu ausschließlich aufgrund ihrer molekularen Masse elektrophoretisch aufgetrennt. Das anionische Detergenz SDS degradiert die nichtkovalenten Bindungen im nativen Protein und verleiht diesem eine negative Nettoladung. Da nahezu alle Proteine die Sulfatgruppen des SDS in einem konstanten Verhältnis von Masse zu Ladung binden, können diese im elektrischen Feld ein einheitliches Wanderungsverhalten in Richtung Anode zeigen und gemäß ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden.

Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese wird dem eigentlichen Trenngel ein Sammelgel mit sehr großer Porenweite vorangestellt, dessen pH-Wert um zwei Einheiten niedriger liegt als im Trenngel. Dies führt zur Ankonzentrierung der denaturierten Proteine an der Grenze zwischen Sammelgel und Trenngel und im weiteren zu einer Trennung mit höherer Auflösung.

Rotiphorese®-Gel30:	Acrylamid-/Bisacrylamidlösung (Carl Roth GMBH, Karlsruhe)
4xSammelgelpuffer:	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8, 0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
4xTrenngelpuffer:	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 0,4% (w/v) SDS
10% APS:	10% (w/v) Ammoniumperoxidsulfat ( Fa. Merck, Darmstadt) in a.d. , Lagerung: lichtgeschützt bei 4°C
TEMED:	Tetramethylethyldiamin (Carl Roth GMBH, Karlsruhe)
1 x Lauf-Puffer:	50 mM Tris 400 mM Glycin (Carl Roth GMBH, Karlsruhe) 0,05% (w/v) SDS 0,1 mL 0,1% Bromphenolblau, pH 8,3

6x Reduzierender Probenpuffer:

600 mM Tris/HCl, pH 6,8

400 mM DTT

12% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)

0,6% (w/v) Bromphenolblau

60% (v/v) Glycerol

Die Lösung wird aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

	Trenngel, 10% PAA	Sammelgel, 4% PAA
a.d.	3,2 mL	1,7 mL
Acrylamid	2,67 mL	0,45 mL
Trenngelpuffer	2 mL	-
Sammelgelpuffer	-	0,75 mL
10% APS	80 $\mu\text{L}$	30 $\mu\text{L}$
TEMED	8 $\mu\text{L}$	3 $\mu\text{L}$

**Tabelle 5: Zusammensetzung der Gellösungen**

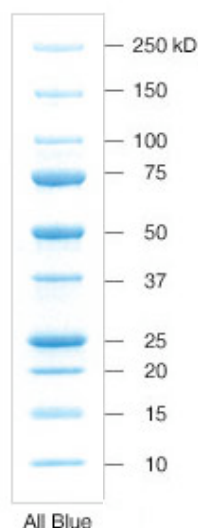
Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen wurden in Kammern der Firma BioRad, München, durchgeführt. Zwei von 1 mm dicken Abstandhaltern getrennte, fettfreie Glasplatten wurden in eine dafür vorgesehene Halterung eingespannt und bis etwa dreiviertel der Höhe mit Trenngellösung gefüllt (s. Tabelle 5). Die Lösung wurde eingefüllt und vorsichtig mit 70%-igem Ethanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde der Alkohol abgeschüttet, die restliche Kammer mit Sammelgellösung (s. Tabelle 5) gefüllt und sofort der Probentaskenkamm eingesetzt. Nachdem auch das Sammelgel auspolymerisiert war, wurde das Gel mit Glasplatten und Abstandhaltern in die Minigelkammer eingesetzt, die Kammer mit Lauf-Puffer gefüllt und der Probentaskenkamm entfernt.

Die Proteinproben wurden 6:1 mit 6x Probenpuffer versetzt, 10 min bei  $95^{\circ}\text{C}$  denaturiert und anschließend in die Probentaschen eingefüllt. Solange sich die Proben im Sammelgel befanden, wurden die Gelelektrophoresen bei einer

konstanten Stromstärke von 15 mA durchgeführt. Anschließend wurde die Stromstärke verdoppelt.

### **Proteinmolekulargewichtsmarker:**

Um die Größe der Proteine besser zuordnen zu können, wird pro Gel eine Tasche mit einem Proteinmarker gefüllt. Molekulargewichtsmarker für Gelelektrophoresen sind Gemische von Proteinen definierter Größe. Der verwendete, vorgefärbte Marker Precision Plus Protein All Blue Standard stammt von der Firma Biorad, München und wurde aliquotiert bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.



**Abb.9: Proteinstandard**

### **3.5.5 Proteintransfer auf Nitrozellulose ( Western Blot )**

Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgel tragen die Proteine eine negative Nettoladung. Durch das Anlegen eines Stromes können die Proteine daher auf der der Anode zugewandten Seite austreten und auf einer PVDF-Membran gebunden werden. Hier liegen sie in der gleichen relativen Position zueinander vor und sind für weitere Reaktionen, wie die Anfärbung durch Antikörper, zugänglich.

### 3.5.5.1 Halbtrockenblot

2xAnodenpuffer: 75 mM Tris/HCl pH 7,4  
20% Methanol

2xKathodenpuffer: 20 mM Tris/HCl pH 9,0  
40 mM  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure  
20% Methanol

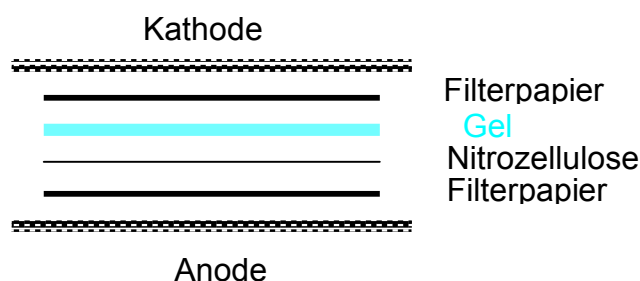
Nitrozellulose-Membran (GE-Healthcare, Schleicher und Schüll, Dassel)

PVDF-Membran (GE-Healthcare, Schleicher und Schüll, Dassel)

Filterpapier (Whatman)

Ponceau S-Lösung (Sigma): 0.5% PonceauS-Konzentrat in 1% Essigsäure

Zunächst wurden 6 Filterpapiere und eine Nitrozellulosemembran Protran<sup>®</sup> auf die Größe des Gels geschnitten. Die Filterpapiere wurden in Transferpuffer getränkt. Die PVDF-Membran wurde erst mit Methanol gespült und dann ebenfalls in Transferpuffer getränkt. Die Schichtung erfolgte folgendermaßen:



Der Transfer der Proteine erfolgte bei  $1 \text{ mA/cm}^2$  Gelfläche für 75 min.

### 3.5.5.2 Nassblot

Da der Transfer sehr großer Proteine ( $> 100 \text{ kDa}$ ) im Halbtrockenblot problematisch sein kann, wurden einige Gele im Naßblot-Verfahren auf Membran transferiert.



Transferpuffer:           20 % (v/v) Methanol  
                              192 mM Glycin  
                              25 mM TrisBase

Die Westernblots wurden mit Hilfe einer vertikalen Tankblot-Standardapparat der Firma Bio-Rad durchgeführt. Der Blotvorgang erfolgte im Kühlraum bei konstanter Stromstärke von 250 mA für 6 h oder bei 200 mA über Nacht.

Blotaufbau:

**Anode (+)**

Schwamm, getränkt in Nassblotpuffer

3 Lagen Filterpapier, getränkt in Nassblotpuffer

PVDF- (mit Methanol befeuchtet) oder Nitrozellulose-Membran

Polyacrylamidgel

3 Lagen Filterpapier, getränkt in Nassblotpuffer

Schwamm, getränkt in Nassblotpuffer

**Kathode (-)**

### 3.5.5.3 Immunfärbung auf Nitrozellulose/PVDF-Membranen

Die transferierten Proteine können mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden. Hierzu werden zunächst die unspezifischen Bindungsstellen durch Inkubation mit Blockpuffer abgesättigt und danach erkennen Erstantikörper ein spezifisches Protein. Ein zweiter mit Meerrettich Peroxidase (HRP) gekoppelter Antikörper, der gegen die konstanten Domänen der schweren Kette von Antikörpern gerichtet ist, bindet wiederum diese ersten spezifischen Antikörper. Der Immunkomplex kann nun durch eine Enzymreaktion der Peroxidase in Anwesenheit von  $H_2O_2$  sichtbar gemacht werden.

TBS-Tween-Milch: 5% Magermilchpulver  
                          150 mM NaCl  
                          25 mM Tris pH 7,4  
                          0,05% Tween 20

Waschpuffer: 0,05% Tween 20 in TBS

Luminol-Detektionsfertigsystem SuperSignal<sup>®</sup> (Thermo Scientific, USA):

SuperSignal<sup>R</sup> West Pico Chemiluminescent Substrat

SuperSignal<sup>R</sup> West Femto Maximum Sensitivity Substrat, wurde 1:10 mit Pico Chemiluminescent Substrat verdünnt

Intelligent Dark Box II, LAS-1000+ (Fuji, Japan)

Phosphoimager Fujix BAS1000 (Fuji, Japan)

Name	Klonalität	Herkunft	Verdünnung
Anti-Sortilin aus Kaninchen	polyklonal	Abcam, UK	1:300
Anti-HSC70 aus Ratte	monoklonal	Abcam, UK	1:1000
Anti-GLUT4	Polyklonal	Abcam, UK	1:1000

**Tabelle 6: Erstantikörper Western Blot**

Name	Herkunft	Verdünnung
Ziege anti Kaninchen	Dianova, Hamburg	1:10000
Ziege anti Maus	Dianova, Hamburg	1:10000

**Tabelle 7: Zweitantikörper, Meerrettich Peroxidase (HRP) gekoppelt**

Zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran 45 min mit Blockpuffer inkubiert. Anschließend fand eine Inkubation der Nitrozellulosemembran mit dem Erstantikörper für 2h bei Raumtemperatur oder alternativ bei 4°C über Nacht statt. Um überschüssigen Antikörper zu entfernen, wurde die Membran dreimal in TBS-Tween-Lösung gewaschen. Hierauf erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, für mind. 45 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde erneut durch dreimaliges Waschen überschüssiger Antikörper entfernt. Alle Inkubations- und Waschschrte wurden auf dem Schüttler ausgeführt, so dass die Membran in

den Flüssigkeiten ständig leicht geschwenkt wurde. In der anschließenden Chemolumineszenz-Nachweisreaktion findet eine Oxidation von zugefügtem Luminol durch die Meerrettichperoxidase statt. Während des Substratumsatzes wird Licht der Wellenlänge 428 nm emittiert, das über einen Detektor (Fuji LAS-1000) ausgewertet wird. Die Belichtungszeit lag in der Regel zwischen 10 Sekunden und 5 Minuten.

### **3.6 sonstige Methoden**

#### **3.6.1 ELISA zur Messung von Serumkonzentrationen**

##### **verschiedener Adipokine**

Es wurden ausschließlich kommerziell erhältliche, etablierte Assays verwendet. Dabei wurden die jeweiligen Anleitungen der Hersteller befolgt. Es handelte sich bei allen um quantitative "sandwich"-Enzym-Immunoassays. Dabei wurde eine 96 well-Mikrotiterplatte mit einem monoklonalem spezifischem Antikörper beschichtet. Dieser bindet das nachzuweisende Protein aus den Standards, Kontrollen und Proben. Nachdem ungebundene Serumbestandteile abgewaschen wurden, wurde ein enzym-gekoppelter, polyklonaler Antikörper gegen das entsprechende Protein hinzugegeben. Ungebundener Antikörper wurde ebenfalls abgewaschen, bevor eine Substratlösung in die Vertiefungen pipettiert wurde. Die so entsehende blaue Färbung schlug nach Zugabe einer Stopplösung in Gelb um. Die Intensität dieser Färbung korreliert mit der Menge an dem im ersten Schritt gebundenem Protein und kann in einem Platten-Lesegeräte (Spectra, Fa. Tecan, Männedorf, Schweiz) bei 450 nm bestimmt werden.

Gemessen wurden die Konzentrationen folgender Proteine:

Resistin (Quantikine® R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt)

IGF-I (Quantikine® R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt)

Leptin ( Firma Mediagnost, Reutlingen)

Adiponectin (Firma Invitrogen, Carlsbad, Californien)

### 3.6.2 FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) –

#### Analyse von isolierten Adipozyten

Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer (KRB)	12,5 mM HEPES-NaOH	pH7,4
	120 mM NaCl	
	6 mM KCl	
	1,2 mM MgSO <sub>4</sub>	
	1 mM CaCl <sub>2</sub>	
	1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
	10 mM NaHCO <sub>3</sub>	
	10 mM Glukose	

crude collagenase – Typ II (Sigma)

1xPBS

FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Heidelberg)

Zur Isolierung der Adipozyten wurden  $\sigma$ 1B-Mäusen epididymale Fettpolster entnommen. Das Gewebe wurde mit einer Skalpellklinge zerkleinert, in KRB-Puffer mit 10 mg/mL Kollagenase aufgenommen und bei 37°C 30 Minuten unter Schütteln inkubiert. Das so verdaute Gewebe wurde anschließend 5-mal mit 2 mL KRB-Puffer gewaschen. Dazu wurde es bei 600xg eine Minute zentrifugiert. Der Überstand und das Pellet aus Bindegewebe und Erythrozyten wurde dabei vorsichtig abgesaugt, so dass nur die obenauf schwimmenden Fettzellen übrig blieben. Danach wurden die Zellen durch drei weitere Zentrifugationen in PBS umgepuffert. Dabei wurde die Zelldichte auf  $10^7$  Zellen pro mL eingestellt. Es wurden 30.000 Zellen pro Tier analysiert.

### 3.6.3 Anfärbung von Adipozyten mit Oil Red O

Oil Red (1-([4-(Xylylazo)xylyl]azo)-2-naphthol, Sigma, Deisenhofen) ist ein Farbstoff der Triglyceride, Fettsäuren und Lipoproteine anfärbt. In dieser Arbeit wurde es als Marker für Adipozyten verwendet.

Stocklösung: 3 mg/L in Isopropanol (7,3  $\mu$ M)

Gebrauchslösung: 3 Teile Stocklösung plus 2 Teile H<sub>2</sub>O

Nach zehn Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde diese Lösung mit einem Faltenfilter (Nr. 595 ½, Fa Schleicher und Schüll, Dassel) geklärt. Sie ist max. zwei Stunden stabil.

10% Formalin (Carl Roth, Karlsruhe)

Die Zellen wurden durch eine halbstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit 10% Formalin fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1xPBS folgte eine zehnminütige Anfärbung bei Raumtemperatur mit der Gebrauchslösung. Nach dreimaligem Waschen mit H<sub>2</sub>O wurde die Färbung am Mikroskop ausgewertet. Zur Quantifizierung wurde die Hintergrundfärbung durch einmaliges Waschen mit 60%-igem Isopropanol entfernt und anschließend mit 1 mL reinem Isopropanol in einer 10 minütigen Inkubation die Zellen komplett entfärbt. Die Menge des zuletzt ausgewaschenen Red Oil konnte dann photometrisch bei einer Wellenlänge von 510 nm bestimmt werden.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Phänotypisierung des $\sigma 1B$ -defizienten

#### *Mausstamms*

In einer vorangegangenen Arbeit wurde in unserer Arbeitsgruppe ein  $\sigma 1B$ -defizienter Mausstamm generiert (Riel, 2004). Hierzu wurde das auf dem X-Chromosom gelegene, für die Expression von  $\sigma 1B$  verantwortliche AP1S2-Gen durch Einfügen einer Neomycin-Resistenz-Kassette in Exon 3 zerstört. Die Zucht hat den genetischen Hintergrund einer Mischung aus C57/B6J und 129/Ola-Mäusen.  $\sigma 1B$ -defiziente Tiere beiderlei Geschlechts entwickeln sich wie ihre Wildtyp-Geschwister. Sie wachsen gleich schnell, sind gleich groß, fertil und erreichen ein normales Alter. Erste histologische Studien einiger Gewebe (wie Skelettmuskel, lymphatische Organe, Leber, Gehirn und Milz) zeigten bisher keine Unterschiede auf Grund der  $\sigma 1B$ -Defizienz. Northern-Blots bestätigten das Fehlen eines  $\sigma 1B$ -Transkriptes und zeigten, dass die  $\sigma 1A$  und  $\sigma 1C$  Transkription nicht hochreguliert sind. In der vorliegenden Arbeit sollten die Organe mit höchster  $\sigma 1B$ -Expression noch genauer auf phänotypische Unterschiede auf Grund der  $\sigma 1B$ -Defizienz untersucht werden.

#### 4.1.1 Wasserhaushalt der $\sigma 1B$ -defizienten Mäuse

Bei der Beobachtung von  $\sigma 1B$ -defizienten Tieren fiel auf, dass insbesondere mehrere männliche Tiere, äußerst schmerzempfindlich waren. Äußerlich waren bei diesen Tieren Vorwölbungen an der Bauchseite zu sehen. Nach der Eröffnung des Abdomens wurde meist eine stark mit Urin angefüllte (hydropische) Blase beobachtet. Häufig waren auch eine, manchmal sogar beide Nieren betroffen. Letztere zeigten ebenfalls eine große Flüssigkeitsansammlung im Nierenbecken mit hydropischer Schwellung. Das eigentliche Nierengewebe wurde dadurch an den Rand gedrängt. Beispielhaft zeigt die Abbildung 10 den Situs eines solchen Tieres. Bei den weiteren Untersuchungen wurden keine Abflussbehinderungen im Bereich der unteren Harnwege festgestellt. Insgesamt wurden in einem Jahr 35 männliche  $\sigma 1B^{-/-}$

Mäuse getötet und 4 dieser Tiere waren, wie oben beschrieben, dramatisch verändert. Von 40 männlichen  $\sigma 1B^{+/+}$ -Mäusen zeigte keine eine Auffälligkeit im Bereich der Nieren oder der Blase. Es gab auch einen Fall eines betroffenen weiblichen  $\sigma 1B^{-/-}$ -Tieres. Wegen der deutlichen Assoziation der Fehlbildung mit dem männlichen Geschlecht haben wir uns bei den weiteren Untersuchungen auf männliche Tiere des  $\sigma 1B$ -Mausstammes konzentriert.



**Abbildung 10: Photo einer 5 Monate alten, männlichen,  $\sigma 1B$ -defizienten Maus, deren Niere und Blase stark mit Urin angefüllt sind.**

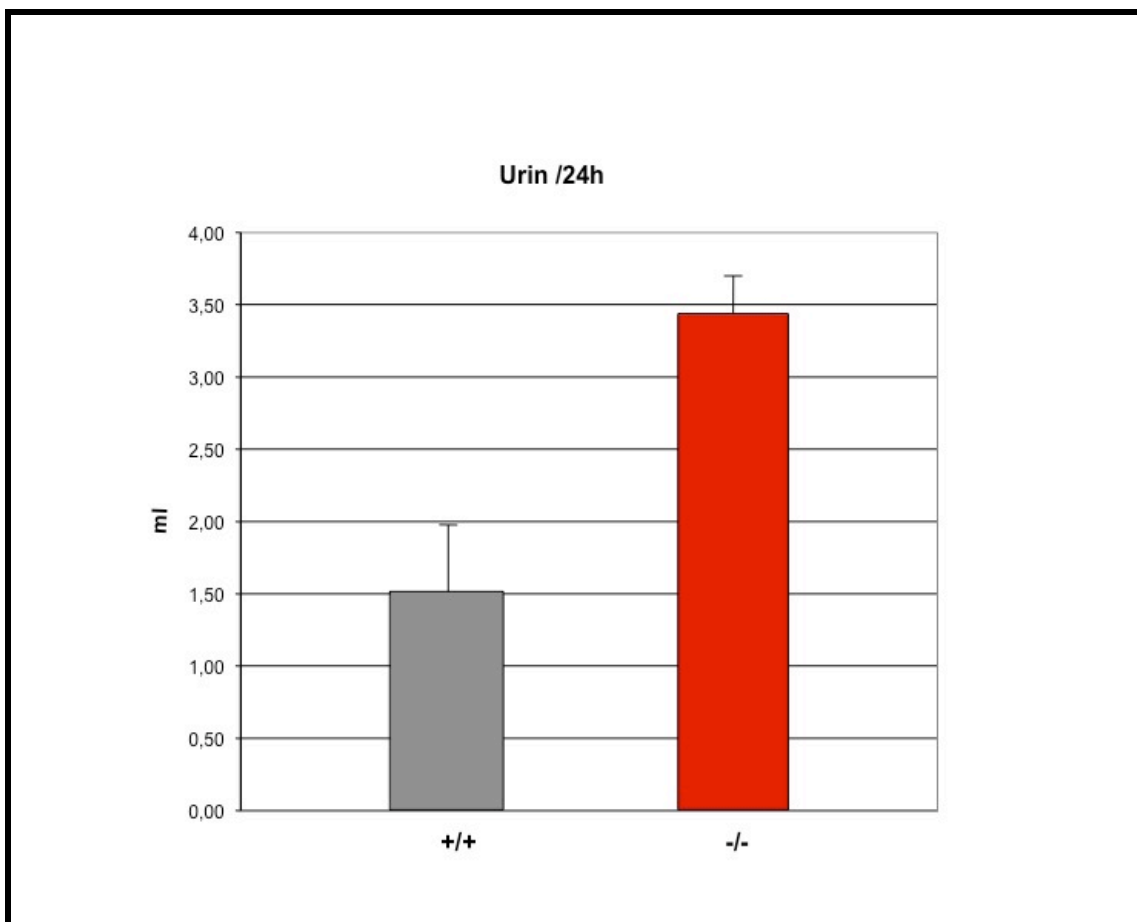
Der Pfeil mit der ausgefüllten Spitze deutet auf die Blase, während der Pfeil mit nicht ausgefüllter Spitze auf die Flüssigkeitsansammlung in der Niere hinweist.

Zunächst wurde auf Grund der beschriebenen Auffälligkeiten der Urin der  $\sigma 1B$ -defizienten-Mäuse näher untersucht, um Hinweise auf eine mögliche Fehlfunktion der Nieren zu bekommen. Dazu setzten wir 5  $\sigma 1B^{-/-}$ - und 5  $\sigma 1B^{+/+}$ -Mäuse jeweils für 24h in spezielle Stoffwechselkäfige, die es ermöglichen, die Exkremente getrennt aufzufangen und die Menge an aufgenommenener Nahrung und getrunkenem Wasser zu messen. In einem

---

ersten Versuch wurde die Menge an ausgeschiedenem Urin innerhalb von 24h bestimmt. Die circa 1Jahr alten, männlichen Mäuse wurden im Abstand von jeweils 2 Tagen fünfmal in die Käfige gesetzt und der in dieser Zeit produzierte Urin wurde aufgefangen und gemessen. Die Gruppe aus 5  $\sigma 1B$ -defizienten Tieren schied fast 3,5 mL in 24h aus. Dies war im Vergleich zur Kontrollgruppe mehr als die doppelte Menge Urin (s. Abbildung 11). Die Kontrollgruppe bestand aus 5 gleichaltrigen Männchen, die einer parallel geführten Kontrollzucht entstammten. Sie schieden ungefähr 1,5 mL in 24h aus. Dies entspricht der für Mäuse normalen Menge von 1,6 mL, die von der „Mouse Genome Informatics“-MGI im Internet angegeben wird ([http://www.informatics.jax.org/mgihome/other/mouse\\_facts1.shtml](http://www.informatics.jax.org/mgihome/other/mouse_facts1.shtml)). Im gleichen Zeitraum hatten die  $\sigma 1B^{-/-}$ -Mäuse 5,4 mL und die Kontrollmäuse 3,7 mL Wasser getrunken.





**Abbildung 11: Graphische Darstellung der in 24h ausgeschiedenen Harnmengen von  $\sigma$ 1B-defizienten-Mäusen und Mäusen aus einer Kontrollzucht.**

Der Harn der Mäuse wurde an 5 nicht aufeinander folgenden Tagen über einen Zeitraum von 24h in speziellen Stoffwechsellkäfigen gesammelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Mengen an ausgeschiedenem Urin von 5 Mäusen je Gruppe. Die Gruppen bestehen aus  $\sigma$ 1B-defizienten Tieren (-/-) und aus Tieren einer Kontrollzucht (+/+). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an. Mann-Whitney-Test:  $p=0,0079$

Da unter anderem über die Menge an ausgeschiedenem Harn auch der Blutdruck reguliert werden kann, wurde dieser sowohl bei  $\sigma$ 1B-defizienten Mäusen als auch bei Kontrolltieren gemessen (vgl. Tabelle 8). Der mittlere Blutdruck beider Gruppen mit jeweils 5 Tieren betrug 1,1 mmHg. Die maximalen Werte lagen bei 2,82 mmHg (Kontrolltiere) und 2,54 mmHg ( $\sigma$ 1B-defiziente Mäuse). Es zeigen sich also keine Genotyp-abhängigen Unterschiede.

	Kontrolle (n=5)	$\sigma 1B^{-/-}$ (n=5)
mittlerer Blutdruck (mmHg)	1,10	1,10
maximaler Blutdruck (mmHg)	2,82	2,54

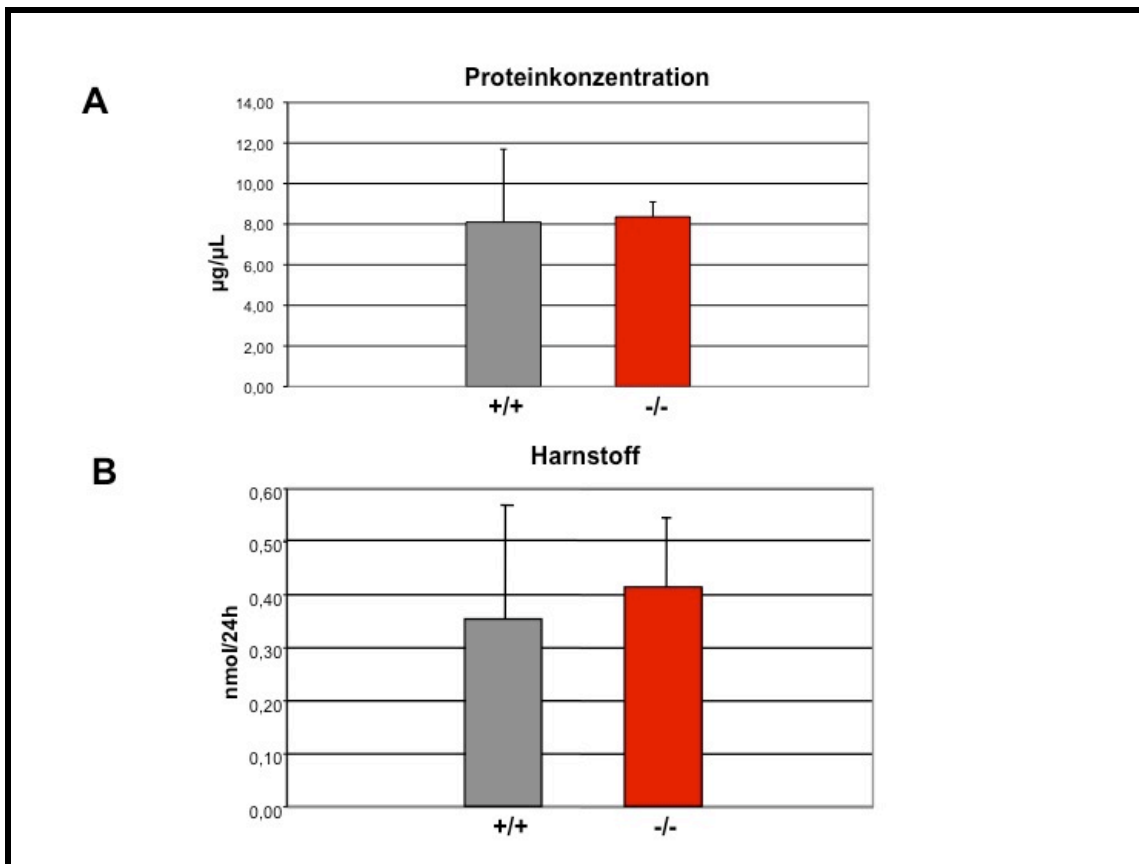
**Tabelle 8: Messung des Blutdrucks von Kontrollmäusen und  $\sigma 1B$ -defizienten Mäusen.** Dargestellt sind der mittlere und der maximale Blutdruck von Kontrollmäusen (Kontrolle) und  $\sigma 1B$ -defizienten Mäusen.

Bei der Wiederholung der Messung des Wasserhaushalts blieb die Anordnung unverändert, die Tiere waren jedoch erst 4 bis 5 Monate alt im Gegensatz zu den 11-12 Monate alten Tieren des ersten Versuchs. Die Kontrollgruppe bestand aus 5 männlichen Wildtyp-Tieren, die direkt aus der Zucht der  $\sigma 1B$ -defizienten Tiere entstammten ( $\sigma 1B^{+/+}$ ). In dieser Zucht werden in der Regel heterozygote (+/-) Weibchen mit Wildtyp- oder defizienten Männchen (+/Y bzw. -/Y) verpaart, so dass sowohl Wildtyp-Mäuse (+/+) als auch heterozygote Tiere (+/-) und  $\sigma 1B$ -defiziente (-/-) Nachkommen geboren werden. Im Vergleich zu dieser Kontrollgruppe aus 5  $\sigma 1B^{+/+}$ -Mäusen konnten keine Unterschiede in der Menge an ausgeschiedenem Urin beobachtet werden. Im Durchschnitt wurden in 24h 3 mL pro Tier aufgefangen. Dies entspricht der Menge an Harn der  $\sigma 1B$ -defizienten Tiere aus dem ersten Versuch. Es gab jedoch ein  $\sigma 1B$ -defizientes Tier, das weit über dem Durchschnitt lag und im Mittel der 5 Tage 5,5 mL urinierte. Ähnliche Einzelfälle waren auch zuvor schon beobachtet worden.

Um die Funktion der Nieren zu überprüfen, wurden, neben der Menge des gesammelten 24h-Urins, weitere Parameter bestimmt, wobei alle Kontrolltiere der  $\sigma 1B$ -Zucht entstammten und ca. 5 Monate alt waren. Zunächst wurde die Proteinkonzentration des Harns mittels eines Bradford-Assays (s. 3.5.3), und damit die Gesamtmenge an ausgeschiedenem Protein bestimmt. Die

Konzentrationen betragen 8,10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  im Urin der  $\sigma\text{1B}^{+/+}$ -Mäuse und 8,3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  im Urin der  $\sigma\text{1B}^{-/-}$ -Mäuse. Die Gesamtmenge an ausgeschiedenem Protein lag bei 22,6 g ( $\sigma\text{1B}^{+/+}$ -Mäuse) bzw. 19,7 g ( $\sigma\text{1B}^{-/-}$ -Mäuse) in 24h, d.h. es konnten keine Unterschiede zwischen  $\sigma\text{1B}$ -defizienten Tieren und Wildtyp-Kontrollen beobachtet werden (siehe Abbildung 12 A). Auch das Proteinmuster im Urin der  $\sigma\text{1B}$ -defizienten Mäuse, das durch eine SDS-Page unter reduzierenden Bedingungen ermittelt wurde, zeigte keine Veränderungen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (Daten nicht gezeigt). Eine Erhöhung hochmolekularer Proteine ( $> 60$  kDa) hätte dabei auf eine Schädigung der glomerulären Filtration hinweisen können, wohingegen eine vermehrte Ausscheidung niedermolekularer Proteine ( $< 60$  kDa) auf eine gestörte Rückresorption im tubulären Bereich hingedeutet hätte.

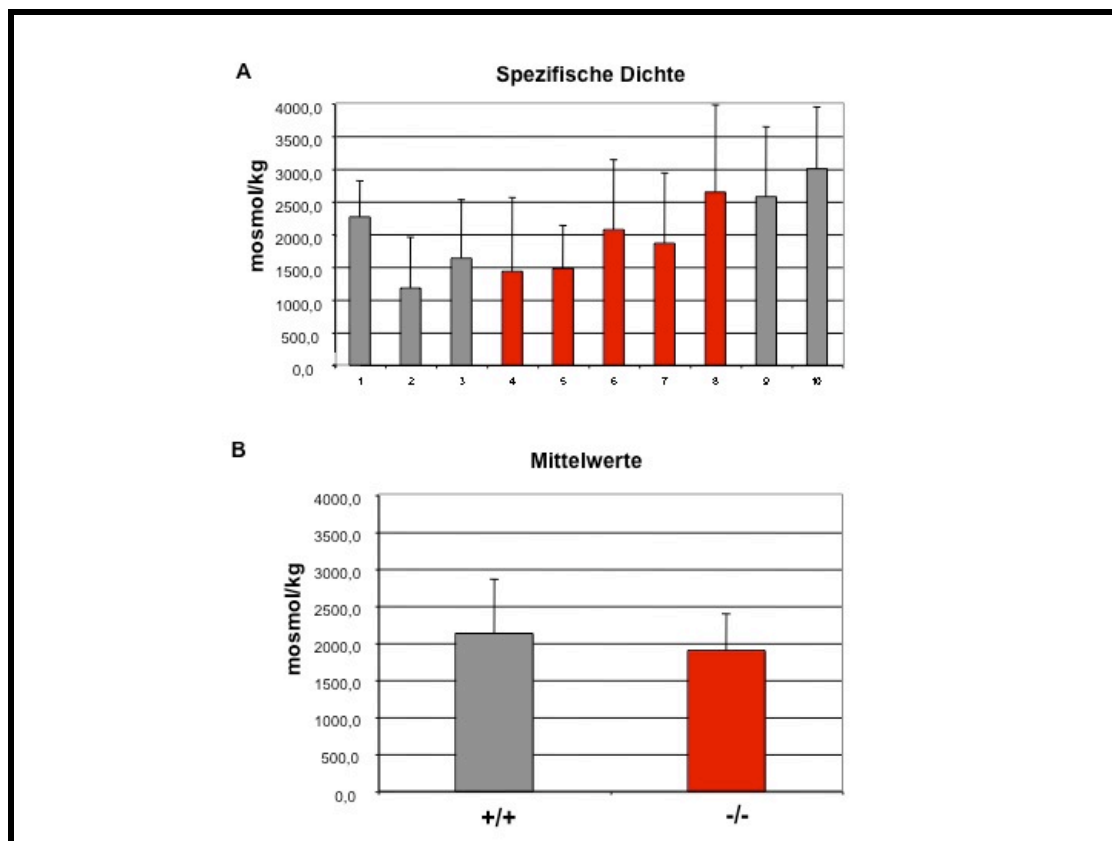
Mit einem colorimetrischen Assay, der speziell auf biologische Proben abgestimmt ist (siehe 3.4.3.2), wurde außerdem die Menge an ausgeschiedenem Harnstoff bestimmt. Die errechnete Konzentration an Harnstoff im Urin der  $\sigma\text{1B}^{+/+}$ -Mäuse betrug 1,45 mmol/L und die Konzentration des Harnstoffs im Urin der  $\sigma\text{1B}^{-/-}$ -Mäuse lag bei 1,36 mmol/L. Dies entspricht 0,41 nmol bzw. 0,35 nmol an ausgeschiedenem Harnstoff in 24h. Die errechneten Mittelwerte der Harnstoffkonzentrationen im 24h-Urin der  $\sigma\text{1B}$ -defizienten Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigten also keine Unterschiede (s. Abbildung 12 B).



**Abbildung 12: Graphische Darstellung der Proteinkonzentrationen des 24h-Urins von  $\sigma 1B$ -defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen der gleichen, isogenen Zucht**

Der Harn der Mäuse wurde an 5 nicht aufeinander folgenden Tagen über einen Zeitraum von 24h in speziellen Stoffwechsellkäfigen gesammelt. Abgebildet werden die mittleren Proteinkonzentrationen des Urins (A) und die Mittelwerte der Mengen an ausgeschiedenem Harnstoff (B). Die Gruppen bestehen aus  $\sigma 1B$ -defizienten Tieren (-/-) sowie aus Tieren, die der gleichen Zucht entstammen, aber zwei Wildtyp-Allele besitzen (+/+).

Die Osmolarität des 24h-Urins wurde über die Bestimmung des Gefrierpunktes ermittelt. Sie zeigte in beiden Gruppen erhebliche individuelle Unterschiede mit Werten von 1180 mosmol/kg bis 3000 mosmol/kg. Die Gruppen bestanden aus 5  $\sigma 1B^{+/+}$ -Mäusen und 5  $\sigma 1B^{-/-}$ -Mäusen, von denen jeweils 5 Messwerte ausgewertet wurden. Die Mittelwerte beider Gruppen lagen bei 2100 mosmol/kg bzw. 1900 mosmol/kg, so dass sich keine Genotyp-abhängigen Veränderungen ergaben (vgl. Abbildung 13).



### Abbildung 13: Messung der Osmolarität des Urins von $\sigma 1B^{+/+}$ - und $\sigma 1B^{-/-}$ -Mäusen

Zur Bestimmung der Osmolarität des Urins wurde an 5 Tagen von je 5 männlichen Mäusen pro Genotyp der Urin über 24h gesammelt und ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte über 5 Tage für die einzelnen Tiere, grau sind die Kontrollen und rot die defizienten Tiere, und die Mittelwerte aller Tiere eines Genotyps. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Des Weiteren wurde der 24h-Urin mittels Urinteststreifen noch auf folgende Parameter hin untersucht (s. 3.4.3.1): Urobilinogen, Ketone, Blut (Hämoglobin), Nitrit und Leukozyten. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen  $\sigma 1B^{+/+}$ - und  $\sigma 1B^{-/-}$ -Mäusen (Daten nicht gezeigt). Der gleichfalls ermittelte pH-Wert des Urins schwankte zwischen 6 und 7. Auch hier ergab sich kein signifikanter Unterschied.

Sowohl  $\sigma 1B^{-/-}$ - als auch  $\sigma 1B^{+/+}$ -Mäuse scheiden also im Mittel 3 mL Urin in 24h aus. Die Tiere aus der Kontrollzucht mit dem gleichen genetischen Hintergrund scheiden allerdings nur 1,5 mL Urin in 24h aus. Da alle weiteren

---

gemessenen Parameter des Urins der Tiere des  $\sigma$ 1B-Mausstammes unauffällig waren, liegt es nahe, dass es sich bei dieser Beobachtung um eine für diese Inzucht spezifische Eigenschaft handelt, die unabhängig von der  $\sigma$ 1B-Defizienz zu sein scheint. Es sollte jedoch nicht übersehen werden, dass auch in der zweiten, jüngeren Kohorte eine  $\sigma$ 1B-defiziente Maus deutlich mehr Harn ausgeschieden hat. Mögliche Gründe für die initiale Beobachtung, dass  $\sigma$ 1B-defiziente Mäuse diese extremen Rückstauungen des Harns zeigen, werden unter 5.2.1 weiterführend diskutiert.

### 4.1.2 Serumanalyse $\sigma 1B$ -defizienter Mäuse

Zur Untersuchung des Serums wurde den männlichen  $\sigma 1B$ -defizienten Mäusen und Kontrollmäusen retrobulbär Blut entnommen und durch Gerinnung und Zentrifugation daraus Serum gewonnen. Diese Seren wurden am Tierärztlichen Institut, Abteilung Hygiene der Nutztiere der Universität Göttingen analysiert. Es wurden einige Parameter untersucht, die auf eine mögliche Veränderung der Nierenfunktion oder der Modulation der Wirkung von Insulin hindeuten könnten (vgl. 4.1.1 und 4.1.3.2). Alle analysierten Parameter waren in den  $\sigma 1B$ -defizienten Mäusen und den Kontrolltieren vergleichbar (s. Tabelle 9).

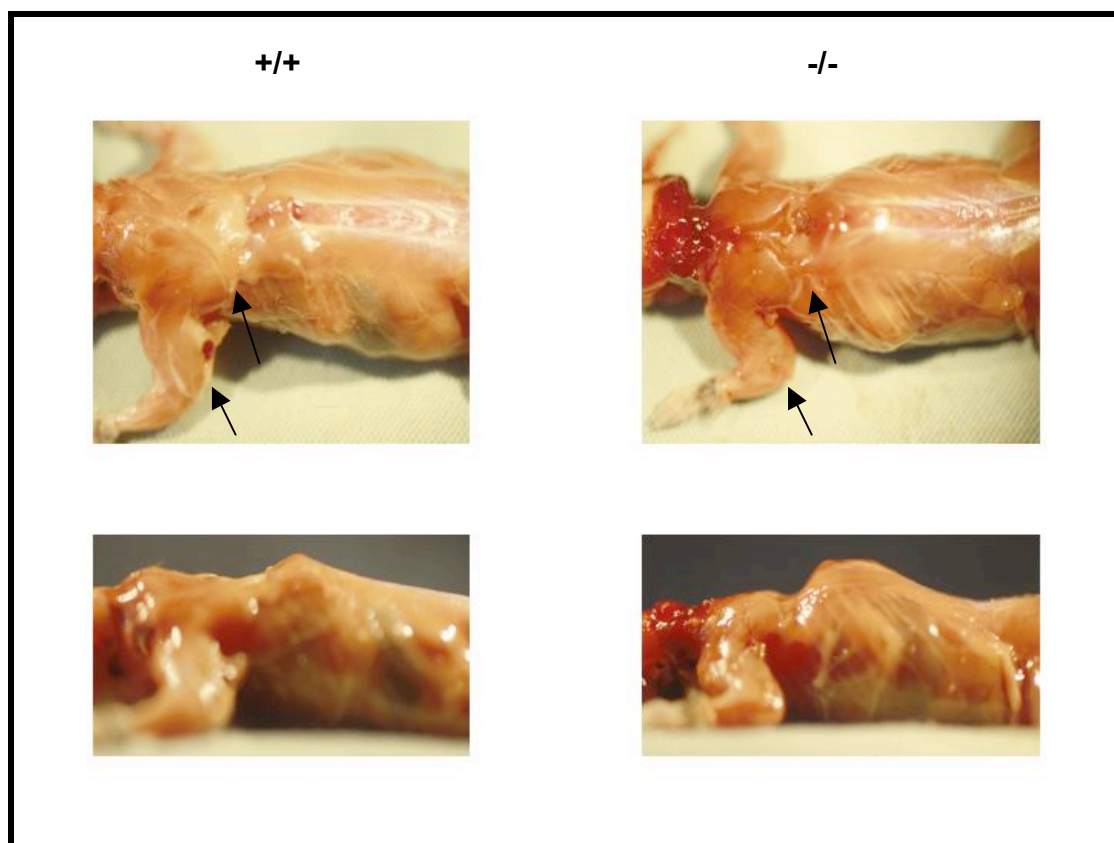
	Kontrolle (n=5)	$\sigma 1B^{-/-}$ (n=5)
Gesamtprotein (g/dL)	5,7 ± 0,34	5,5 ± 0,28
Harnstoff (mg/dL)	57,7 ± 8,35	55,3 ± 5,0
Kreatinin (mg/dL)	0,45 ± 0,03	0,44 ± 0,03
Cholesterin (mg/dL)	110 ± 28,4	98,9 ± 28,6
Glukose (mg/dL)	142 ± 24,6	149 ± 10,4

**Tabelle 9: Analytierte Serumwerte von Kontrollmäusen und  $\sigma 1B$ -defizienten Mäusen**

Zur Analyse des Serums wurde je Genotyp 5 männlichen Tieren im Alter von 4-5 Monaten retrobulbär Blut entnommen und aus diesem Serum gewonnen. Die Bestimmung der Serumwerte erfolgte am Tierärztlichen Institut, Abteilung Hygiene der Nutztiere der Universität Göttingen. Angegeben sind der errechnete Mittelwert der Untersuchungsergebnisse und die Standardabweichung.

### 4.1.3 $\sigma 1B$ -abhängige Funktion von Fettgeweben

Bereits im ersten Wurf der  $\sigma 1B$ -F1 Generation wurde auffällig, dass die 5 defizienten, männlichen Tiere sich schon äußerlich von ihren 3 Wildtyp-Geschwistern unterschieden. Im Alter von 6 Monaten war ein Buckel zu erkennen. Röntgenaufnahmen zeigten allerdings nur moderate Verformungen der Wirbelsäule. Nach dem Entfernen der Haut wurde ersichtlich, dass das Fettgewebe zwischen den Schulterblättern und an den Oberarmen vollständig fehlte. Das Fehlen dieses Gewebes erweckte den Eindruck eines Buckels bei den Tieren (siehe Abbildung 14). Daher konzentrierten sich die nächsten Versuche darauf, die Funktion des Fettgewebes der  $\sigma 1B$ -defizienten Mäuse zu untersuchen.

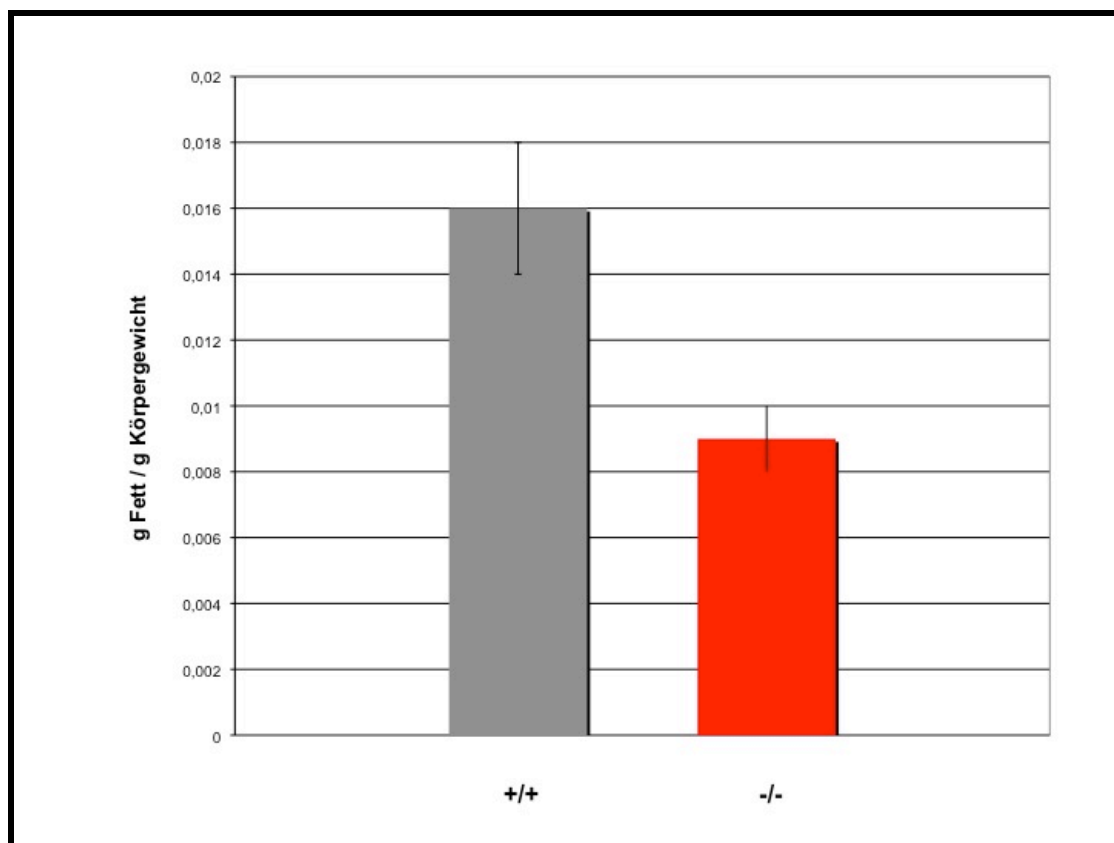


**Abbildung 14: Fehlendes Fettgewebe in  $\sigma 1B$  defizienten Mäusen** Diese Photos zeigen den Extremfall eines Wurfs (4 Männchen 2:2), bei dem die  $\sigma 1B$  defizienten Geschwister im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren fast keine Fettpolster an den Oberarmen und zwischen den Schulterblättern haben. Auf beide Stellen deuten jeweils Pfeile. Dies ergab am lebenden  $\sigma 1B^{-/-}$ -Tier den Eindruck eines Buckels. Röntgenuntersuchungen zeigten aber keine Skelettveränderungen (Riel, 2004).



#### 4.1.3.1 Charakterisierung des Fettgewebes

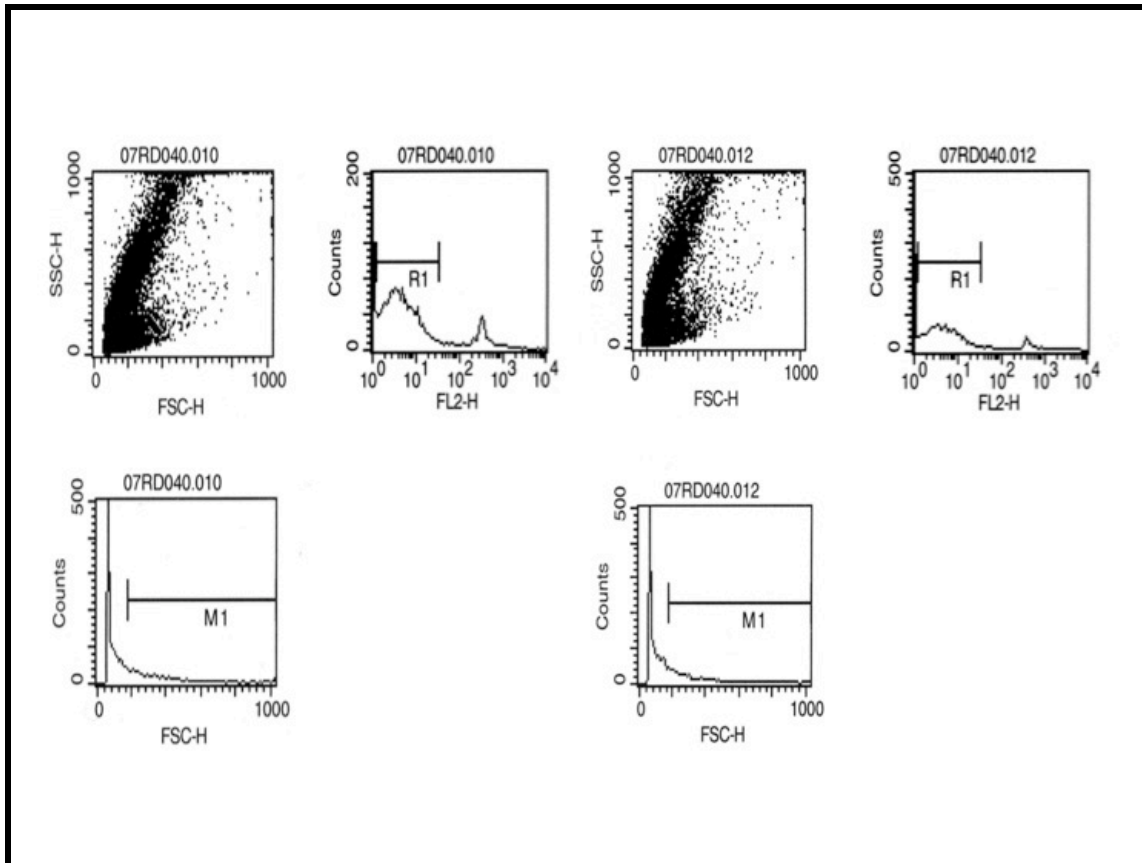
Da dieser geschilderte Fall einer extremen Buckelbildung nicht mehr beobachtet wurde, sollte die Menge an vorhandenem Fettgewebe aus  $\sigma 1B^{+/+}$ - und  $\sigma 1B^{-/-}$ -Mäusen verglichen werden. Dazu wurden epididymale Fettpolster entnommen. Diese Fettpolster befinden sich um den Nebenhoden (Epididymis) und ziehen weiter am Samenstrang entlang. Da sie distinkt und gut abgrenzbar sind, lassen sie sich besonders leicht vollständig und ohne Verunreinigungen durch umliegendes Gewebe entnehmen. Da sie naturgemäß nur bei männlichen Mäusen zu finden sind, beschränkten sich alle in diesem Kapitel gemachten Untersuchungen auf das Fettgewebe männlicher Mäuse.



**Abbildung 15: Verhältnis des Gewichts isolierter epididymaler Fettpolster zum Körpergewicht von  $\sigma 1B^{+/+}$  - und  $\sigma 1B^{-/-}$ -Mäusen**

Bei je 6  $\sigma 1B^{+/+}$ - und  $\sigma 1B^{-/-}$ -Mäusen wurden die epididymalen Fettpolster entfernt und ihr Gewicht ins Verhältnis zum jeweiligen Körpergewicht gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Genotypen und ihre Standardabweichung als Fehlerbalken. Mann-Whitney-Test:  $p=0,0022$

Nachdem die epididymalen Fettpolster von je 6  $\sigma 1B^{+/+}$ - und  $\sigma 1B^{-/-}$ -Mäusen entnommen worden waren, wurden sie gewogen und zum Körpergewicht der entsprechenden Maus ins Verhältnis gesetzt. Der Mittelwert der  $\sigma 1B^{+/+}$ -Mäuse betrug 0,016 g epididymales Fett pro g Körpergewicht und die  $\sigma 1B^{-/-}$ -Mäuse hatten 0,009 g epididymales Fett pro g Körpergewicht (s. Abb. 15). Die  $\sigma 1B$ -defizienten Mäuse besaßen also schon im Alter von 3 Monaten weniger (epididymales) Fettgewebe. Die zuvor beschriebene Reduktion des Fettgewebes war prinzipiell durch zwei Mechanismen erklärbar: Entweder war die absolute Zahl an Fettzellen (Adipozyten) vermindert oder die einzelnen Adipozyten waren bei gleicher Zellzahl kleiner, z.B. weil sie weniger Fett speichern als bei den Kontrolltieren. In mikroskopischen Aufnahmen von Kryoschnitten des Fettgewebes war dies schwer zu beurteilen, da die Größe der einzelnen Adipozyten sehr heterogen ist. Daher wurden aus epididymalem Fettgewebe von 6 Tieren Adipozyten isoliert und mit einem Durchflusszytometer analysiert (s. 3.6.2). Der Parameter „sideward scatter“ ermöglicht dabei den Vergleich der Größe der analysierten Zellen. Pro Tier wurden 30.000 Einzelereignisse gezählt und in einem Histogramm dargestellt. Ein repräsentatives Beispiel zeigt Abbildung 16. Es gab keine Unterschiede zwischen  $\sigma 1B^{+/+}$ - und  $\sigma 1B^{-/-}$ -Mäusen. Auch in einem Fenster mit besonders großen Zellen gab es keine Veränderungen (s. Abb. 16). Dies legt den Schluss nahe, dass nicht die einzelnen Adipozyten bei den  $\sigma 1B$ -defizienten Tieren kleiner waren, sondern deren absolute Zahl um durchschnittlich 50 Prozent reduziert ist.



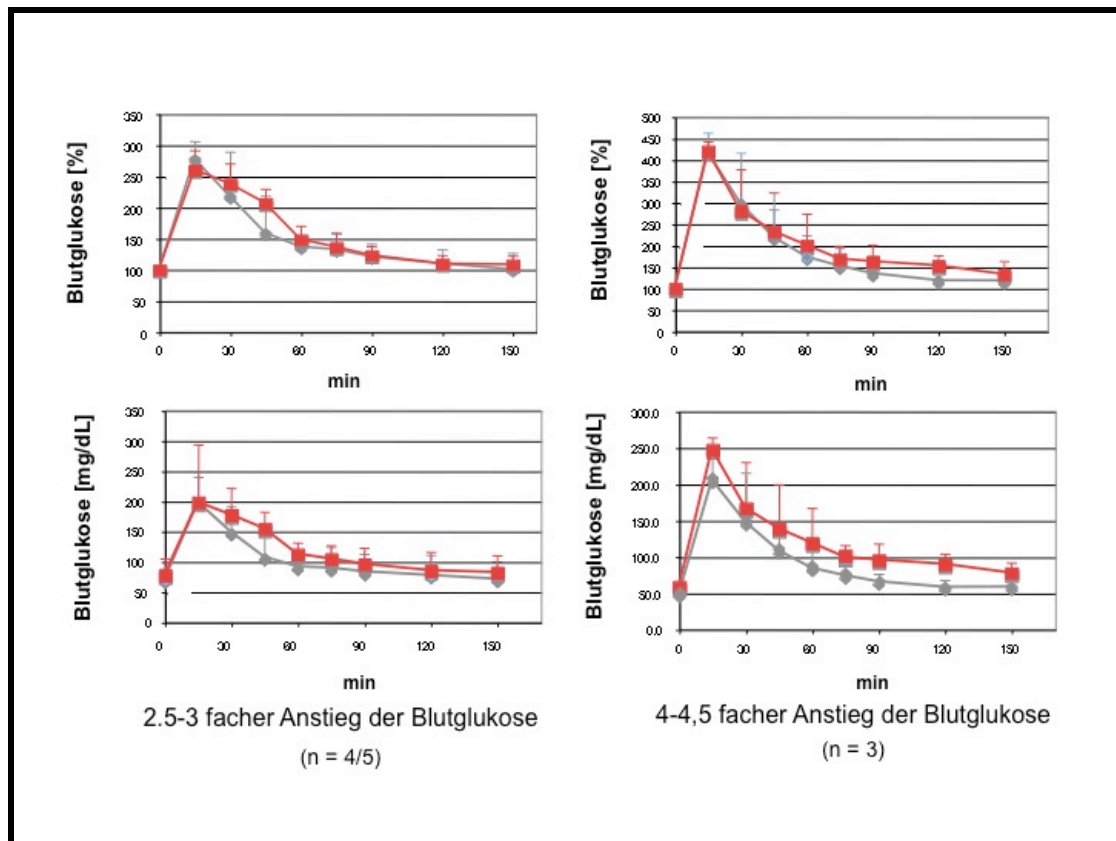
### Abbildung 16: FACS-Analyse isolierter Adipozyten

Die Zellgröße wurde durch den Parameter „forward scatter“ eines Durchflusszytometers analysiert. Die untersuchten Zellen waren aus epididymalen Fettpolstern isoliert worden. Jedes Histogramm besteht aus 30.000 gezählten Signalen. Je Genotyp ist die graphische Auswertung eines repräsentativen Ergebnisses dargestellt. Ausgewertet wurden je 3  $\sigma 1B^{-/-}$ - und  $\sigma 1B^{+/+}$ -Mäuse.

### 4.1.3.2 Funktionelle Untersuchung des Fettgewebes

#### 4.1.3.2.1 Glukosetoleranz der $\sigma 1B$ -defizienten Mäuse

Da bei den  $\sigma 1B$ -defizienten Mäusen quantitative Veränderungen des Fettgewebes beobachtet wurden, sollte als nächstes eine Untersuchung von Funktionen der Adipozyten bei  $\sigma 1B$ -defizienten Tieren durchgeführt werden. Eine der wichtigen und spezifischen Funktionen des Fettgewebes ist die Insulin-abhängige Aufnahme von Glukose aus dem Blut, die über komplexe vesikuläre Transportmechanismen vermittelt wird. Diese Funktion wurde durch einen Glukosetoleranztest überprüft (s. 3.4.4). Dazu wurden die Mäuse zunächst über Nacht (16 h) ohne Nahrung, aber mit freiem Zugang zu Wasser, gehalten. Pro Genotyp wurden 8 Mäusen jeweils 2 g Glukose pro kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Zu den Zeitpunkten 0 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 75 min, 90 min, 120 min und 150 min wurde aus der Schwanzspitze ein Tropfen Blut entnommen und mit einem Blutzuckermessgerät analysiert. Der initial gemessene Anstieg der Glukosekonzentrationen variierte stark, ließ sich aber in zwei Gruppen mit vergleichbaren Werten unterteilen. Dies könnte an einer leicht verschobenen Kinetik liegen, so dass nach 15 min nicht bei allen Tieren das Maximum der erreichten Blutglukosekonzentration lag. Wahrscheinlich ist jedoch, dass die Injektion der Glukose nicht immer direkt in den Bauchraum erfolgte. Abbildung 17 zeigt die Graphen der absoluten und der prozentualen Glukosekonzentration über die Zeit. Unabhängig von der Höhe des initialen Anstiegs war die Blutglukosekonzentration nach zwei Stunden wieder auf das Ausgangsniveau abgesunken. Dabei konnten keine Unterschiede der Insulin-abhängigen Glukoseaufnahme aus dem Blut von  $\sigma 1B^{-/-}$ - und  $\sigma 1B^{+/+}$ -Mäusen beobachtet werden. Das bedeutet, dass weder die Sensitivität noch die Kapazität dieses Systems gestört sind.



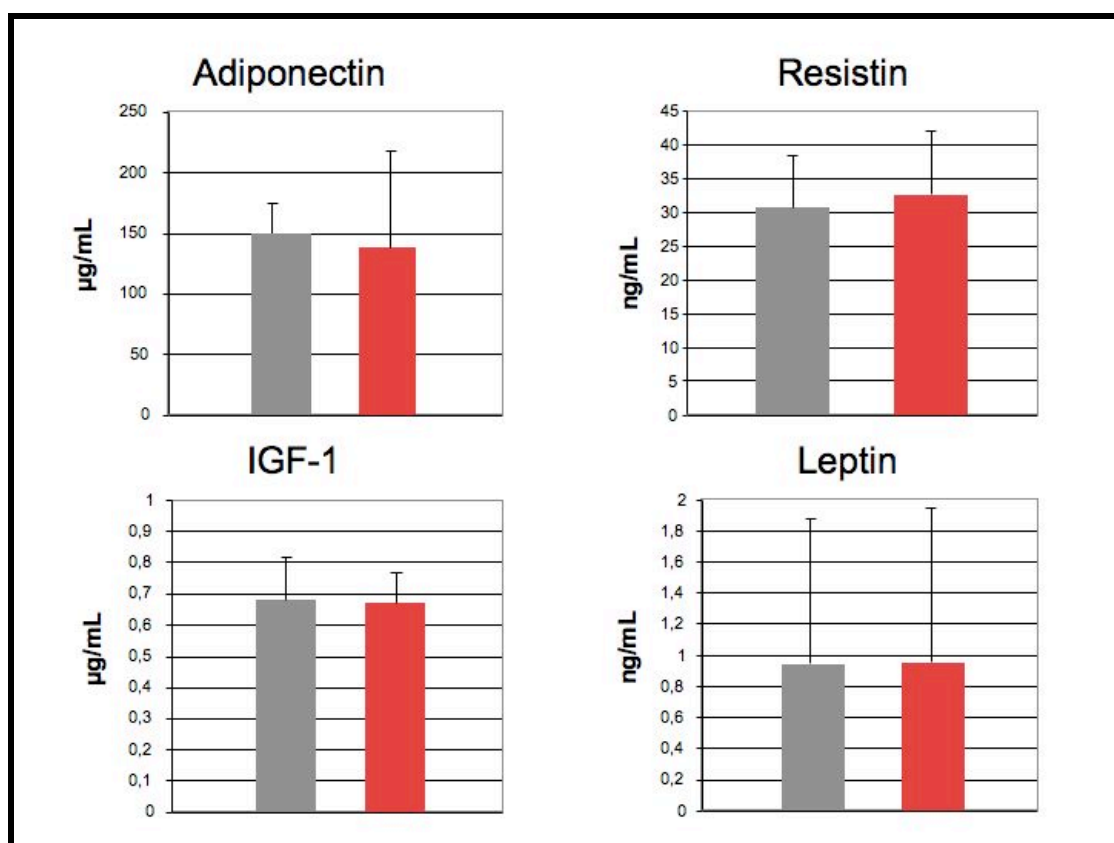
### Abbildung 17: Glukosetoleranztest

Graue Graphen repräsentieren die Werte der  $\sigma 1B^{+/+}$ -Mäuse und rote Graphen die der  $\sigma 1B^{-/-}$ -Mäuse. Den  $\sigma 1B^{+/+}$ - und  $\sigma 1B^{-/-}$ -Mäusen wurde nach einer 16-stündigen Nahrungskarenz jeweils 2 g Glukose pro kg Körpergewicht i.p. injiziert und zu den Zeitpunkten 0 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 75 min, 90 min, 120 min und 150 min der Blutglukosespiegel gemessen. Entsprechend der Höhe des initialen Anstiegs der Glukosekonzentration wurden die Tiere in zwei Gruppen eingeteilt (2,5-3 und 4-4,5 fach). Dargestellt ist der Verlauf der prozentualen Blutglukosewerte über die Zeit und der Verlauf der Mittelwerte der absoluten Glukosekonzentrationen.

#### 4.1.3.2.2 Konzentrationen von Adipozytokinen im Serum

Zur Funktion des Fettgewebes gehört auch die Ausschüttung verschiedener löslicher Proteine, sogenannter Adipozytokine oder kurz Adipokine, die den Metabolismus beeinflussen. Da auch hier vesikuläre Transportprozesse beteiligt sind, wurden deren Konzentrationen im Serum von  $\sigma 1B^{-/-}$ - und  $\sigma 1B^{+/+}$ -Mäusen bestimmt. Zu den untersuchten Proteinen zählen: Leptin, Adiponectin und Resistin. Außerdem wurde die Serumkonzentration an IGF-I („Insulin-like Growth Factor I“) bestimmt, da diesem Protein eine Rolle in der Differenzierung von Adipozyten zugeschrieben wird (Scavo *et al.*, 2004). Den Mäusen wurde zunächst retrobulbär Blut entnommen und daraus durch Gerinnung und anschließende Zentrifugation Serum gewonnen. Die Konzentrationen der Adipozytokine im Serum von je 18  $\sigma 1B^{+/+}$ - und  $\sigma 1B^{-/-}$ -Mäusen wurden in Doppelbestimmungen in ELISA-Assays bestimmt (s. 3.6.1). Ein Antikörper, der spezifisch für die nachzuweisenden Proteine ist, wurde in den Vertiefungen einer 96-well-Platte immobilisiert. Die Seren und Standardlösungen wurden inkubiert, so dass die entsprechenden Serumproteine von den immobilisierten Antikörpern gebunden wurden. Das gebundene Protein wurde von einem zweiten Antikörper erkannt, der wiederum in einem nächsten Schritt von einem HRP-konjugierten Spezies-spezifischen IgG gebunden wurde. Anschließend wurde eine Substratlösung zugegeben, die zu einer Färbung führt, deren Intensität proportional zur Menge an gebundenem Serumprotein ist. Dieser Vorgang wird abgestoppt und anschließend kann die Intensität der Färbung in einem Photometer bestimmt werden. Dies ergab für Adiponectin eine mittlere Konzentration von 149,9  $\mu\text{g/mL}$  im Serum der  $\sigma 1B^{+/+}$ -Mäuse und 137,3  $\mu\text{g/mL}$  im Serum der  $\sigma 1B^{-/-}$ -Mäuse. Resistin lag in einer Konzentration von 32,6  $\text{ng/mL}$  im Serum der  $\sigma 1B^{+/+}$ -Mäuse bzw. 30,6  $\text{ng/mL}$  im Serum der  $\sigma 1B^{-/-}$ -Mäuse vor. Es zeigten sich also keine Unterschiede in den Mittelwerten der Serumkonzentrationen von  $\sigma 1B^{+/+}$ - Mäusen und  $\sigma 1B^{-/-}$ -Mäusen bezüglich der untersuchten Adipokine (vgl. Abbildung 18). Für Leptin wurden Serumkonzentrationen von 0,95  $\text{ng/mL}$  bei  $\sigma 1B^{+/+}$ -Mäusen und 0,94  $\text{ng/mL}$  bei  $\sigma 1B^{-/-}$ -Mäusen errechnet. Auffällig sind jedoch die großen individuellen Unterschiede in der Leptinkonzentration, die zum Teil um das Doppelte vom

Mittelwert abwichen. Dieses Ergebnis wurde mit verschiedenen Leptin-ELISA-Kits zweier Anbieter erzielt. Da andere Adipokine in den gleichen Seren bestimmt werden konnten, kann man Präparationsartefakte als Ursache ausschließen. Mögliche physiologische Einflüsse auf die Leptinkonzentration im Serum werden unter 5.2.3 diskutiert. Die starken Abweichungen vom errechneten Mittelwert lassen eine verlässliche Aussage zur Leptinserumkonzentration mit der hier gewählten Anzahl an Mäusen nicht zu. Die mittlere Konzentration von IGF-1 betrug 0,68  $\mu\text{g/mL}$  im Serum der  $\sigma 1\text{B}^{+/+}$ -Mäuse und 0,67  $\mu\text{g/mL}$  im Serum der  $\sigma 1\text{B}^{-/-}$ -Mäuse, so dass auch bezüglich dieser Serumkonzentrationen keine Unterschiede gemessen wurden.



**Abbildung 18: Serumkonzentrationen der Adipozytokine von  $\sigma 1\text{B}^{+/+}$  - und  $\sigma 1\text{B}^{-/-}$ -Mäusen**

In dieser Abbildung sind die Ergebnisse der ELISA-Assays zur Bestimmung der Serumkonzentrationen von Adiponectin, Resistin, IGF-I und Leptin zusammengefasst. Graue Balken repräsentieren die Mittelwerte der  $\sigma 1\text{B}^{+/+}$ -Mäuse und rote Balken die der  $\sigma 1\text{B}^{-/-}$ -Mäuse. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen.

Zusätzlich zur im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren unveränderten Glukosetoleranz scheint das vorhandene Fettgewebe der  $\sigma 1B$ -defizienten Mäuse also auch funktionell – in Bezug auf die Sekretion von Adipokinen – vergleichbar dem von Kontrolltieren zu sein. Dies bestätigte auch ein Assay zur Bestimmung der Triglyceridkonzentration im Serum, dessen Ergebnisse hier nicht gezeigt werden, da auch hier keine Unterschiede der Werte der  $\sigma 1B^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu den Werten der  $\sigma 1B^{+/+}$ -Mäusen beobachtet wurden.

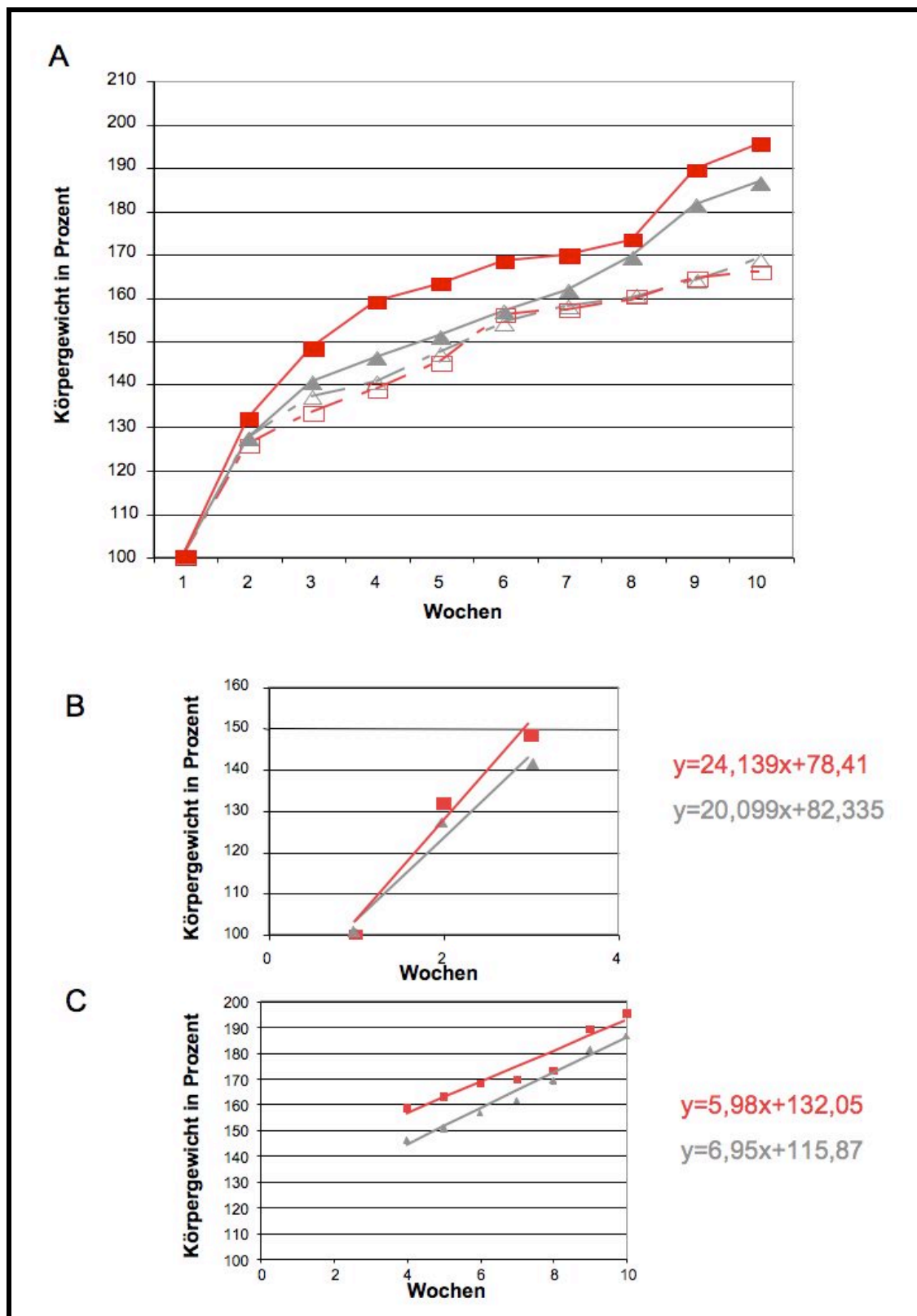
#### **4.1.2.3.2 Einfluss einer fettreichen Diät auf das Gewicht $\sigma 1B$ -defizienter Mäuse**

Eine fettreiche Kost führt bei Menschen und Nagern zu anwachsenden Fettpolstern. Daher haben wir den Effekt einer fettreichen Diät auf das Gewicht von  $\sigma 1B$ -defizienten Mäusen untersucht. Es wurden 8 männliche Wurfgeschwister 10 Wochen lang mit einer speziellen Diät ernährt. Jeder Genotyp ( $\sigma 1B^{+/+}$ ;  $\sigma 1B^{-/-}$ ) war mit 4 Tieren vertreten. Dabei war der Fettgehalt des Futters von 5% des Standardfutters auf 21% erhöht. Die Mäuse hatten freien Zugang zu diesem Futter. Der Versuch startete im Alter von 30 Tagen, da die Tiere zu diesem Zeitpunkt bereits seit einer Woche nicht mehr gesäugt wurden und somit an festes Futter gewöhnt waren und sich noch in der Wachstumsphase befanden. Die Mäuse wurden einmal in der Woche gewogen und parallel dazu wurde die Gewichtsentwicklung von zwei Kontrollgruppen aus 8  $\sigma 1B^{+/+}$ -Mäusen und 6  $\sigma 1B^{-/-}$ -Mäusen verfolgt, die das Standardfutter bekamen. In Abbildung 19 sind die normalisierten Mittelwerte des Gewichts aller Gruppen über die Zeit dargestellt. Sowohl  $\sigma 1B^{+/+}$ -Mäuse als auch  $\sigma 1B^{-/-}$ -Mäuse nehmen durch das fettreiche Futter im getesteten Zeitraum mehr an Gewicht zu als mit dem fettärmeren Standardfutter (vgl. Abbildung 19 A). Dies bedeutet, dass ein vorhandenes Fettpolster der  $\sigma 1B$ -defizienten Tiere durch eine erhöhte Fettaufnahme expandieren kann. Eine Regressionsgerade durch die ersten drei Werte der fettreich ernährten  $\sigma 1B^{-/-}$ -Tiere, also dem Zeitraum, in dem entwicklungsbedingt eine starke Gewichtszunahme stattfindet, verläuft wesentlich steiler als die der  $\sigma 1B^{+/+}$ -



---

Tiere. Dies könnte auf eine Kompensation für eine mögliche Entwicklungsstörung des Fettgewebes hindeuten, die unter normalen Ernährungsbedingungen nicht als Unterschiede im Körpergewicht messbar sind und erst durch die erhöhte Energiezufuhr nachweisbar oder aktiv werden. Um statistisch signifikante Aussagen treffen zu können, müsste aber der Versuch mit einer größeren Anzahl an Tieren wiederholt werden. Im weiteren Verlauf sinkt die Steigung der Regressionsgeraden und damit die Geschwindigkeit der prozentualen Gewichtszunahme deutlich ab. Ein Genotyp-abhängiger Unterschied ist nicht mehr zu beobachten (s. Abbildung 19 B und C).



**Abbildung 19: Gewichtszunahme der  $\sigma1B^{+/+}$ -Mäuse und  $\sigma1B^{-/-}$ -Mäuse unter Fettdiät**

A) 8 männliche Geschwister wurden ab einem Alter von 30 Tagen 10 Wochen lang mit freiem Zugang zu einem fettreichen Futter (ssniff EF D12108 R/M; 21% statt 5% Fett) gehalten. Alle 8 Tage wurde das Gewicht kontrolliert.

Abgebildet ist der Verlauf der, auf das Anfangsgewicht bezogenen, prozentualen Mittelwerte von 4 Mäusen je Genotyp über die Zeit. Graue Graphen mit Dreiecken repräsentieren die Werte der  $\sigma 1B^{+/+}$ -Mäuse und rote Graphen mit Rechtecken die der  $\sigma 1B^{-/-}$ -Mäuse. Die gestrichelten Graphen mit den ungefüllten Symbolen zeigen den Gewichtsverlauf von zwei Kontrollgruppen aus 8  $\sigma 1B^{+/+}$ -Mäusen und 6  $\sigma 1B^{-/-}$ -Mäusen mit dem üblichen Futter.

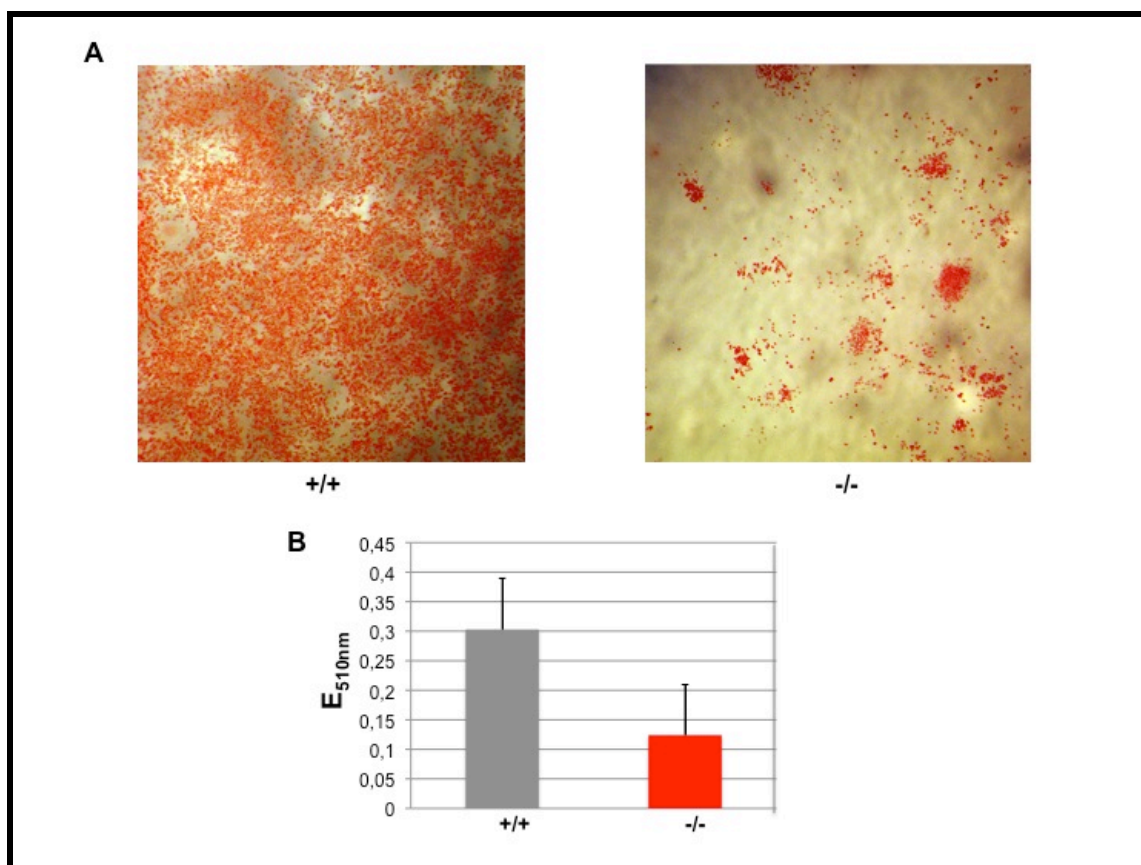
Teil B) der Abbildung zeigt die Regressionsgerade durch die Werte der  $\sigma 1B^{+/+}$ -Mäuse und  $\sigma 1B^{-/-}$ -Mäuse mit einer fettreichen Diät über die ersten 3 Wochen.

Im Teil C) sind die Regressionsgeraden für den weiteren Verlauf abgebildet. Die Gleichungen der Geraden sind im entsprechenden Farbcode (s.A) dargestellt.

#### 4.1.3.3 Differenzierung des Fettgewebes

Im vorhergehenden Kapitel konnte gezeigt werden, dass die epididymalen Fettpolster von  $\sigma 1B$ -defizienten Mäusen kleiner sind. Da aber die einzelnen Zellen keine Größenunterschiede aufweisen und auch alle weiteren untersuchten physiologischen Funktionen des vorhandenen Fettgewebes unverändert waren, wurde die Differenzierung dieses Gewebes untersucht. Dazu wurden am Tag 13,5 nach einer terminierten Verpaarung murine embryonale Fibroblasten (MEF) isoliert (vgl. 3.3.4). Diese Zellen können innerhalb der ersten 3-4 Passagen mit Hilfe von Insulin, Dexamethason und 3-Isobutyl-1-methylxanthin als Zusätze im Medium zu Adipozyten-ähnlichen Zellen differenzieren (vgl. 3.3.5 zusammengefasst in (Rosen und MacDougald, 2006)). Dazu werden sie 2 Tage nach Erreichen der Konfluenz weitere 2 Tage lang mit obigen Zusätzen induziert und noch 7 weitere Tage kultiviert. Während dieser letzten Phase ist dem Medium nur Insulin zugesetzt. Die dabei gebildeten fettspeichernden Vesikel dienen als Marker für die Entwicklung zu Adipozyten-ähnlichen Zellen. Nach der Fixierung der Zellen kann das gespeicherte Fett mit dem lipophilen Farbstoff Oil Red O angefärbt werden (vgl. 3.6.3). Abbildung 20 A zeigt entsprechende Übersichtsaufnahmen. Zur Quantifizierung wurde anschließend der gebundene Farbstoff mit Isopropanol ausgewaschen. Die Farbintensität der daraus entstandenen Lösung wurde bei einer Wellenlänge von 510 nm photometrisch bestimmt (s. Abbildung 20 B). Der Mittelwert der

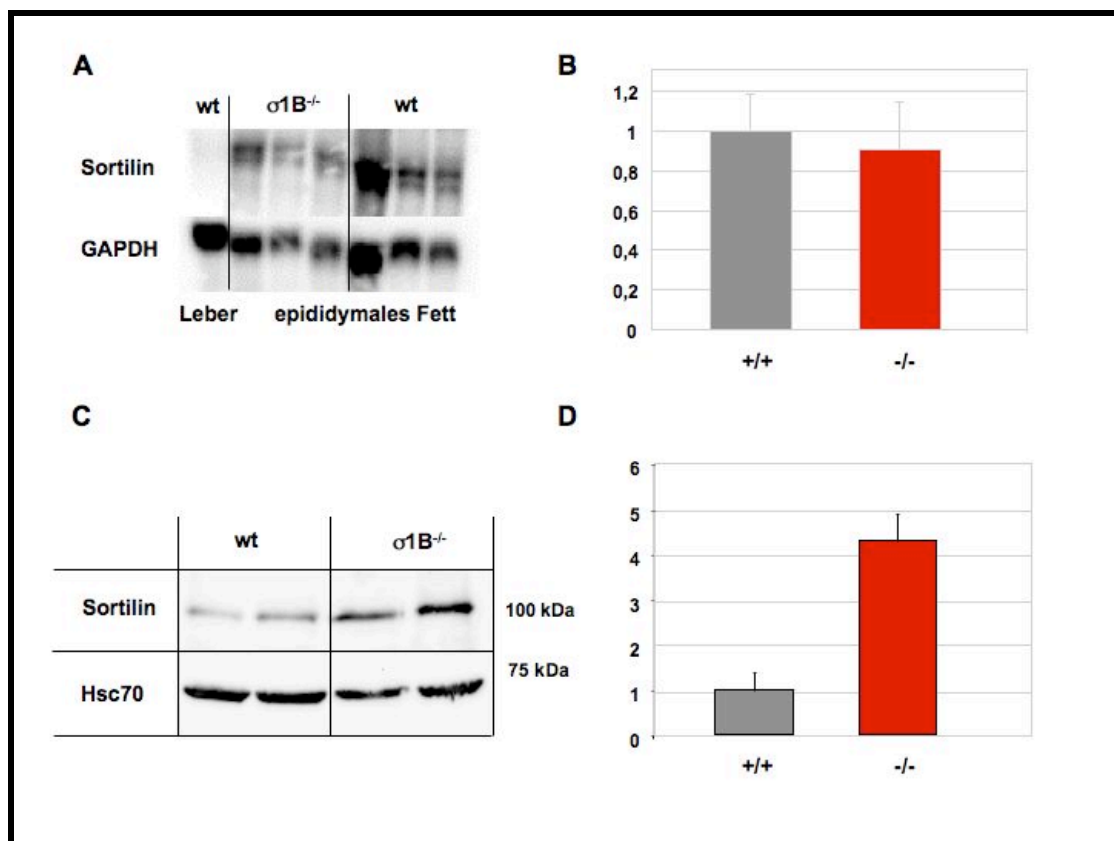
Doppelbestimmungen von 6 Wildtyp-Zellklonen lag bei einer Extinktion von 0,3. Die mittlere Extinktion der Doppelbestimmungen von 9  $\sigma 1B^{-/-}$ -Klonen betrug 0,12. Bei allen Werten wurde die Extinktion von undifferenzierten Zellen subtrahiert. Das heißt, dass die Differenzierung von MEF, die aus  $\sigma 1B$ -defizienten Embryonen gewonnen wurden um 60% weniger effizient zu sein scheint als die von Wildtyp-Fibroblasten.



### Abbildung 20: Differenzierung von MEF zu Adipocyten

Murine, embryonale Fibroblasten wurden in einem Assay (vgl. 3.3.5) zu Adipozyten-ähnlichen Zellen differenziert. Nach 9 Tagen wurden die eingelagerten Lipide mit einem roten Farbstoff (Oil Red O) angefärbt. In Teil A der Abbildung sind repräsentative Photos der angefärbten Zellen zu sehen. Im Teil B der Abbildung ist die anschließende Quantifizierung dargestellt. Dazu wurden die Zellen mit Isopropanol entfärbt und die Menge des ausgewaschenen Farbstoffs bei 510 nm photometrisch bestimmt. Der graue Balken stellt den Mittelwert der Ergebnisse aus Doppelwerten der Zellen aus 6  $\sigma 1B^{+/+}$ -Embryonen und der rote Balken den Mittelwert der Zellen aus 9  $\sigma 1B^{-/-}$ -Embryonen dar. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Abweichung.

In einer vorangegangenen Doktorarbeit unserer Gruppe (Radhakrishnan, 2006) konnte gezeigt werden, dass im Fettgewebe von  $\sigma$ 1B-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ein vierfacher Anstieg des Proteins Sortilin zu verzeichnen ist (s. Abbildung 21 C und D). Um zu sehen, ob dieser Unterschied auch auf mRNA-Ebene vorhanden ist, wurde ein Northern-Blot durchgeführt. Drei Tiere je Genotyp wurden getestet. Je 15  $\mu$ g RNA aus epididymalem Fettgewebe wurde im Agarose/Formaldehydgel aufgetrennt, auf eine HybondN Membran transferiert und mit einer cDNA Sonde gegen die mRNA von Sortilin hybridisiert (s. Tabelle 1). 15  $\mu$ g RNA aus Lebergewebe diente als Negativkontrolle, da Sortilin dort nicht exprimiert wird (Petersen *et al.*, 1997). Als Ladekontrolle wurde die Membran mit einer weiteren Sonde gegen die mRNA von GAPDH hybridisiert. Die Signale von Sortilin wurden durch Densitometrie quantifiziert und auf die GAPDH-Werte normalisiert. Die Mittelwerte der Genotypen zeigen keine Unterschiede (s. Abbildung 21 B). Es kann also davon ausgegangen werden, dass der Unterschied zwischen  $\sigma$ 1B-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen in der Proteinmenge nicht aufgrund einer erhöhten Transkriptionsrate zustande kommt.

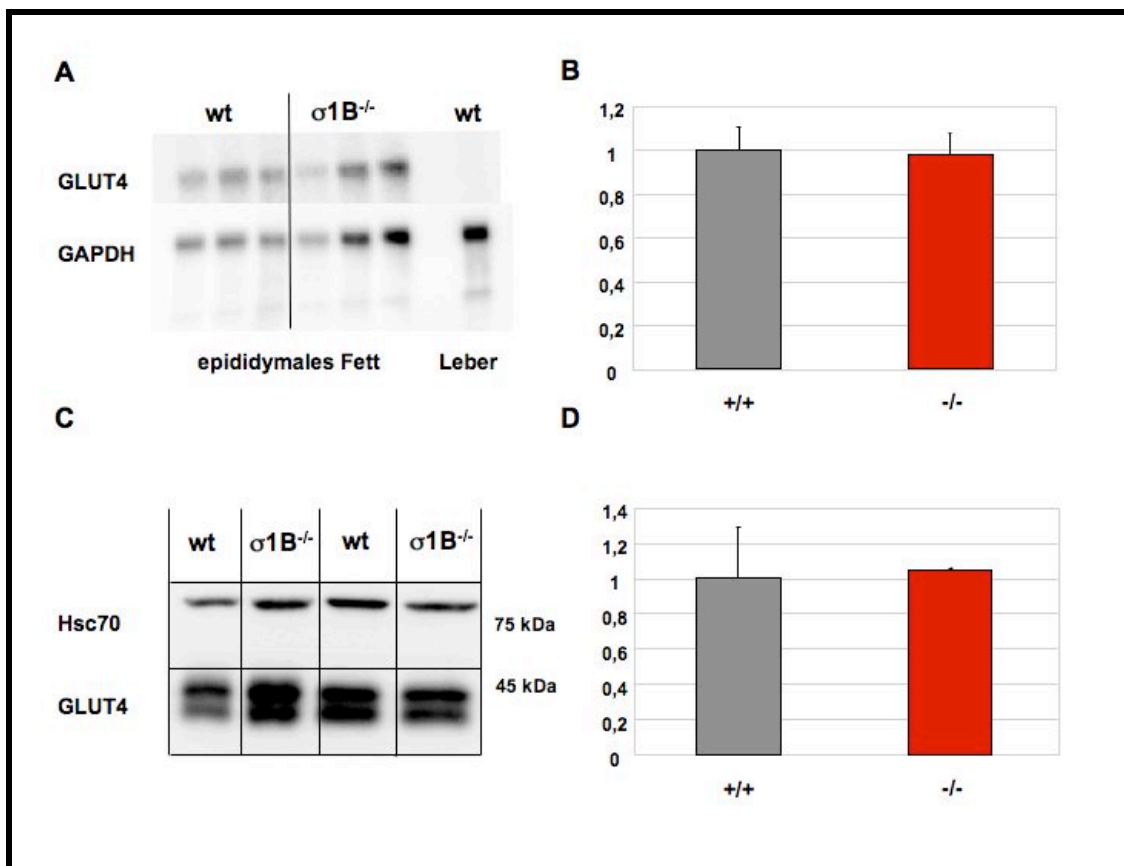


### Abbildung 21: Expression von Sortilin im Fettgewebe

Teil A) dieser Abbildung zeigt einen Northern-Blot. Es wurden jeweils 15  $\mu\text{g}$  gesamt-RNA aus Fettgewebe von 3  $\sigma 1B^{+/+}$ -Mäusen und 3  $\sigma 1B^{-/-}$ -Mäusen aufgetragen. Als Negativkontrolle diente RNA aus Lebergewebe. Die Membran wurde mit einer Sonde gegen Sortilin und einer gegen GAPDH als Ladekontrolle hybridisiert. Der Graph im Teil B dieser Abbildung zeigt die Quantifizierung des Northern-Blots. Dabei wurden die Banden der Sortilin-Sonde auf das jeweilige GAPDH-Signal normalisiert und der Mittelwert aus den drei Tieren und zwei unabhängigen Northern-Blots gebildet. Die Signalintensität der Wildtyp-Tiere wurde dann auf 100% gesetzt. Graue Balken repräsentieren die Mittelwerte der  $\sigma 1B^{+/+}$ -Mäuse und rote Balken die der  $\sigma 1B^{-/-}$ -Mäuse. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen.

Teil C) und D) stammen aus einer vorangegangenen Doktorarbeit. (Radhakrishnan, 2006). C) zeigt einen Western-Blot, der mit Antikörpern gegen die Proteine Sortilin und HSC 70 durchgeführt wurde. HSC 70 diente als Ladekontrolle. Aufgetragen wurden je 100  $\mu\text{g}$  Gesamtproteinextrakt aus Fettgewebe von 2  $\sigma 1B^{+/+}$ -Mäusen und 2  $\sigma 1B^{-/-}$ -Mäusen. Der Graph in D) zeigt auch hier die densitometrische Auswertung der Signale des Blots.

Sortilin ist in Adipozyten stark exprimiert und unter anderem ein Hauptbestandteil von GLUT4-Vesikeln (Morris *et al.*, 1998) (vgl. 1.1.4). Diese bilden eine intrazelluläre Reserve an Glukosetransporter 4, der unter Insulineinwirkung in die Plasmamembran eingebaut wird. Daher wurde auch die Expressionshöhe von GLUT4 im Fettgewebe von  $\sigma$ 1B-defizienten Mäusen untersucht (s. Abbildung 22).



### Abbildung 22: Expression von GLUT4 im Fettgewebe

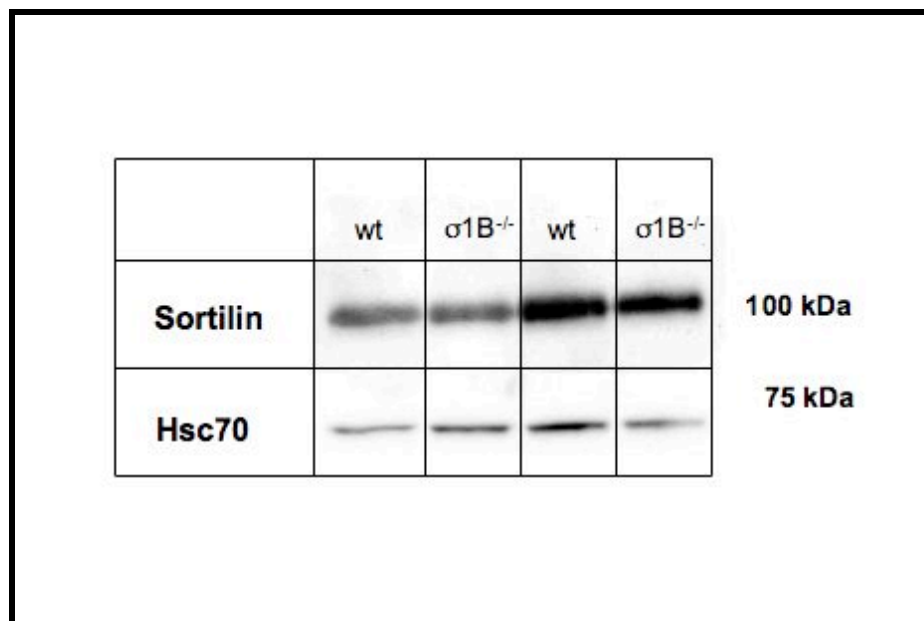
Abbildungsteil A) zeigt einen Northern-Blot. Es wurden jeweils 15  $\mu\text{g}$  RNA aus Fettgewebe von je 3  $\sigma 1B^{+/+}$ - und  $\sigma 1B^{-/-}$ -Mäusen aufgetragen. Eine Spur mit 15  $\mu\text{g}$  Leber-RNA diente als Negativkontrolle. Die Membran wurde mit einer Sonde gegen GLUT4 und einer gegen GAPDH als Ladekontrolle hybridisiert. Im Teil C) ist ein Western-Blot abgebildet. Aufgetragen wurden jeweils 100  $\mu\text{g}$  Proteinextrakte aus Fettgewebe von je 2  $\sigma 1B^{+/+}$ -Mäusen und 2  $\sigma 1B^{-/-}$ -Mäusen. Dekoriert wurde die PVDF-Membran mit Antikörpern gegen GLUT4 und Hsc 70 als Ladekontrolle. In B) und D) sind die graphischen Auswertungen von A) bzw. C) gezeigt. Die grauen Balken repräsentieren die  $\sigma 1B^{+/+}$ -Mäuse und die roten Balken die  $\sigma 1B^{-/-}$ -Mäuse. Dabei wurden die Signale für GLUT4 auf die Ladekontrollen normalisiert und aus den unterschiedlichen Tieren eines Genotyps die Mittelwerte gebildet. Die Werte der Fettgewebe der  $\sigma 1B^{+/+}$ -Mäuse wurden auf 100% gesetzt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Für einen Northern-Blot wurden 15  $\mu\text{g}$  RNA aus Fettgewebe von jeweils 3 Tieren je Genotyp in einem Formaldehyd/Agarosegel aufgetrennt. Als Negativkontrolle wurde 15  $\mu\text{g}$  RNA aus Leber aufgetragen, da GLUT4 dort nicht exprimiert wird. Die aufgetrennte RNA wurde auf eine Hybond<sup>+</sup>N-Membran übertragen und diese mit einer Sonde gegen GLUT4 und



anschließend mit einer Sonde gegen GAPDH hybridisiert (s. Tabelle 1). Mittels Densitometrie wurden die Signale von GLUT4 quantifiziert. Nach einer Normalisierung auf die Signalstärken der GAPDH-Banden war kein Genotyp-abhängiger Unterschied erkennbar. Die Expression auf Proteinebene wurde im Western-Blot überprüft. Dazu wurden aus dem Fettgewebe von 2 Tieren je Genotyp Adipozyten isoliert und homogenisiert. 100 µg der postnukleären Überstände nach einer Zentrifugation bei 500xg wurden in einem 10%-igen SDS/Acrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde mit einem Antikörper gegen Sortilin inkubiert. Nach einer Densitometrie und Normalisierung auf Hsc70 Signale gibt es in der Intensität der Sortilinsignale keine Genotyp-abhängigen Unterschiede.

Um Hinweise darauf zu erhalten, ob die vermehrte Expression von Sortilin im Fettgewebe von  $\sigma 1B$ -defizienten Mäusen und die verminderte Differenzierungsrate der primären Fibroblasten zusammenhängen, wurde zunächst in einem Western-Blot die Menge an Sortilin in den MEF untersucht. Dazu wurden 50 µg Proteinrohextrakt von 2  $\sigma 1B^{+/+}$  MEF-Klonen und 2  $\sigma 1B^{-/-}$  MEF-Klonen auf einem 10% SDS/Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde mit einem Antikörper gegen Sortilin und als Ladekontrolle mit einem Antikörper gegen Hsc70 inkubiert. Wie in Abbildung 23 zu sehen, gab es keine Veränderungen in der Expressionshöhe von Sortilin in  $\sigma 1B$ -defizienten MEF im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen.



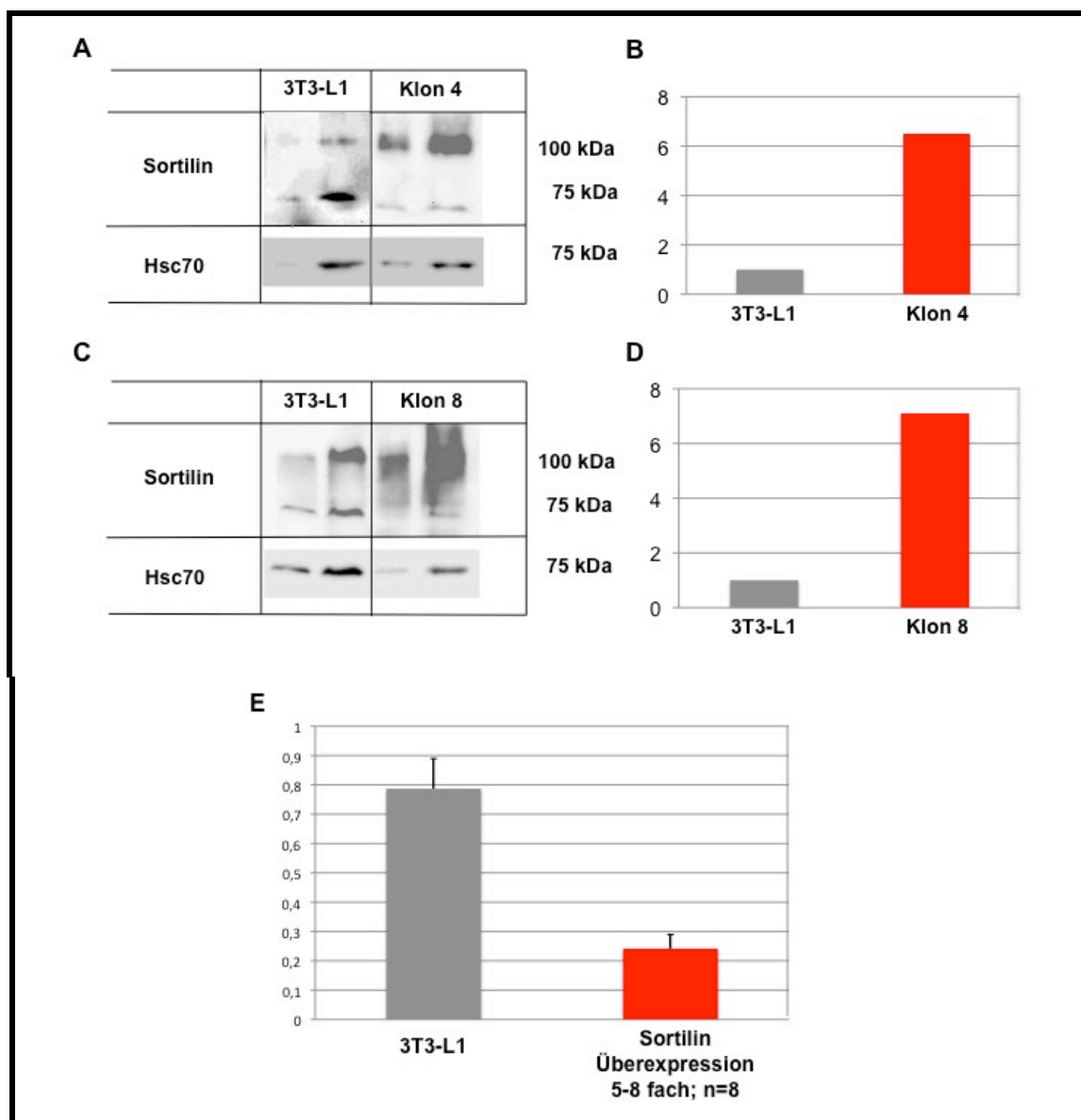
### Abbildung 23: Sortilin-Expression in Fibroblasten

Gesamtproteinextrakt aus murinen, embryonalen Fibroblasten in der dritten Passage von 2  $\sigma 1B^{+/+}$ -Klonen und 2  $\sigma 1B^{-/-}$ -Klonen wurde auf einem 10% SDS/Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf PVDF-Membran übertragen und mit einem Antikörper gegen Sortilin inkubiert. Hsc 70 wurde als Ladekontrolle verwendet. Die relative Position des Molekulargewichtsmarkers ist angegeben.

Um die Auswirkungen einer erhöhten Expression von Sortilin im Fettgewebe von  $\sigma 1B$ -defizienten Mäusen näher zu untersuchen, sollte eine artifizielle Überexpression von Sortilin durch Transfektion von Zellen erreicht werden. Da dazu eine stabile Transfektion der MEF notwendig gewesen wäre, der Differenzierungsprozess jedoch 9 Tage dauert und die Zellen relativ schnell (3-4 Passagen) nach der Isolation induziert werden müssen, um eine auswertbare Differenzierungsrate zu erreichen, wurden für diesen Versuch 3T3-L1 Zellen verwendet. Die murine, embryonale Fibroblasten-Zelllinie 3T3-L1 kann sich von einem präadipozytären Stadium zu Adipozyten entwickeln und dient daher als Modell für Studien zur Adipozytendifferenzierung (Rosen und Spiegelman, 2000).

Durch eine Transfektion mit dem Vektorkonstrukt pcDNA3.1/zeo-sortilin und anschließende Antibiotikaselektion wurden mehrere Zellklone generiert. Die Klone zeigten sowohl in der Immunfluoreszenz als auch im Western-Blot eine starke Überexpression von Sortilin. Abbildung 24 A bis D zeigt exemplarisch

zwei dieser Western-Blots mit ihren Quantifizierungen. 8 verschiedene Sortilin-überexprimierende Zellklone und untransfizierte 3T3-L1 Zellen wurden 2 Tage nach Erreichen der Konfluenz in doppelten Ansätzen durch Zugabe von Insulin, Dexamethason und 3-Isobutyl-1-methylxanthin induziert. Nach 2 Tagen wurde dem Medium nur noch Insulin zugesetzt. 3 Tage später wurden die Zellen fixiert und die entstandenen Adipozyten mit Oil Red O gefärbt. Der vom eingelagerten Fett gebundene Farbstoff wurde anschließend mit Isopropanol ausgewaschen. Die Intensität der Färbung des Isopropanol wurde bei einer Wellenlänge von 510 nm photometrisch bestimmt. Die errechneten Mittelwerte der Extinktionen sind im Graph E der Abbildung 24 dargestellt. Die mittlere Extinktion der überexprimierenden Zellen ist im Vergleich zu den untransfizierten Zellen um ca. 75% verringert. Dies bedeutet, dass die Zellklone, die Sortilin stark überexprimieren, eine erheblich geringere Differenzierungsrate haben als die untransfizierten 3T3-Zellen. Da das Antibiotikum Zeocin in unterschiedlichen Differenzierungsstudien verwendet wurde, kann ein Artefakt ausgeschlossen werden (Spassky *et al.*, 1998; Bhagavati und Xu, 2004; Iuchi *et al.*, 2006).

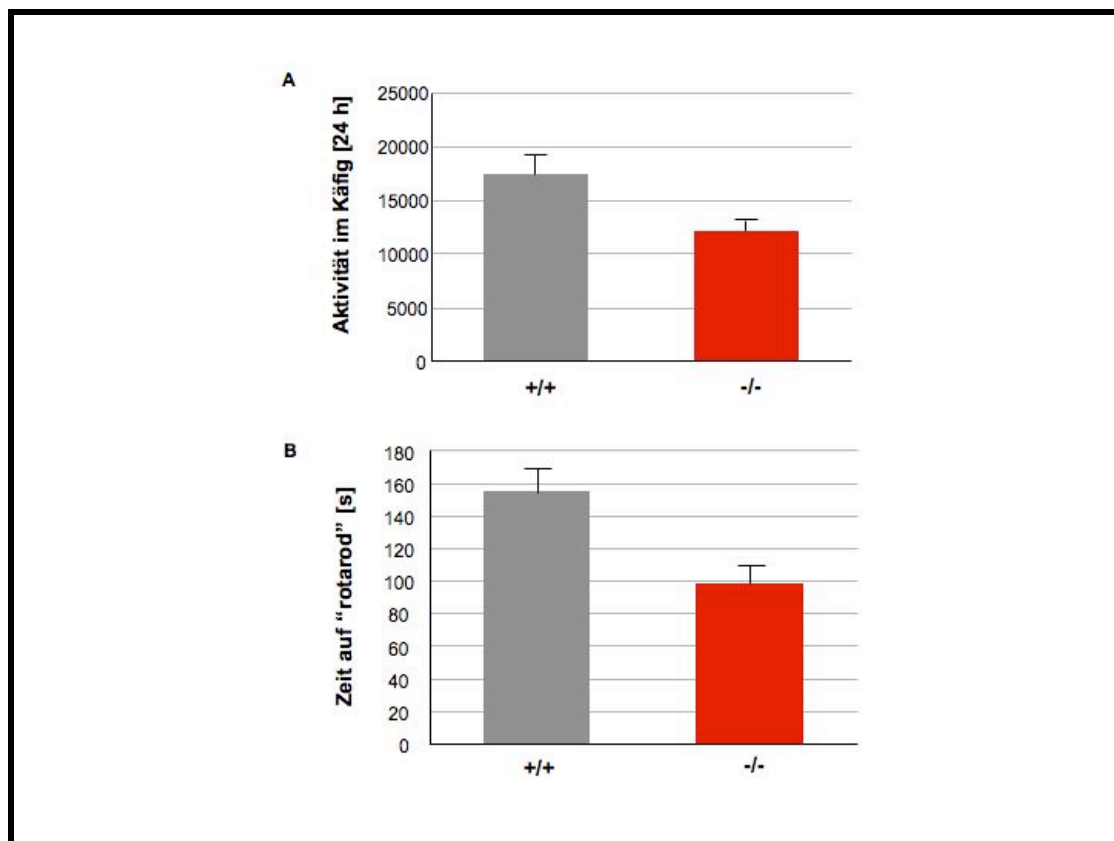


### Abbildung 24: Überexpression von Sortilin in 3T3-L1-Zellen

Die Western-Blots in den Abbildungsteilen A) und C) wurden beide zuerst mit einem Antikörper gegen Sortilin und anschließend mit einem Antikörper gegen Hsc 70 als Ladekontrolle inkubiert. Sie zeigen die durch stabile Transfektion erreichte Überexpression von je einem exemplarischen 3T3-Zellklon im Vergleich zu untransfizierten 3T3-L1-Zellen. Aufgetragen wurden jeweils 40 und 160 µg Gesamtproteinextrakt. Die Quantifizierung der Western-Blots ist in B) und D) dargestellt. Dabei wurden die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Blots gebildet. Die Signalintensität der untransfizierten Zellen wurden auf 100% festgesetzt. Es wurden insgesamt 8 verschiedene, Sortilin überexprimierende Zellklone und untransfizierte 3T3-L1-Zellen in Doppelwerten zu Adipozyten differenziert. Nach 4 Tagen wurden die eingelagerten Lipide mit einem roten Farbstoff (Red Oil O) angefärbt. Der Farbstoff wurde anschließend mit Isopropanol wieder ausgewaschen und seine Menge photometrisch bestimmt. Der graue Balken repräsentiert die untransfizierten 3T3-L1-Zellen und der rote die Sortilin überexprimierenden Zellen. Die Standardabweichungen werden durch die Fehlerbalken dargestellt.

#### **4.1.4 Verhaltensstudien an $\sigma$ 1B-defizienten Mäusen**

In den Expressionsstudien der  $\sigma$ 1-Isoformen wurde eine hohe  $\sigma$ 1B-Expression in Muskeln und im Gehirn gezeigt (Riel 2004). Uns fiel auf, dass die  $\sigma$ 1B-defizienten Mäuse sich sehr ruhig und wenig aggressiv in ihrem Verhalten zeigten. Außerdem hatten die Tiere nach dem Umsetzen aus den Stoffwechselkäfigen (vgl. 4.1.1) Probleme, die Tränke zu finden. Daher wurde das Verhalten von 21 weiblichen  $\sigma$ 1B-defizienten Mäusen und 15 weiblichen Kontrollmäusen im Alter von 4 Monaten von Rudi D’Hooge im “Laboratory of Biological Psychology, Department of Psychology” an der Universität Leuven in Belgien untersucht. Zur Dokumentation der Aktivität im Käfig wurden die Mäuse in 20 mal 30 cm große, transparente Käfige gesetzt, die zwischen 3 Lichtstrahlen standen. Die Aktivität wird als die Häufigkeit angegeben, mit der die Mäuse in 24 h einen der Lichtstrahlen kreuzen. Dabei sind die  $\sigma$ 1B-defizienten Mäuse mit 12070 Strahlunterbrechungen in 24 h im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren mit 17356 Kreuzungen hypoaktiv (s. Abbildung 25 A). Im „Open Field-Test“ war ihre Aktivität hingegen völlig normal. Sowohl die zurückgelegten Weglängen, die Latenzzeiten als auch die im Zentrum verbrachten Zeiten waren zwischen beiden Gruppen vergleichbar. Im Fluchtverhalten (elevated plus maze test) waren keine Unterschiede zwischen  $\sigma$ 1B-defizienten Mäusen und Kontrollmäusen zu erkennen. Auch die Griffstärke der  $\sigma$ 1B-defizienten Mäuse war normal. Die neuromotorische Koordination und die Balance wurden auf einem sich beschleunigenden, rotierenden Balken (Rotarod, MED Associates Inc., USA) getestet. Dabei werden die Mäuse erst bei konstanter Geschwindigkeit von 4 rpm trainiert, bevor sie getestet werden. Hierbei beschleunigt der Balken von 4 rpm bis zu 40 rpm in fünf Minuten und die Zeit, bis die Mäuse herunterfallen, wurde gemessen. Der Mittelwert aus vier dieser Tests wurde zur Analyse verwendet. Die  $\sigma$ 1B-defizienten Mäuse konnten schlechter die Balance halten als die Wildtyp-Mäuse und fielen nach durchschnittlich 98 sec, verglichen mit 155 sec, die vergingen, bis die Kontrolltiere den Balken verließen (vgl. Abbildung 25 B).



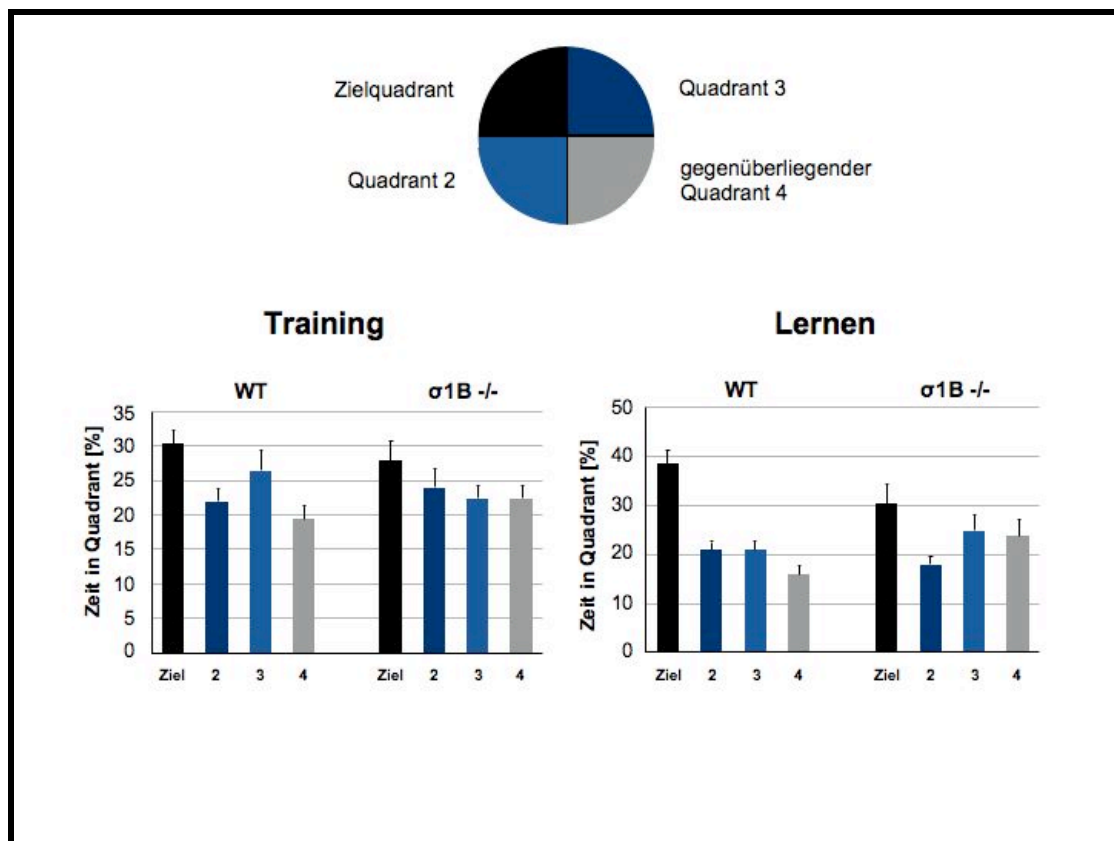
### Abbildung 25: Verhaltenstests an $\sigma 1B$ -defizienten Mäusen

Das Diagramm A) zeigt die Mittelwerte der Aktivität von einzelnen Mäusen. Gezählt wurde die Häufigkeit, mit der einer der drei im Käfig vorhandenen Lichtstrahlen durch die sich bewegende Maus durchbrochen wurde. (RM-ANOVA  $p=0,014$ )

In Teil B) ist die Zeit abgebildet, bis die Mäuse von einem sich beschleunigenden, rotierenden Balken herunterfallen. Dies testet die motorische Koordinationsfähigkeit und Balance der Tiere ( $p=0,004$ ). Graue Balken repräsentieren die  $\sigma 1B^{+/+}$ -Mäuse und rote Balken die  $\sigma 1B^{-/-}$ -Mäuse. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen.

Mit dem „Morris Water Maze Test“ wurde das Hippocampus-abhängige, räumliche Lernvermögen getestet. In einem runden, wassergefüllten Becken (Durchmesser 150 cm) ist eine runde Plattform (Durchmesser 15 cm) 1 cm unter der Wasseroberfläche befestigt. Während der vier täglichen Trainingsphasen schwammen die Mäuse zufällig von einer der vier Startpositionen los. Die Mäuse, die nach zwei Minuten die Plattform nicht erreicht hatten, wurden zu ihr hingeführt. Nach 15 sec wurden sie in die Käfige zurückgesetzt. In einer weiteren Lernphase wurde die Plattform

entfernt und das Suchverhalten der Mäuse 100 sec lang verfolgt. Nachdem die Tiere einen Lernerfolg zeigten und eine klare Präferenz für den Zielquadranten, in dem zuvor die Plattform befestigt war, zu erkennen war, fanden die eigentlichen Tests statt. Dazu wurde die Plattform in der Trainingsphase gegenüberliegenden Quadranten verankert und die Latenzzeit bis zum Erreichen der Plattform wurde gemessen. Dabei war die Fähigkeit der  $\sigma$ 1B-defizienten Mäuse, zu schwimmen, nicht verändert. Schon während der Lernphase erreichten die  $\sigma$ 1B-defizienten Mäuse die Plattform später als die Kontrollmäuse. Außerdem waren ihre zurückgelegten Strecken bis zum Erreichen der Plattform länger. Die Testphase zeigte ebenfalls Genotyp-abhängige Unterschiede. Die Wildtypmäuse verbrachten mehr Zeit im Zielquadranten als in allen anderen, wohingegen die  $\sigma$ 1B-defizienten Mäuse eine fehlende räumliche Präferenz für den Zielquadranten zeigten. Sie verbrachten ähnlich viel Zeit im Zielquadranten wie in den anliegenden und im gegenüberliegenden (s. Abbildung 26). Dies lässt den Schluss zu, dass die Hippocampus-abhängigen Lernprozesse des räumlichen Gedächtnisses, die durch diesen Test exemplarisch untersucht wurden, bei den  $\sigma$ 1B-defizienten Mäusen nachhaltig gestört sind.



**Abbildung 26: „Morris Water Maze“ – Test des räumlichen Lernvermögens**

Die Mäuse lernten eine unsichtbare, 1 cm unter einer Wasseroberfläche liegende Plattform zu finden. Das runde Wasserbecken ist in 4 Quadranten aufgeteilt. Die Plattform befand sich im Zielquadranten. Gemessen wurde die Zeit, in der sich ein Tier in einem der Quadranten aufhält.



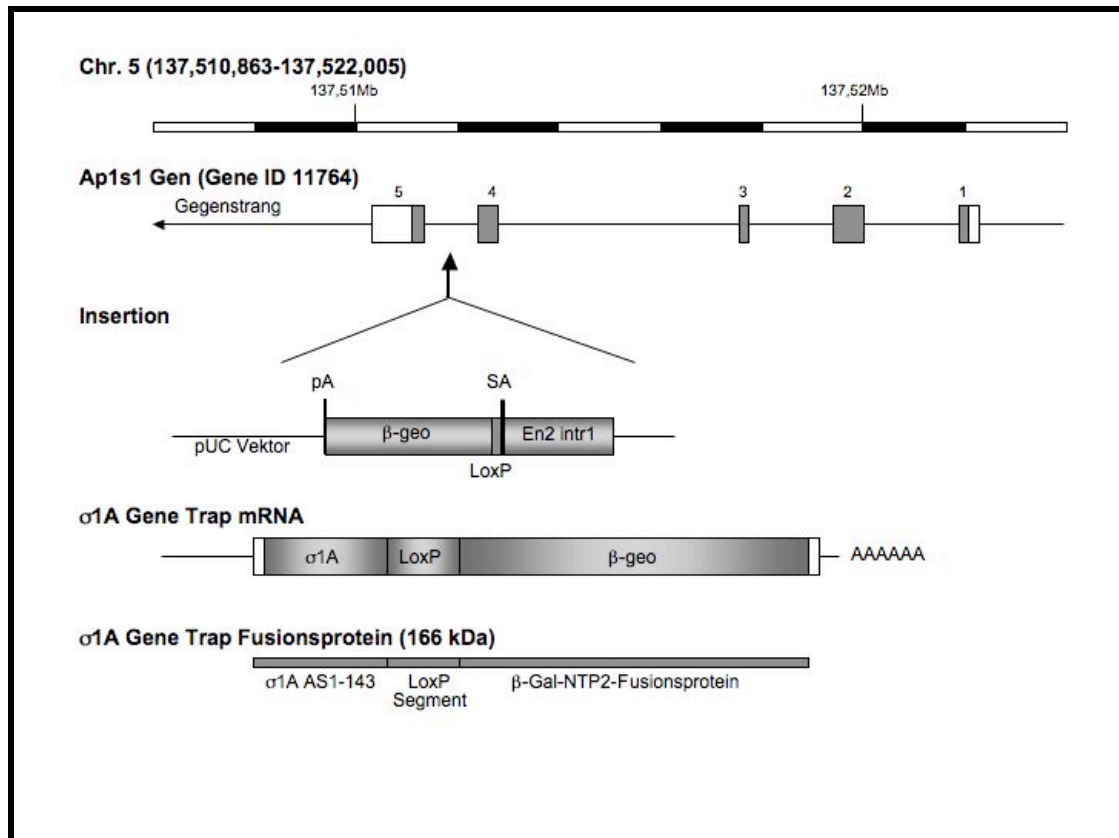
## **4.2 Generierung eines $\sigma$ 1A-defizienten Mausmodells**

### **4.2.1 Die Gene Trap ES-Zelllinie AZ0216**

Es existieren mehrere Datenbanken von ES-Zelllinien, in denen durch ungerichtete Insertionen Gene mutiert wurden. Durch Sequenzierung der Transkripte wurden die betroffenen Gene identifiziert. Auch der  $\sigma$ 1A-Adaptin-Genlocus (AP1S1) wurde durch solch einen „Gene Trap“-Ansatz mutagenisiert. Die entsprechende Zellklon-Bibliothek wird durch das Wellcome Trust Sanger Institute verwaltet. Im Gegensatz zu einem gerichteten Vorgehen wurden hier nicht gezielt Exonsequenzen mutagenisiert, sondern der mutagenisierende Vektor integriert in einer Intronsequenz. Das Vektorkonstrukt enthält eine hochaffine Spleissakzeptorstelle, die mit den endogenen Sequenzen beim Spleissen der mRNA konkurrieren. Die Identifizierung des betroffenen Gens erfolgte daher durch die Ermittlung der mRNA-Sequenz. Hierdurch wurde das Gen und das betroffene Intron bestimmt, nicht aber die genaue Integrationsstelle, deren Kenntnis für die Etablierung einer späteren Genotypisierung erforderlich ist.

Laut Datenbank weist der Klon AZ0216 eine Insertion im Intron 4-5 des Gen Ap1s1 auf. Der ES-Zellklon AZ0216 wurde durch Insertion des Gene Trap Vektors pGT0lrx in ES-Zellen des Mausstamms 129Ola generiert. Der Vektor besteht aus einem pUC-Vektorgrundgerüst. Er besitzt 1,5 kb des Maus En2 Introns1 (engrailed2) gefolgt von einer En2-Spleissakzeptorsequenz (SA), die in 3'-Richtung von einer loxP-Sequenz flankiert wird. Weiter in 3'-Richtung folgt die fusionierte Sequenz des Reportergens  $\beta$ -Galaktosidase und des Resistenzgens Neomycinphosphotransferase ( $\beta$ -geo) und abschließend ein Simian Virus 40-Polyadenylierungssignal (pA). Beim Spleissen wird die RNA-Sequenz des  $\beta$ -geo-Konstrukts an Exon 4 des Ap1s1 angefügt. So entsteht eine mRNA, die alle in 5'-Richtung gelegenen Exons des getrappten Gens sowie die Vektorsequenzen ab dessen 5'-Spleissakzeptorstelle bis zum Polyadenylierungssignal enthält. Durch Translation entsteht aus diesem Gen ein 166 kDa großes Fusionsprotein aus den Aminosäuren M1 bis E143 des  $\sigma$ 1A-Proteins,  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) und Neomycinphosphotransferase (NPT2), wobei  $\sigma$ 1A und das Reporterprotein durch eine „En2-leader“-

Sequenz verbunden sind (s. Abbildung 27). Das Adaptorprotein  $\sigma 1A$  wird also nicht vollständig deletiert, sondern durch ein Fusionsprotein ersetzt. Im Folgenden wird für das AP1S1 Gene Trap Allel die Bezeichnung  $\sigma 1A(-)$ -Allel verwendet.

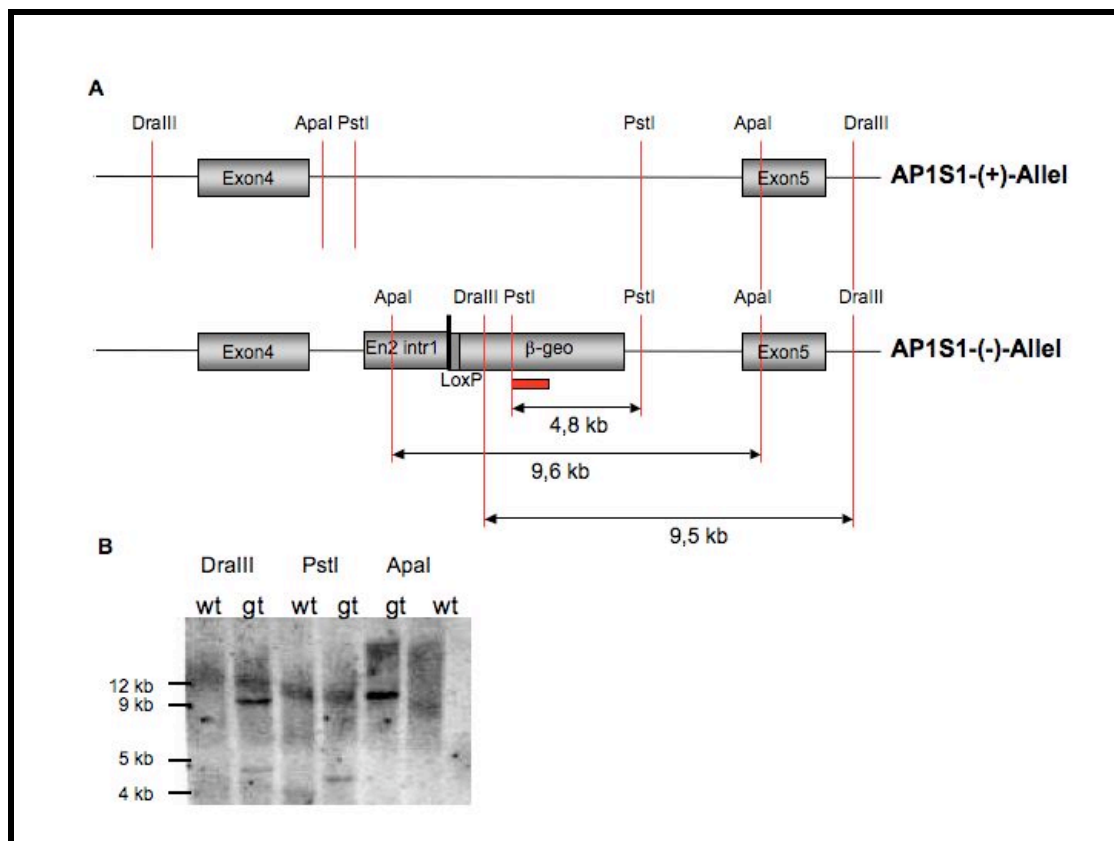


### Abbildung 27: Darstellung der Gene Trap Insertion

Die Abbildung stellt schematisch das AP1S1-Gen auf Chromosom 5 mit seiner Intron-Exon-Struktur und der Insertion des Gene Trap Konstrukts in der ES-Zelllinie AZ0216 dar. Des Weiteren zeigt dieses Schema die durch Transkription und Translation entstehende mRNA bzw. das dazugehörige Protein. pA: poly-Adenylierungssequenz; SA: Spleissakzeptorsequenz;  $\beta$ -Gal:  $\beta$ -Galaktosidase; NTP2: Neomycinphosphotransferase;

#### **4.2.2 Nachweis der Gene Trap Insertionsstelle**

Das Ergebnis der 5'-RACE-PCR aus der Datenbank zeigte, dass die Insertion des Gene Trap-Vektors im Intron 4-5 des AP1S1-Gens stattgefunden hatte. Zur späteren Genotypisierung der Mäuse war es wichtig, die genaue Insertionsstelle des Vektors pGT0l<sub>xr</sub> zu finden. Dazu wurde genomische DNA aus den ES-Zellen AZ0216 isoliert und ein Southern-Blot durchgeführt (s. 3.2.17). Jeweils 15 µg der genomischen DNA aus den AZ0216-Zellen und aus Wildtyp-Zellen wurden über Nacht mit folgenden Restriktionsenzymen verdaut: Pst I, Apa I und Dra III. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden anschließend in einem 0,8%-Agarosegel aufgetrennt und auf eine Hybond-N-Membran geblottet. Diese wurde mit einer radioaktiv-markierten Sonde gegen den inserierten Vektor hybridisiert. Diese 360 bp lange Sonde wurde durch eine PCR mit genomischer DNA und den Primern AK30 und AK31 generiert (s. 3.2.6). Abbildung 28 A zeigt eine graphische Darstellung des AP1S1-(+)-Allels und des AP1S1(-)-Allels sowie der Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme. In der Vektorsequenz befindet sich je verwendetem Enzym eine Schnittstelle. Für Pst I gibt es zwei Schnittstellen im Intron 4-5. Dra II schneidet sowohl im Intron 3-4 als auch jenseits des Exon5. Apa I erkennt eine Schnittstelle im Intron 4-5 und eine im Exon 5. Je nachdem, an welcher Stelle im Intron 4-5 die Insertion des Gene Trap-Vektors stattgefunden hatte, ergaben sich unterschiedlich lange Fragmente, die im Southern-Blot identifiziert werden können. Der Restriktionsverdau des AP1S1(-)-Allels mit Dra III erzeugte im Southern-Blot eine deutliche Bande in der Höhe von ca. 9,5 kb. Das durch den Apa I-Verdau generierte Fragment lag etwas höher. Durch den Restriktionsverdau mit Pst I entstand eine im Southern-Blot markierte Bande zwischen 4 und 5 kb. Wie erwartet, wurde nach keinem der drei durchgeführten Enzymreaktionen der Wildtyp-DNA ein spezifisches Fragment identifiziert. Zusammengefasst kann eine ungefähre Lage der Insertionsstelle 100 bp nach dem Ende des Exon4 angenommen werden.



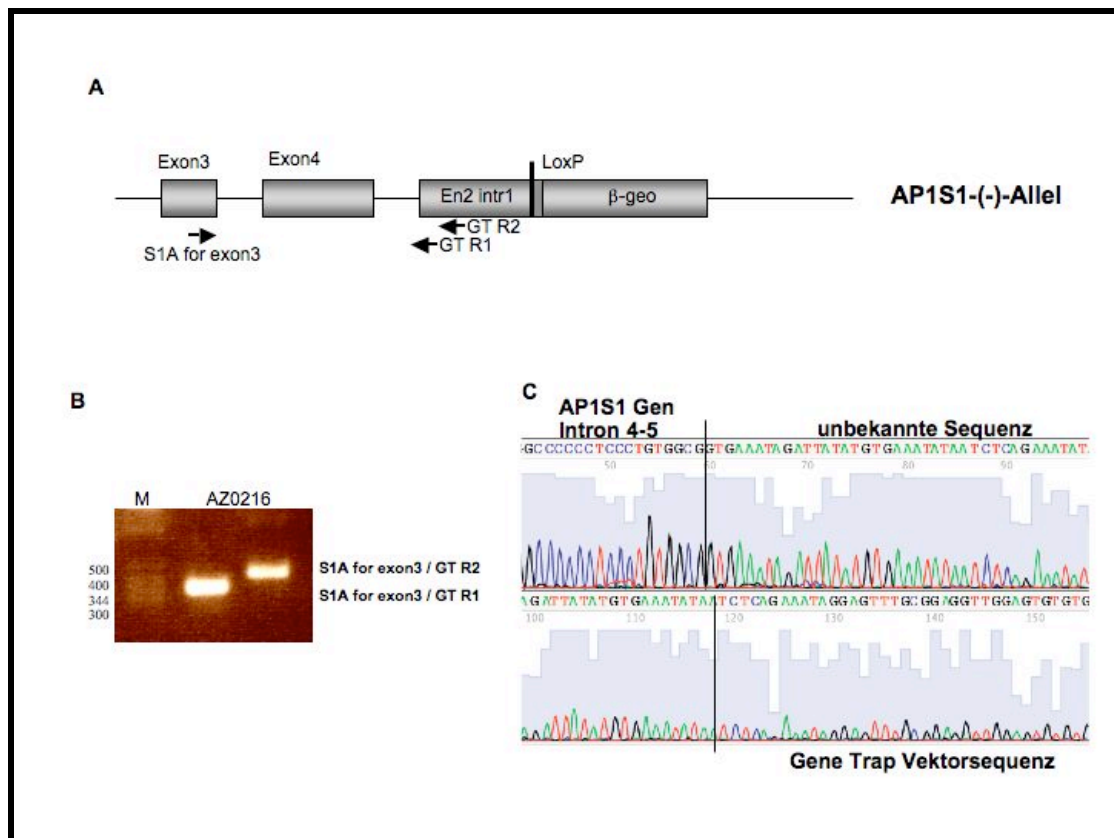
### Abbildung 28: Southern Blot Analyse des AP1S1(-)-Allels

Die Darstellung im Teil A) zeigt schematisch die Lage der im Southern-Blot verwendeten Restriktionsenzyme im AP1S1-(+)-Allel und im AP1S1(-)-Allel. Außerdem wird die, aus der Länge der identifizierten Banden des Southern-Blots kalkulierte Lage der Insertionsstelle gezeigt. Das rote Rechteck symbolisiert die Bindung der verwendeten Sonde.

Teil B) zeigt die Southern-Blot Analyse der durch Restriktionsverdau mit Pst I, Apa I und Dra III entstandenen DNA-Fragmente des AP1S1(-)-Allels. Durch Hybridisierung mit einer Sonde gegen den inserierten Gene Trap-Vektor wird eine 9,5 kb - Bande (Dra III), eine 4,8 kb – Bande (Pst I) und eine 9,6 kb – Bande (Apa I) identifiziert. Es wird erwartungsgemäß kein DNA-Fragment des AP1S1-(+)-Allels nachgewiesen.

Zur genaueren Bestimmung der Insertionsstelle wurde eine PCR durchgeführt, deren 5' Primersequenz (S1Aforexon3) auf dem Exon 3 liegt und deren 3' Oligonukleotidprimer (GTR1 bzw. GTR2) an der Intronsequenz des inserierten Vektor binden (s. Abbildung 29 A). Beide PCR-Ansätze waren erfolgreich und die Amplifikate unterschieden sich in der Länge wie erwartet um ca. 100 bp (s. Abbildung 29 B und Kapitel 3.2.6). Das erhaltene Produkt wurde über eine TA-Ligation in einen Vektor integriert. Eine anschließende

Sequenzierung ergab eine Integration des Gene Trap- Vektors nach bp 8643 im Gen AP1S1. Dies bestätigt das Ergebnis des Southern-Blot. Die inserierte Sequenz beginnt mit bp 54 der pGT0lrx Sequenz. Dazwischen befindet sich eine Sequenz unbekannter Herkunft (s. Abbildung 29 C).



### Abbildung 29: Identifizierung der Gene Trap Insertionsstelle

Teil A) stellt schematisch die Lage der Insertionsstelle und die der, in der PCR benutzten Primer dar. Eine elektrophoretische Auftrennung der Amplifikate der PCR-Reaktion mit den Primern S1A forexon3/GTR1 und S1A forexon3/GTR2 wird in B) gezeigt. In C) ist der Ausschnitt der Sequenz des Amplifikats der PCR S1A forexon3/GTR2 zu sehen.

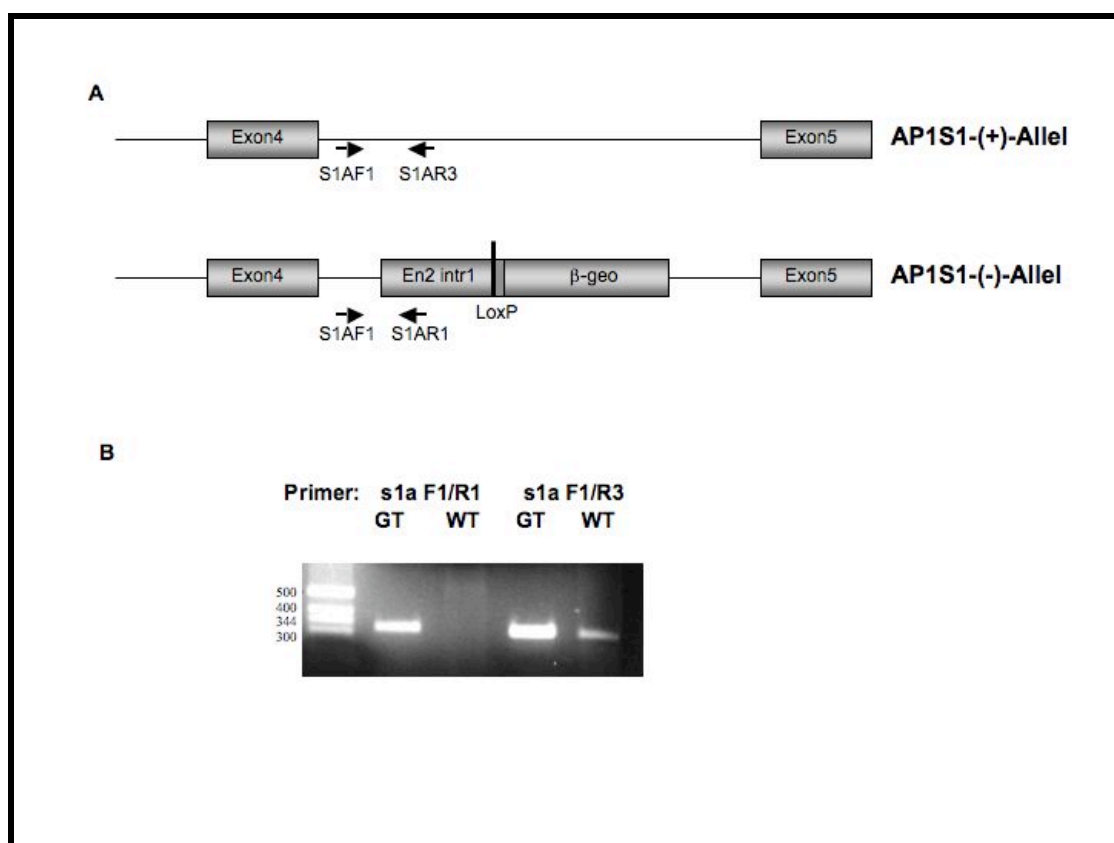
### **4.2.3 Generierung von Chimären durch Retransfer der ES-Zellen und Etablierung des $\sigma 1A$ -defizienten-Mausstamms**

Die ES-Zelllinie AZ0216 wurde von uns vom MMRRC (Mutant Mouse Regional Resource Center, Davis, CA, USA) für die Herstellung einer AP1S1-Gene Trap Mauslinie bezogen. Zum Nachweis der Gene Trap Insertionsstelle wurden aus den ES-Zellen genomische DNA isoliert. Außerdem wurden ES-Zellen zur Mikroinjektion in Blastocysten aus C57BL/6J-Weibchen vorbereitet. Die Blastocysteninjektion und der anschließende Retransfer in pseudoschwangere Weibchen wurden am Tierhaus des Max-Planck-Instituts für experimentelle Medizin von Frau Monika Schindler durchgeführt. Durch die Blastocysteninjektion wurden 10 chimäre Männchen erzeugt. Der Chimärismus wurde anhand der Fellfarbe der Tiere beurteilt und lag zwischen 5% und 50%. Drei der verpaarten Männchen zeigten eine Keimbahnbeteiligung der injizierten ES-Zellen und hatten agoutifarbene Nachkommen. Die Genotypisierung der Nachkommen zeigte, dass ein Drittel der agoutifarbenen Tiere heterozygot für das AP1S1-Gene Trap-Allel waren. Für die weitere Zucht wurden heterozygote Nachkommen untereinander verpaart, so dass der genetische Hintergrund des AP1S1-Mausstamms eine Mischung aus 129/OLA und C57BL/6J ist.

### **4.2.4 Genotypisierung des $\sigma 1A$ Mausmodells durch PCR**

Zur Genotypisierung des  $\sigma 1A$ -Mausstammes wurden zwei PCRs etabliert (s. 3.2.6.2). Als Forward-Primer (s1aF1) für beide Ansätze wurde eine Sequenz gewählt, die im Intron 4-5 des AP1S1-Gens direkt 5' vor der Insertionsstelle bindet. Zum Nachweis des AP1S1-(+)-Allels wurde der Reverse-Primer s1aR3 etabliert, der 3' der Insertionsstelle im Intron 4-5 bindet. Für eine Amplifikation einer für das AP1S1-(-)-Allel spezifischen DNA-Sequenz wurde der Reverse-Primer s1aR1 nahe des 5' Ende des inserierten Gene Trap-Vektors ausgewählt. Bei einer PCR auf DNA einer heterozygoten Maus ergeben beide PCRs ein Produkt der Länge von 300 bp. Bei homozygoten

Mäusen wird hingegen nur das spezifische PCR-Produkt amplifiziert. Abbildung 30 zeigt exemplarisch ein Agarosegel, auf dem die PCR-Produkte der genomischen DNA eines Wildtypiers und einer  $\sigma 1A^{+/-}$ -Maus aufgetrennt wurden. Mit Hilfe dieser beiden PCR-Reaktionen kann in Zukunft der Genotyp der Mäuse bestimmt werden.



### Abbildung 30: PCR zur Genotypisierung der $\sigma 1A$ -Mäuse

Teil A) der Abbildung zeigt ein Schema der beiden AP1S1-Allele einer heterozygoten  $\sigma 1A$ -Maus mit der Lage der verwendeten Primer.

Im Teil B) ist ein Photo der, in einem 2%-igen Agarosegel aufgetrennten, Amplifikate der Genotypisierungs-PCR auf der DNA einer (WT) und auf der einer heterozygoten Gene Trap-Maus (GT) gezeigt.

## 5. Diskussion

Der Adaptorproteinkomplex AP-1 ist essentiell für den Clathrin-vermittelten, vesikulären Transport von Proteinen zwischen dem TGN und dem endosomalen Kompartiment. Er besteht aus vier Untereinheiten,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$  und  $\sigma$ , die unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen. In dieser Arbeit sollten mit Hilfe von Mausmodellen neue Erkenntnisse über die spezifischen Funktionen der 3 unterschiedlich exprimierten  $\sigma$ 1-Isoformen, A, B und C gewonnen werden.

### 5.1 Etablierung neuer Mausmodelle

Es sollten zwei neue Mausmodelle etabliert werden. In Gene Trap Datenbanken im Internet war sowohl eine ES-Zelllinie für  $\sigma$ 1A als auch für  $\sigma$ 1C aufgeführt. Die Methode des "Gene Trapping" ist ein Hochdurchsatz-Verfahren zur Integration von ungerichteten Mutationen in Inserts des Genoms von murinen, embryonalen Stammzellen (zusammengefasst in Stanford *et al.*, 2001). Der ins Genom eingebrachte Gene Trap-Vektor enthält eine En2-Spleissakzeptorsequenz, 3' von einem Reporter-gen-Konstrukt und einem Simian Virus 40-Polyadenylierungssignal gefolgt. Durch die Insertion des Vektors entsteht beim Spleissen eine mRNA aus den 5' von der Insertionsstelle des Vektors gelegenen Anteilen des Gens, an die sich 3' die Reportersequenz des Vektors anschließt. Nach der Translation wird ein Gene Trap Fusionsprotein exprimiert, das aus einem N-terminalen Proteinanteil des mutagenisierten Gens und C-terminal dem vektorialen Reporter-gen besteht. Bei der Gene Trap Methode ist also auf Grund des weiterhin exprimierten Proteinanteils ein totaler Funktionsverlust des untersuchten Proteins nicht garantiert. Dies bedeutet, dass für jedes Mausmodell ein entsprechender Nachweis erbracht werden muss. Zunächst muss jedoch die genaue Insertionsstelle des Gene Trap Vektors im Genom nachgewiesen werden, damit eine Genotypisierungsstrategie für die Mäuse etabliert werden kann. Für die ES-Zelllinie mit einem mutagenisierten  $\sigma$ 1C-Adaptin-Genlokus (AP1S3) erwies sich dies als sehr schwierig. Auf Grund von falschen



Vorabinformationen und schwierigen genomischen Voraussetzungen hat dieser Schritt mehr Zeit gebraucht und mehr Arbeitskraft gebunden als geplant. Daher sind die bereits erbrachten Vorarbeiten nicht soweit fortgeschritten, dass sie in diese Arbeit aufgenommen worden sind.

Auch der  $\sigma$ 1A-Adaptin-Genlocus (AP1S1) wurde durch solch einen „Gene Trap“-Ansatz mutagenisiert. Durch einen Southern-Blot und die Analyse der genomischen  $\sigma$ 1A-Sequenz konnte die genaue Insertionsstelle im Intron 4-5 des AP1S1-Gens nachgewiesen werden (s. 4.2.2). Daraufhin wurde mit der Generierung und Zucht eines  $\sigma$ 1A-Gene Trap Mausstamms begonnen und eine Genotypisierungsstrategie etabliert (s. 4.2.4). Zum Zeitpunkt des Entstehens dieser Arbeit waren die ersten heterozygoten Tiere der F1-Generation genotypisiert. Es bleibt abzuwarten, ob eventuelle homozygot mutierte Mäuse der F2-Generation embryonal letal sind. Dies ist nicht unwahrscheinlich, da es sich bei  $\sigma$ 1A um die ubiquitär exprimierte Isoform handelt (Riel, 2004) und bereits zuvor etablierte Mausmodelle anderer Untereinheiten des AP-1 Komplexes embryonal letal sind (Zizioli *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2000). Auf Grund der hohen Homologien zwischen den  $\sigma$ 1-Isoformen ist es jedoch denkbar, dass alle ubiquitäre „house-keeping“ Funktionen erfüllen können. Unter diesen Bedingungen könnte eine  $\sigma$ 1A-Defizienz mit dem Leben vereinbar sein. Auch muss in den Geweben der Mäuse gezeigt werden, dass die Gene Trap Insertion tatsächlich zu einer vollständigen Deletion der Wildtyp-RNA durch Spleissen führt. Weiterhin ist der Funktionsverlust des  $\sigma$ 1A-Adaptins durch die Entstehung des Fusionsproteins nachzuweisen. Obwohl die Insertionsstelle des Gene Trap-Vektors im Intron 4-5 liegt und somit dem Fusionsprotein lediglich die 16 letzten Aminosäuren am C-Terminus fehlen, scheint ein Ausfall der Funktion sehr wahrscheinlich. Diese Aminosäuren bilden eine aus dem AP-1 Komplex herausragende  $\alpha$ -Helix (Heldwein *et al.*, 2004), deren Länge und Aminosäuresequenz unter den verschiedenen Isoformen stark variabel sind. In  $\sigma$ 2 fehlen sie komplett. Da die Untereinheit  $\sigma$  ansonsten sehr stark konserviert ist (Riel, 2004), liegt nahe, dass dieser Sequenzbereich eine Isoform-spezifische Funktion ausübt. Des Weiteren ist es sehr unwahrscheinlich, dass ein Fusionsprotein mit 166 kDa anstatt einer kleinen

Untereinheit von 20 kDa in einen AP-1 Komplex (270 kDa) eingebaut werden kann und dieser funktionell sein wird.

Sofern die homozygoten  $\sigma$ 1A-Gene Trap Mäuse lebensfähig sind und  $\sigma$ 1A-defizient sind, können diese Tiere wichtige Erkenntnisse über die Isoform-spezifischen Funktionen liefern. Sicherlich ist dann auch eine Kreuzung mit dem  $\sigma$ 1B-defizienten Mausstamm von großem Interesse, um mögliche additive Effekte zu untersuchen.

## **5.2 Charakterisierung des $\sigma$ 1B-defizienten Mausstamms**

Der Hauptteil der vorliegenden Arbeit beschreibt die Analyse eines  $\sigma$ 1B-defizienten Mausmodells, das im Rahmen einer vorangegangenen Doktorarbeit in unserer Arbeitsgruppe von Frau C.Riel etabliert worden war. Auf Grund von beobachteten Auffälligkeiten der Mäuse lag der Fokus der Experimente dieser Arbeit auf dem Wasserhaushalt, dem Fettgewebe und Verhaltensstudien der  $\sigma$ 1B-defizienten Tiere.

### **5.2.1 Untersuchungen des Wasserhaushalts der $\sigma$ 1B-defizienten**

#### **Mäuse**

Die  $\sigma$ 1B-Defizienz ist mit einer Störung der Harnausscheidung assoziiert (s. 4.1.1). Dies führt zu einem extremen Rückstau von Urin in der Blase und meistens nur einseitig in einer Niere. Das eigentliche Nierengewebe ist dabei komplett an die Wand der mit klarem Urin gefüllten Zyste zurückgedrängt. Die daraufhin durchgeführten Messungen des Wasserhaushalts der Mäuse haben gezeigt, dass die  $\sigma$ 1B-Defizienz auch mit einer Erhöhung des ausgeschiedenen Harnvolumens assoziiert ist (s. 4.1.1). Überraschenderweise haben auch Kontrolltiere, die der  $\sigma$ 1B-defizienten Zucht entstammten, ein den  $\sigma$ 1B-defizienten Tieren vergleichbares Volumen an Urin ausgeschieden. Im Vergleich zu Kontrollmäusen einer reinen Wildtypzucht zeigen beide Gruppen eine ungefähr dreifache Erhöhung. Der Wert der Wildtypzucht ist vergleichbar zu anderen Kontrollgruppen in der Literatur (Matsumura *et al.*, 1999; Gamp *et al.*, 2003; Fenton *et al.*, 2004). Bemerkenswert ist jedoch, dass in der Gruppe der  $\sigma$ 1B-defizienten Mäuse einzelne Tiere mit ihrer ausgeschiedenen Menge an Harn weit über dem Mittel lagen.

Daraus lässt sich zum einen folgern, dass die  $\sigma$ 1B-Defizienz in der Regulation der Harnmengen eine Rolle spielt. Des Weiteren scheint es jedoch bei den Mäusen eine Anpassung an die  $\sigma$ 1B-Defizienz zu geben. Dadurch wird das ausgeschiedene Volumen des Harns beim  $\sigma$ 1B-defizienten Mausstamm allgemein erhöht. Das Phänomen der Rückstauung des Urins ist eindeutig mit

der  $\sigma$ 1B-Defizienz assoziiert. Es scheint also ein weiterer Mechanismus durch den Verlust der  $\sigma$ 1B-Untereinheit beeinträchtigt zu sein. Auf Grund der  $\sigma$ 1B Expressionshöhe ist eine Funktionsstörung der Muskulatur in der Harnblase denkbar. Zur Miktion ist ein Zusammenspiel aus Kontraktion (z.B. M. detrusor vesicae) und Erschlaffung (M. sphincter urethrae) von unterschiedlichen Muskelsträngen erforderlich. Die Verhaltensstudien an  $\sigma$ 1B-defizienten Mäusen ergaben allerdings keine Hinweise auf eine Beeinträchtigung der quergestreiften Skelettmuskulatur. Sofern eine muskuläre Fehlfunktion die Ursache wäre, erscheint es daher wahrscheinlicher, dass die glatte Muskulatur der Harnblase betroffen ist.

Neben einer hohen Expression in Muskelgeweben ist  $\sigma$ 1B besonders stark in neuronalem Gewebe exprimiert. Es ist daher auch möglich, dass die Ursache des Rückstaus von Urin in einer nervalen Fehlfunktion liegt. Denkbar ist hier sowohl die nervale Steuerung der Harnblasenentleerung als auch die zentrale Regulierung von Durst. Die Miktion ist zwar ein vollständig automatischer Rückenmarksreflex, kann aber durch Zentren im Gehirn gehemmt oder gefördert werden. Dass die  $\sigma$ 1B-Defizienz einen Einfluss auf Transportprozesse in Neuronen hat, zeigen auch die Verhaltensstudien an  $\sigma$ 1B-defizienten Mäusen.

### **5.2.2 $\sigma$ 1B-defiziente Mäuse zeigen gravierende Lernstörungen**

Die  $\sigma$ 1B-defizienten Mäuse sind hypoaktiv, haben eine reduzierte Motorkoordination und eine stark verminderte Gedächtnisleistung (vgl. 4.1.3). Diese Daten unterstützen die Ergebnisse eines genetischen Screens an Menschen. Dabei wurden X-chromosomal gekoppelte Krankheiten analysiert. Der  $\sigma$ 1B-Genlokus wurde mit einer ernsthaften, geistigen Entwicklungsverzögerung in Verbindung gebracht (Tarpey *et al.*, 2006). Die beschriebenen Patienten lernen erst in einem Alter von fünf bis sechs Jahren laufen, entwickeln keine normal intelligente Sprache und sind lebenslang auf Unterstützung angewiesen. Des Weiteren zeigen sie eine Tendenz zur Entwicklung von langgestreckten Gesichtern und großen Ohren. Weitere Studien an  $\sigma$ 1B-defizienten Mäusen zeigen, dass die molekularen

Mechanismen, die zu den beobachteten Verhaltensänderungen führen, in einem gestörten, präsynaptischen Vesikelrecycling liegen. In hippocampalen Neuronen der  $\sigma$ 1B-defizienten Mäuse haben die Synapsen weniger synaptische Vesikel in Ruhe. Nach einer Stimulation der Zellen ist die Anzahl der synaptischen Vesikel dramatisch reduziert (Glyvuk N., Tsytsyura Y., Riel C., d'Hooge R., Baltés J., Böning D., Klingauf J., und Schu P., zur Publikation eingereicht).

### **5.2.3 Auswirkung der $\sigma$ 1B-Defizienz auf die Differenzierung von Fettgewebe**

Im Vergleich zu Wildtyptieren der gleichen Zucht haben  $\sigma$ 1B-defiziente Mäuse im Verhältnis zu ihrem Körpergewicht 40 Prozent weniger epididymales Fettgewebe (s. 4.1.3.1). Die vorhandenen Adipozyten sind aber gleich groß und funktionell. Die überprüften Serumkonzentrationen von sogenannten Adipokinen, vom Fettgewebe sezernierte Proteine, zeigen keine Unterschiede zwischen  $\sigma$ 1B-defizienten Mäusen und der Kontrollgruppe (s. 4.1.3.2.2). Getestet wurden: Resistin, ein 12,5 kDa großes Protein, dessen Sekretion wahrscheinlich durch Insulin bewirkt wird. Es hat eine proinflammatorische Wirkung. Seine eigentliche physiologische Rolle bedarf weiterer Experimente, liegt aber wahrscheinlich in einer Erhöhung der Insulinsensitivität (zusammengefasst in Fonseca-Alaniz *et al.*, 2007).

Der Wachstumsfaktor „Insulin like growth factor 1“ (IGF-1) induziert unter anderem die Adipogenese (Scavo *et al.*, 2004).

Leptin hemmt auf der Ebene des Hypothalamus die Entstehung von Hungergefühlen und erhöht den Energieumsatz (Henry und Clarke, 2008). Bei der Messung der Leptinkonzentration im Serum gab es sehr große Abweichungen (4.1.3.2.2). Wahrscheinlich ist dies auf eine hohe Fehlerrate bei den käuflich erworbenen ELISA-Platten zurückzuführen. Es gibt aber auch metabolische und endokrine Faktoren, die die Transkription von Leptin beeinflussen. Dazu gehören: Insulin, Glucokortikoide, inflammatorische Zytokine, Körpertemperatur, Wachstumshormone und Melatonin (Fonseca-

Alaniz *et al.*, 2007). Da den ausgewachsenen und gesunden Tieren zur gleichen Tageszeit Blut abgenommen wurde, können bis auf Insulin alle Fehlerquellen ausgeschlossen werden. Der Zugang zum Futter und Wasser war für die Mäuse frei. Dennoch befanden sich die Tiere eigentlich in ihrer Ruhephase, so dass man davon ausgehen kann, dass sie zum Zeitpunkt der Blutentnahme alle in einer Postresorptionsphase mit niedrigen Insulinkonzentrationen waren.

Adiponectin verstärkt die Insulinsensitivität und moduliert NF $\kappa$ B-Effekte und inhibiert TNF- $\alpha$ . Die in dieser Arbeit gemessenen Serumkonzentrationen liegen um einen Faktor 10 höher als die Literaturwerte (Combs *et al.*, 2003; Gui *et al.*, 2004). Es wurden aber keine Phänotyp-spezifischen Unterschiede gemessen. In unterschiedlichen Organismen konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von Adiponectin sich umgekehrt proportional zur Fettmasse verhält (zusammengefasst in Berg *et al.*, 2002). Der erhöhte Adiponectinspiegel könnte ein Versuch des Organismus sein, die Adipogenese hochzuregulieren. Hiermit stimmt überein, dass die Tiere während einer fettreichen Diät Gewebemasse aufbauten. Dies war bei  $\sigma$ 1B-defizienten Tieren in der Wachstumsphase sogar vermehrt, was ebenfalls kompensatorische Mechanismen nahelegt.

Ein durchgeführter Glukosetoleranztest ergab keine Unterschiede zwischen  $\sigma$ 1B-defizienten Mäusen und Kontrolltieren (s. 4.1.3.2.1). Mit Hilfe von Glukosetoleranztests kann man die, durch Insulin stimulierte Aufnahme von Glukose aus dem Blut messen. Insulin fördert dabei die Glukoseaufnahme durch die Muskulatur und das Fettgewebe. Dies bedeutet, dass die Insulinsensitivität der  $\sigma$ 1B-defizienten Mäuse unverändert ist.

Eine mögliche Erklärung für die kleineren epididymalen Fettpolster der  $\sigma$ 1B-defizienten Mäuse könnte in der Differenzierung der Adipozyten (Adipogenese) liegen (zusammengefasst in (MacDougald und Mandrup, 2002; Rosen und MacDougald, 2006)). Dieser Prozess wurde *in vitro* intensiv untersucht, da er bei häufigen Krankheiten wie Adipositas und Diabetes mellitus eine wichtige Rolle spielt. Die Adipogenese beginnt bereits vor der Geburt. Danach expandiert das Fettgewebe durch eine Zunahme der Anzahl und Größe der Zellen. Die Fähigkeit neue Adipozyten zu bilden, bleibt bis ins

Erwachsenenalter erhalten. Adipozyten entstehen aus multipotenten, mesenchymalen Stammzellen. In einer ersten Phase (Determinatio) bilden sich Präadipozyten, die morphologisch von ihren Vorgängerzellen nicht zu unterscheiden sind, aber die Fähigkeit verloren haben, sich in andere Zelltypen, wie Myoblasten, Osteoblasten oder Chondroblasten, zu entwickeln. In der zweiten Phase, der terminalen Differenzierung, entwickeln die Zellen die Eigenschaften von reifen Adipozyten (Fettsynthese und -transport, Insulinsensitivität und Sekretion von Adipokinen). Die Differenzierung zu Adipozyten ist ein extrem stark kontrollierter Prozess. Der wichtigste Regulator der Adipogenese ist der Transkriptionsfaktor PPAR $\gamma$ . Seine Expression in Fibroblasten reicht zur Induktion der Adipogenese aus (Tontonoz *et al.*, 1994) und ohne ihn ist eine Differenzierung nicht möglich. Ein biologischer Ligand konnte bisher nicht bestimmt werden aber, die antidiabetisch wirkende Gruppe der Pharmaka Thiazolidindione (TZD, Glitazone) wirkt antagonistisch. PPAR $\gamma$  wird während der terminalen Differenzierung induziert und ist Bestandteil einer Transkriptionsfaktorkaskade. Durch hormonelle Stimulation der Präadipozyten wird C/EBP- $\beta$  und - $\delta$  induziert. Diese Proteine binden direkt an den Promotor von PPAR $\gamma$ . Nach einer Aktivierung durch einen Liganden induziert PPAR $\gamma$  wiederum viele Zielgene, die in die Adipogenese und Lipidbildung involviert sind. Darunter ist C/EBP-  $\alpha$ , das seinerseits wieder an den Promotor von PPAR $\gamma$  bindet und einen Rückkopplungsmechanismus bildet (Linhart *et al.*, 2001). C/EBP- $\alpha$  induziert zusätzlich auch viele Adipozytengene direkt und ist wichtig für die Ausbildung der normalen Insulinsensitivität (El-Jack *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2003). Es gibt weitere Transkriptionsfaktoren, die eine Rolle spielen, u.a. SREBP-1c, STAT5a, CREB, GATA2/3 (inhibitorisch) und die Familie der „Krüppel-like factors“ (KLF). KLF15 induziert die Expression von GLUT4 (Gray *et al.*, 2002) und KLF6 inhibiert die Expression von „delta-like-1/pre-adipocyte factor-1“ (DLK1/PREF1) (Li *et al.*, 2005). Die Transkriptionsfaktoren stehen am Ende von Signalwegen, die extrazelluläre Informationen über die Konditionen für eine Differenzierung weitergeben. Ähnlich zu Notch besitzt DLK1/PREF1 mehrere „EGF-like repeats“ und wird durch proteolytische Spaltung aktiviert. Dadurch wird ein extrazellulärer Anteil

freigesetzt, der hemmend auf die Adipogenese wirkt (Smas *et al.*, 1997; Mei *et al.*, 2002). Der Wnt-Signalweg inhibiert durch einen Block der PPAR $\gamma$  und C/EBP- $\alpha$  Expression *in vitro* die Adipogenese (Ross *et al.*, 2000; Bennett *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2002). TGF $\beta$  inhibiert über den SMAD-Signalweg *in vitro* die Differenzierung von Präadipozyten (Choy und Derynck, 2003). Das zur selben Superfamilie gehörende BMP4 fördert den Übergang von mesenchymalen Stammzellen zu Präadipozyten (Tang *et al.*, 2004). Auch Insulin hat deutliche Effekte auf die Adipogenese und wirkt in frühen Phasen über eine Bindung an den IGF1-Rezeptor (Smith *et al.*, 1988).

Mit einem Differenzierungsassay, bei dem embryonale, murine Fibroblasten induziert werden und sich zu Adipozyten entwickeln, konnte gezeigt werden, dass die Zellen der  $\sigma$ 1B-defizienten Mäuse eine verringerte Differenzierungsrate aufweisen (s. 4.1.3.3).

In einer vorangegangenen Doktorarbeit (Radhakrishnan, 2006) wurde gezeigt, dass im Fettgewebe der  $\sigma$ 1B-defizienten Mäusen ein 4-facher Anstieg des Proteins Sortilin stattfindet. Es ist bekannt, dass Sortilin eine wichtige Rolle in der Bildung von insulinsensitiven GLUT4-Vesikeln in Adipozyten innehat (Shi und Kandror, 2007). Diese Funktion scheint in den  $\sigma$ 1B-defizienten Mäusen aber nicht gestört zu sein. Das heißt, diese Aufgabe nimmt Sortilin entweder AP-1 unabhängig wahr oder eines der beiden anderen ebenfalls im Fettgewebe exprimierten  $\sigma$ 1-Adaptine ist für diesen Aspekt verantwortlich oder ausreichend.

Zur Untersuchung der Auswirkung der Sortilin-Überexpression auf die Differenzierung von Adipozyten wurde ein für Studien der Adipogenese etabliertes Zellmodell, die 3T3-L1 Fibroblasten genutzt. Eine artifizielle, ca. 6-7 fache Überexpression von Sortilin in den 3T3-L1 Zellen führte zu einer stark verminderten Differenzierungsrate (4.1.3.3). Da der endogenen Überexpression im Fettgewebe von  $\sigma$ 1B-defizienten Mäusen keine erhöhte Transkriptionsrate zu Grunde liegt und auch andere Daten in der Literatur zu dem Modell führten, dass die Familie der VPS10P-Domäne-Rezeptoren, zu der Sortilin gehört, AP-1- und GGA-abhängig transportiert wird (Willnow *et al.*, 2008), handelt es sich wahrscheinlich um einen Fehlsortierungsphänotyp. Dies wird zurzeit in unserer Arbeitsgruppe detailliert analysiert. Bekannt ist,



dass Sortilin eine Funktion in der neuronalen Entwicklung hat. Dabei sind nicht nur Protein-sortierende Funktionen von Sortilin wichtig, sondern Sortilin ist auch Bestandteil eines Rezeptorkomplexes in der Plasmamembran, der der Signaltransduktion dient (Willnow *et al.*, 2008). Ob Sortilin in der Adipogenese eine analoge Funktion übernimmt, muss Gegenstand weiterer Experimente sein.

### **5.3 Ausblick**

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergeben sich folgende Fragen bzw. Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen:

Um den durch die  $\sigma$ 1B-Defizienz betroffenen Mechanismus aufzuklären, der das Phänomen des Harnrückstaus hervorruft, sollten histologische Untersuchungen der Harnblase folgen. So könnte man eventuell strukturelle Veränderungen in der Muskulatur finden. In Zusammenarbeit mit einer physiologischen Arbeitsgruppe könnte man auch an Präparaten der Harnblase Kraftmessungen von Muskelkontraktionen durchführen.

Ein zentrales Projekt der sich anschließenden Untersuchungen wird die weitere Aufklärung des Mechanismus des synaptischen Vesikelrecyclings in Neuronen von  $\sigma$ 1B-defizienten Mäusen sein. Dazu sollen isolierte synaptische Vesikel biochemisch charakterisiert werden.

Bezüglich der Fettdifferenzierung ist zu untersuchen, ob die im Fettgewebe von  $\sigma$ 1B-defizienten Mäusen gefundene Überexpression von Sortilin tatsächlich aus einer Fehlsortierung resultiert und wenn, in welchem Kompartiment Sortilin akkumuliert. Dazu wäre es von Vorteil, primäre Adipozyten in Kultur zu nehmen, so dass Sortilin in Immunfluoreszenzaufnahmen dargestellt werden kann. In weiterführenden Experimenten soll des Weiteren der Mechanismus der Differenzierung von Adipozyten in  $\sigma$ 1B-defizienten Mäusen analysiert werden. Dazu sollen die bekannten Zwischenstufen im Einzelnen näher untersucht werden, um die Funktion von  $\sigma$ 1B besser eingrenzen zu können. Ein Augenmerk liegt dabei auf der Expression von Proteinen, die an Signalwegen beteiligt sein könnten

---

über die Sortilin Einfluss auf die Adipozytendifferenzierung nimmt. Dazu gehören: p75<sup>NTR</sup>, EGF-Rezeptor und Pref-1.

Weitere Aufschlüsse über die Isoform-spezifischen Funktionen der  $\sigma$ 1-Untereinheiten sollte die Phänotypisierung der  $\sigma$ 1A-defizienten Mäuse erbringen. Sind diese  $\sigma$ 1A-defizienten Tiere lebensfähig, können doppeldefiziente Tiere gezüchtet werden, um das Funktionsspektrum des  $\sigma$ 1C-Adaptins einzugrenzen.

## 6. Zusammenfassung

Der multimere Adaptorproteinkomplex AP-1 ist ein essentieller Bestandteil Clathrin-umhüllter Vesikel, die zwischen dem TGN und dem endosomalen Kompartiment den Proteintransport aufrechterhalten. Er besteht aus 4 Untereinheiten, die beiden großen Untereinheiten  $\beta$  und  $\gamma$ , die mittlere Untereinheit  $\mu$  und die kleinste Untereinheit  $\sigma$ . Bisher waren für die drei unterschiedlichen Isoformen von  $\sigma$  keine spezifischen Funktionen bekannt.

In dieser Arbeit konnte ein Gene Trap-Mausmodell für  $\sigma$ 1A etabliert werden. Das heißt, die Insertionsstelle des Gene Trap-Vektors konnte bestimmt werden, so dass nun eine Genotypisierung durchgeführt werden kann und bis zum Ende des Jahres werden die ersten homozygoten Nachkommen erwartet.

In einer vorangegangenen Arbeit wurde von Frau C. Riel ein  $\sigma$ 1B-defizientes Mausmodell etabliert. Die  $\sigma$ 1B-defizienten Tiere sind lebensfähig, fertil und entwickeln sich in Bezug auf Größe und Gewicht vergleichbar zu Wildtypgeschwistern. Es zeigen auffällig viele der männlichen,  $\sigma$ 1B-defizienten Mäuse einen sehr starken Harnrückstau, der zu einer hydropisch angeschwollenen Harnblase und einer Flüssigkeitsansammlung im Nierenbecken führt. Eine Abflussbehinderung im Bereich der ableitenden Harnwege konnte nicht beobachtet werden. Die untersuchten Urin- und Serumparameter ergaben keinen Hinweis auf eine Fehlfunktion der Nieren. Im Mittel ist das ausgeschiedene Harnvolumen der  $\sigma$ 1B-defizienten Mäuse nicht größer als das der Kontrolltiere aus der gleichen Zucht. Es gibt allerdings einige Ausreißer nach oben. Im Vergleich zur reinen Wildtypzucht ist das Harnvolumen deutlich erhöht.

Verhaltensstudien an  $\sigma$ 1B-defizienten Mäusen haben gezeigt, dass sie hypoaktiv sind und eine schlechtere motorische Koordination besitzen. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die  $\sigma$ 1B-defizienten Mäuse auf Grund eines gestörten synaptischen Vesikelrecyclings eine verminderte räumliche Gedächtnisleistung haben. Dies stützt eine Studie, die den  $\sigma$ 1B-Genlocus mit

einer schweren x-chromosomalen geistigen Entwicklungsstörung in Patienten korreliert hat.

$\sigma$ 1B-defiziente Mäuse haben im Vergleich zu den Kontrolltieren weniger Fettgewebe. Das vorhandene Fettgewebe ist aber funktionell nicht beeinträchtigt. In einem Differenzierungsassay von MEF zu Adipozyten sind die Zellen von  $\sigma$ 1B-defizienten Mäusen weniger potent. Eine Rolle in der Regulation der Adipogenese des Proteins Sortilin, das im Fettgewebe von  $\sigma$ 1B-defizienten Mäusen überexprimiert wird, erscheint möglich.

Die  $\sigma$ 1B-Defizienz ist also mit drei unterschiedlichen physiologischen Abläufen assoziiert: der Regulation des Wasserhaushalts, der synaptischen Vesikelbildung und der Adipozytendifferenzierung.

## 7. Literaturverzeichnis

Ahle, S. und Ungewickell, E. (1986). Purification and properties of a new clathrin assembly protein. *Embo J* 5, 3143-3149.

Al-Hasani, H., Kunamneni, R.K., Dawson, K., Hinck, C.S., Muller-Wieland, D. und Cushman, S.W. (2002). Roles of the N- and C-termini of GLUT4 in endocytosis. *J Cell Sci* 115, 131-140.

Andersen, J.S., Wilkinson, C.J., Mayor, T., Mortensen, P., Nigg, E.A. und Mann, M. (2003). Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature* 426, 570-574.

Austin, C., Boehm, M. und Tooze, S.A. (2002). Site-specific cross-linking reveals a differential direct interaction of class 1, 2, and 3 ADP-ribosylation factors with adaptor protein complexes 1 and 3. *Biochemistry* 41, 4669-4677.

Ball, C.L., Hunt, S.P. und Robinson, M.S. (1995). Expression and localization of alpha-adaptin isoforms. *J Cell Sci* 108 ( Pt 8), 2865-2875.

Barois, N. und Bakke, O. (2005). The adaptor protein AP-4 as a component of the clathrin coat machinery: a morphological study. *Biochem J* 385, 503-510.

Bennett, C.N., Ross, S.E., Longo, K.A., Bajnok, L., Hemati, N., Johnson, K.W., Harrison, S.D. und MacDougald, O.A. (2002). Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *J Biol Chem* 277, 30998-31004.

Berg, A.H., Combs, T.P. und Scherer, P.E. (2002). ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 13, 84-89.

Bhagavati, S. und Xu, W. (2004). Isolation and enrichment of skeletal muscle progenitor cells from mouse bone marrow. *Biochem Biophys Res Commun* 318, 119-124.

Blondeau, F., Ritter, B., Allaire, P.D., Wasiak, S., Girard, M., Hussain, N.K., Angers, A., Legendre-Guillemain, V., Roy, L., Boismenu, D., Kearney, R.E., Bell, A.W., Bergeron, J.J. und McPherson, P.S. (2004). Tandem MS analysis of brain clathrin-coated vesicles reveals their critical involvement in synaptic vesicle recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3833-3838.

Bonifacino, J.S. (2004). The GGA proteins: adaptors on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 23-32.

Bonifacino, J.S. und Glick, B.S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116, 153-166.

- Bonifacino, J.S. und Traub, L.M. (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* 72, 395-447.
- Borlido, J., Veltri, G., Jackson, A.P. und Mills, I.G. (2008). Clathrin is spindle-associated but not essential for mitosis. *PLoS ONE* 3, e3115.
- Borner, G.H., Rana, A.A., Forster, R., Harbour, M., Smith, J.C. und Robinson, M.S. (2007). CVAK104 is a novel regulator of clathrin-mediated SNARE sorting. *Traffic* 8, 893-903.
- Bremnes, T., Lauvrak, V., Lindqvist, B. und Bakke, O. (1998). A region from the medium chain adaptor subunit ( $\mu$ ) recognizes leucine- and tyrosine-based sorting signals. *J Biol Chem* 273, 8638-8645.
- Chen, H., Fre, S., Slepnev, V.I., Capua, M.R., Takei, K., Butler, M.H., Di Fiore, P.P. und De Camilli, P. (1998). Epsin is an EH-domain-binding protein implicated in clathrin-mediated endocytosis. *Nature* 394, 793-797.
- Chi, S., Cao, H., Chen, J. und McNiven, M.A. (2008). Eps15 mediates vesicle trafficking from the trans-Golgi network via an interaction with the clathrin adaptor AP-1. *Mol Biol Cell* 19, 3564-3575.
- Chidambaram, S., Mullers, N., Wiederhold, K., Haucke, V. und von Mollard, G.F. (2004). Specific interaction between SNAREs and epsin N-terminal homology (ENTH) domains of epsin-related proteins in trans-Golgi network to endosome transport. *J Biol Chem* 279, 4175-4179.
- Choy, L. und Derynck, R. (2003). Transforming growth factor-beta inhibits adipocyte differentiation by Smad3 interacting with CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) and repressing C/EBP transactivation function. *J Biol Chem* 278, 9609-9619.
- Collins, B.M., McCoy, A.J., Kent, H.M., Evans, P.R. und Owen, D.J. (2002). Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell* 109, 523-535.
- Combs, T.P., Berg, A.H., Rajala, M.W., Klebanov, S., Iyengar, P., Jimenez-Chillaron, J.C., Patti, M.E., Klein, S.L., Weinstein, R.S. und Scherer, P.E. (2003). Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes* 52, 268-276.
- Crump, C.M., Xiang, Y., Thomas, L., Gu, F., Austin, C., Tooze, S.A. und Thomas, G. (2001). PACS-1 binding to adaptors is required for acidic cluster motif-mediated protein traffic. *Embo J* 20, 2191-2201.
- Dell'Angelica, E.C., Klumperman, J., Stoorvogel, W. und Bonifacino, J.S. (1998). Association of the AP-3 adaptor complex with clathrin. *Science* 280, 431-434.

Dell'Angelica, E.C., Ohno, H., Ooi, C.E., Rabinovich, E., Roche, K.W. und Bonifacino, J.S. (1997a). AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression. *Embo J* 16, 917-928.

Dell'Angelica, E.C., Ooi, C.E. und Bonifacino, J.S. (1997b). Beta3A-adaptin, a subunit of the adaptor-like complex AP-3. *J Biol Chem* 272, 15078-15084.

Deneka, M., Neeft, M., Popa, I., van Oort, M., Sprong, H., Oorschot, V., Klumperman, J., Schu, P. und van der Sluijs, P. (2003). Rabaptin-5alpha/rabaptin-4 serves as a linker between rab4 and gamma(1)-adaptin in membrane recycling from endosomes. *Embo J* 22, 2645-2657.

Dilaver, G., Schepens, J., van den Maagdenberg, A., Wijers, M., Pepers, B., Fransen, J. und Hendriks, W. (2003). Colocalisation of the protein tyrosine phosphatases PTP-SL and PTPBR7 with beta4-adaptin in neuronal cells. *Histochem Cell Biol* 119, 1-13.

Doray, B., Ghosh, P., Griffith, J., Geuze, H.J. und Kornfeld, S. (2002). Cooperation of GGAs and AP-1 in packaging MPRs at the trans-Golgi network. *Science* 297, 1700-1703.

Doray, B. und Kornfeld, S. (2001). Gamma subunit of the AP-1 adaptor complex binds clathrin: implications for cooperative binding in coated vesicle assembly. *Mol Biol Cell* 12, 1925-1935.

Doray, B., Lee, I., Knisely, J., Bu, G. und Kornfeld, S. (2007). The gamma/sigma1 and alpha/sigma2 hemicomplexes of clathrin adaptors AP-1 and AP-2 harbor the dileucine recognition site. *Mol Biol Cell* 18, 1887-1896.

El-Jack, A.K., Hamm, J.K., Pilch, P.F. und Farmer, S.R. (1999). Reconstitution of insulin-sensitive glucose transport in fibroblasts requires expression of both PPARgamma and C/EBPalpha. *J Biol Chem* 274, 7946-7951.

Eskelinen, E.L., Meyer, C., Ohno, H., von Figura, K. und Schu, P. (2002). The polarized epithelia-specific mu 1B-adaptin complements mu 1A-deficiency in fibroblasts. *EMBO Rep* 3, 471-477.

Faundez, V., Horng, J.T. und Kelly, R.B. (1998). A function for the AP3 coat complex in synaptic vesicle formation from endosomes. *Cell* 93, 423-432.

Fenton, R.A., Chou, C.L., Stewart, G.S., Smith, C.P. und Knepper, M.A. (2004). Urinary concentrating defect in mice with selective deletion of phloretin-sensitive urea transporters in the renal collecting duct. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7469-7474.

Fölsch, H., Ohno, H., Bonifacino, J.S. und Mellman, I. (1999). A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* 99, 189-198.

Fölsch, H., Pypaert, M., Schu, P. und Mellman, I. (2001). Distribution and function of AP-1 clathrin adaptor complexes in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 152, 595-606.

Fonseca-Alaniz, M.H., Takada, J., Alonso-Vale, M.I. und Lima, F.B. (2007). Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr (Rio J)* 83, S192-203.

Ford, M.G., Mills, I.G., Peter, B.J., Vallis, Y., Praefcke, G.J., Evans, P.R. und McMahon, H.T. (2002). Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* 419, 361-366.

Gaidarov, I., Smith, M.E., Domin, J. und Keen, J.H. (2001). The class II phosphoinositide 3-kinase C2alpha is activated by clathrin and regulates clathrin-mediated membrane trafficking. *Mol Cell* 7, 443-449.

Gamp, A.C., Tanaka, Y., Lullmann-Rauch, R., Wittke, D., D'Hooge, R., De Deyn, P.P., Moser, T., Maier, H., Hartmann, D., Reiss, K., Illert, A.L., von Figura, K. und Saftig, P. (2003). LIMP-2/LGP85 deficiency causes ureteric pelvic junction obstruction, deafness and peripheral neuropathy in mice. *Hum Mol Genet* 12, 631-646.

Geuze, H.J., Slot, J.W., Strous, G.J., Hasilik, A. und Von Figura, K. (1984). Ultrastructural localization of the mannose 6-phosphate receptor in rat liver. *J Cell Biol* 98, 2047-2054.

Ghosh, P., Dahms, N.M. und Kornfeld, S. (2003 a). Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 202-212.

Ghosh, P. und Kornfeld, S. (2003 b). AP-1 binding to sorting signals and release from clathrin-coated vesicles is regulated by phosphorylation. *J Cell Biol* 160, 699-708.

Ghosh, P. und Kornfeld, S. (2004). The GGA proteins: key players in protein sorting at the trans-Golgi network. *Eur J Cell Biol* 83, 257-262.

Gillingham, A.K., Koumanov, F., Pryor, P.R., Reaves, B.J. und Holman, G.D. (1999). Association of AP1 adaptor complexes with GLUT4 vesicles. *J Cell Sci* 112 ( Pt 24), 4793-4800.

Glick, B.S. (2002). Can the Golgi form de novo? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 615-619.

Godi, A., Pertile, P., Meyers, R., Marra, P., Di Tullio, G., Iurisci, C., Luini, A., Corda, D. und De Matteis, M.A. (1999). ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase-beta and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P2 on the Golgi complex. *Nat Cell Biol* 1, 280-287.

Gray, S., Feinberg, M.W., Hull, S., Kuo, C.T., Watanabe, M., Sen-Banerjee, S., DePina, A., Haspel, R. und Jain, M.K. (2002). The Kruppel-like factor



KLF15 regulates the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4. *J Biol Chem* 277, 34322-34328.

Gui, Y., Silha, J.V. und Murphy, L.J. (2004). Sexual dimorphism and regulation of resistin, adiponectin, and leptin expression in the mouse. *Obes Res* 12, 1481-1491.

Hannan, L.A., Newmyer, S.L. und Schmid, S.L. (1998). ATP- and cytosol-dependent release of adaptor proteins from clathrin-coated vesicles: A dual role for Hsc70. *Mol Biol Cell* 9, 2217-2229.

Hawryluk, M.J., Keyel, P.A., Mishra, S.K., Watkins, S.C., Heuser, J.E. und Traub, L.M. (2006). Epsin 1 is a polyubiquitin-selective clathrin-associated sorting protein. *Traffic* 7, 262-281.

Heldwein, E.E., Macia, E., Wang, J., Yin, H.L., Kirchhausen, T. und Harrison, S.C. (2004). Crystal structure of the clathrin adaptor protein 1 core. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14108-14113.

Henry, B.A. und Clarke, I.J. (2008). Adipose tissue hormones and the regulation of food intake. *J Neuroendocrinol* 20, 842-849.

Hille-Rehfeld, A. (1995). Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1241, 177-194.

Hinrichsen, L., Meyerholz, A., Groos, S. und Ungewickell, E.J. (2006). Bending a membrane: how clathrin affects budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8715-8720.

Hirst, J., Bright, N.A., Rous, B. und Robinson, M.S. (1999). Characterization of a fourth adaptor-related protein complex. *Mol Biol Cell* 10, 2787-2802.

Hirst, J., Motley, A., Harasaki, K., Peak Chew, S.Y. und Robinson, M.S. (2003). EpsinR: an ENTH domain-containing protein that interacts with AP-1. *Mol Biol Cell* 14, 625-641.

Hirst, J. und Robinson, M.S. (1998). Clathrin and adaptors. *Biochim Biophys Acta* 1404, 173-193.

Hofmann, M.W., Höning, S., Rodionov, D., Dobberstein, B., von Figura, K. und Bakke, O. (1999). The leucine-based sorting motifs in the cytoplasmic domain of the invariant chain are recognized by the clathrin adaptors AP1 and AP2 and their medium chains. *J Biol Chem* 274, 36153-36158.

Höning, S., Sosa, M., Hille-Rehfeld, A. und von Figura, K. (1997). The 46-kDa mannose 6-phosphate receptor contains multiple binding sites for clathrin adaptors. *J Biol Chem* 272, 19884-19890.

Hou, J.C., Suzuki, N., Pessin, J.E. und Watson, R.T. (2006). A specific dileucine motif is required for the GGA-dependent entry of newly synthesized

insulin-responsive aminopeptidase into the insulin-responsive compartment. *J Biol Chem* **281**, 33457-33466.

Huang, F., Nesterov, A., Carter, R.E. und Sorkin, A. (2001). Trafficking of yellow-fluorescent-protein-tagged mu1 subunit of clathrin adaptor AP-1 complex in living cells. *Traffic* **2**, 345-357.

Iuchi, S., Marsch-Moreno, M., Velez-DelValle, C., Easley, K., Kuri-Harcuch, W. und Green, H. (2006). An immortalized drug-resistant cell line established from 12-13-day mouse embryos for the propagation of human embryonic stem cells. *Differentiation* **74**, 160-166.

Jahn, R., Lang, T. und Sudhof, T.C. (2003). Membrane fusion. *Cell* **112**, 519-533.

Janvier, K., Kato, Y., Boehm, M., Rose, J.R., Martina, J.A., Kim, B.Y., Venkatesan, S. und Bonifacino, J.S. (2003). Recognition of dileucine-based sorting signals from HIV-1 Nef and LIMP-II by the AP-1 gamma-sigma1 and AP-3 delta-sigma3 hemicomplexes. *J Cell Biol* **163**, 1281-1290.

Kantheti, P., Qiao, X., Diaz, M.E., Peden, A.A., Meyer, G.E., Carskadon, S.L., Kapfhamer, D., Sufalko, D., Robinson, M.S., Noebels, J.L. und Burmeister, M. (1998). Mutation in AP-3 delta in the mocha mouse links endosomal transport to storage deficiency in platelets, melanosomes, and synaptic vesicles. *Neuron* **21**, 111-122.

Kent, H.M., McMahon, H.T., Evans, P.R., Benmerah, A. und Owen, D.J. (2002). Gamma-adaptin appendage domain: structure and binding site for Eps15 and gamma-synergin. *Structure* **10**, 1139-1148.

Kirchhausen, T. und Harrison, S.C. (1981). Protein organization in clathrin trimers. *Cell* **23**, 755-761.

Le Borgne, R. und Hoflack, B. (1997). Mannose 6-phosphate receptors regulate the formation of clathrin-coated vesicles in the TGN. *J Cell Biol* **137**, 335-345.

Li, D., Yea, S., Li, S., Chen, Z., Narla, G., Banck, M., Laborda, J., Tan, S., Friedman, J.M., Friedman, S.L. und Walsh, M.J. (2005). Kruppel-like factor-6 promotes preadipocyte differentiation through histone deacetylase 3-dependent repression of DLK1. *J Biol Chem* **280**, 26941-26952.

Li, L.V. und Kandror, K.V. (2005). Golgi-localized, gamma-ear-containing, Arf-binding protein adaptors mediate insulin-responsive trafficking of glucose transporter 4 in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* **19**, 2145-2153.

Linhart, H.G., Ishimura-Oka, K., DeMayo, F., Kibe, T., Repka, D., Poindexter, B., Bick, R.J. und Darlington, G.J. (2001). C/EBPalpha is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12532-12537.

Liu, S.H., Towler, M.C., Chen, E., Chen, C.Y., Song, W., Apodaca, G. und Brodsky, F.M. (2001). A novel clathrin homolog that co-distributes with cytoskeletal components functions in the trans-Golgi network. *Embo J* 20, 272-284.

Lui-Roberts, W.W., Collinson, L.M., Hewlett, L.J., Michaux, G. und Cutler, D.F. (2005). An AP-1/clathrin coat plays a novel and essential role in forming the Weibel-Palade bodies of endothelial cells. *J Cell Biol* 170, 627-636.

Lui-Roberts, W.W., Ferraro, F., Nightingale, T.D. und Cutler, D.F. (2008). Aftiphilin and  $\{\gamma\}$ -Synergins are Required for Secretagogue-sensitivity of Weibel-Palade Bodies in Endothelial Cells. *Mol Biol Cell*.

Lundmark, R. und Carlsson, S.R. (2003). Sorting nexin 9 participates in clathrin-mediated endocytosis through interactions with the core components. *J Biol Chem* 278, 46772-46781.

MacDougald, O.A. und Mandrup, S. (2002). Adipogenesis: forces that tip the scales. *Trends Endocrinol Metab* 13, 5-11.

Marks, M.S., Woodruff, L., Ohno, H. und Bonifacino, J.S. (1996). Protein targeting by tyrosine- and di-leucine-based signals: evidence for distinct saturable components. *J Cell Biol* 135, 341-354.

Marsh, B.J., Martin, S., Melvin, D.R., Martin, L.B., Alm, R.A., Gould, G.W. und James, D.E. (1998). Mutational analysis of the carboxy-terminal phosphorylation site of GLUT-4 in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol* 275, E412-422.

Matsuda, S., Miura, E., Matsuda, K., Kakegawa, W., Kohda, K., Watanabe, M. und Yuzaki, M. (2008). Accumulation of AMPA receptors in autophagosomes in neuronal axons lacking adaptor protein AP-4. *Neuron* 57, 730-745.

Matsumura, Y., Uchida, S., Kondo, Y., Miyazaki, H., Ko, S.B., Hayama, A., Morimoto, T., Liu, W., Arisawa, M., Sasaki, S. und Marumo, F. (1999). Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel. *Nat Genet* 21, 95-98.

Mattera, R., Arighi, C.N., Lodge, R., Zerial, M. und Bonifacino, J.S. (2003). Divalent interaction of the GGAs with the Rabaptin-5-Rabex-5 complex. *Embo J* 22, 78-88.

Mattera, R., Puertollano, R., Smith, W.J. und Bonifacino, J.S. (2004). The trihelical bundle subdomain of the GGA proteins interacts with multiple partners through overlapping but distinct sites. *J Biol Chem* 279, 31409-31418.

Medigeshi, G.R. und Schu, P. (2003). Characterization of the in vitro retrograde transport of MPR46. *Traffic* 4, 802-811.

Mei, B., Zhao, L., Chen, L. und Sul, H.S. (2002). Only the large soluble form of preadipocyte factor-1 (Pref-1), but not the small soluble and membrane forms, inhibits adipocyte differentiation: role of alternative splicing. *Biochem J* 364, 137-144.

Meyer, C., Eskelinen, E.L., Guruprasad, M.R., von Figura, K. und Schu, P. (2001). Mu 1A deficiency induces a profound increase in MPR300/IGF-II receptor internalization rate. *J Cell Sci* 114, 4469-4476.

Meyer, C., Zizioli, D., Lausmann, S., Eskelinen, E.L., Hamann, J., Saftig, P., von Figura, K. und Schu, P. (2000). mu1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors. *Embo J* 19, 2193-2203.

Meyerholz, A., Hinrichsen, L., Groos, S., Esk, P.C., Brandes, G. und Ungewickell, E.J. (2005). Effect of clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein depletion on clathrin coat formation. *Traffic* 6, 1225-1234.

Mills, I.G., Praefcke, G.J., Vallis, Y., Peter, B.J., Olesen, L.E., Gallop, J.L., Butler, P.J., Evans, P.R. und McMahon, H.T. (2003). EpsinR: an AP1/clathrin interacting protein involved in vesicle trafficking. *J Cell Biol* 160, 213-222.

Morris, N.J., Ross, S.A., Lane, W.S., Moestrup, S.K., Petersen, C.M., Keller, S.R. und Lienhard, G.E. (1998). Sortilin is the major 110-kDa protein in GLUT4 vesicles from adipocytes. *J Biol Chem* 273, 3582-3587.

Neubrand, V.E., Will, R.D., Mobius, W., Poustka, A., Wiemann, S., Schu, P., Dotti, C.G., Pepperkok, R. und Simpson, J.C. (2005). Gamma-BAR, a novel AP-1-interacting protein involved in post-Golgi trafficking. *Embo J* 24, 1122-1133.

Newell-Litwa, K., Seong, E., Burmeister, M. und Faundez, V. (2007). Neuronal and non-neuronal functions of the AP-3 sorting machinery. *J Cell Sci* 120, 531-541.

Nie, Z. und Randazzo, P.A. (2006). Arf GAPs and membrane traffic. *J Cell Sci* 119, 1203-1211.

Nielsen, M.S., Madsen, P., Christensen, E.I., Nykjaer, A., Gliemann, J., Kasper, D., Pohlmann, R. und Petersen, C.M. (2001). The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *Embo J* 20, 2180-2190.

Odorizzi, G., Cowles, C.R. und Emr, S.D. (1998). The AP-3 complex: a coat of many colours. *Trends Cell Biol* 8, 282-288.

Ohno, H., Aguilar, R.C., Yeh, D., Taura, D., Saito, T. und Bonifacino, J.S. (1998). The medium subunits of adaptor complexes recognize distinct but

overlapping sets of tyrosine-based sorting signals. *J Biol Chem* 273, 25915-25921.

Ohno, H., Tomemori, T., Nakatsu, F., Okazaki, Y., Aguilar, R.C., Foelsch, H., Mellman, I., Saito, T., Shirasawa, T. und Bonifacino, J.S. (1999). Mu1B, a novel adaptor medium chain expressed in polarized epithelial cells. *FEBS Lett* 449, 215-220.

Owen, D.J., Collins, B.M. und Evans, P.R. (2004). Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 153-191.

Owen, D.J. und Evans, P.R. (1998). A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytotic signals. *Science* 282, 1327-1332.

Page, L.J., Sowerby, P.J., Lui, W.W. und Robinson, M.S. (1999). Gamma-synergin: an EH domain-containing protein that interacts with gamma-adaptin. *J Cell Biol* 146, 993-1004.

Pearse, B.M. und Robinson, M.S. (1984). Purification and properties of 100-kd proteins from coated vesicles and their reconstitution with clathrin. *Embo J* 3, 1951-1957.

Peden, A.A., Oorschot, V., Hesser, B.A., Austin, C.D., Scheller, R.H. und Klumperman, J. (2004). Localization of the AP-3 adaptor complex defines a novel endosomal exit site for lysosomal membrane proteins. *J Cell Biol* 164, 1065-1076.

Petersen, C.M., Nielsen, M.S., Nykjaer, A., Jacobsen, L., Tommerup, N., Rasmussen, H.H., Roigaard, H., Gliemann, J., Madsen, P. und Moestrup, S.K. (1997). Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *J Biol Chem* 272, 3599-3605.

Pevsner, J., Volkandt, W., Wong, B.R. und Scheller, R.H. (1994). Two rat homologs of clathrin-associated adaptor proteins. *Gene* 146, 279-283.

Puertollano, R., Aguilar, R.C., Gorshkova, I., Crouch, R.J. und Bonifacino, J.S. (2001). Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs. *Science* 292, 1712-1716.

Puertollano, R. und Bonifacino, J.S. (2004). Interactions of GGA3 with the ubiquitin sorting machinery. *Nat Cell Biol* 6, 244-251.

Radhakrishnan, K. (2006). Studies on AP-1 Sorting Function and Regulation of Membrane Binding. Dissertation, Georg-August-Universität, Göttingen.

Raiborg, C., Bache, K.G., Mehlum, A., Stang, E. und Stenmark, H. (2001a). Hrs recruits clathrin to early endosomes. *Embo J* 20, 5008-5021.

- Raiborg, C., Bremnes, B., Mehlum, A., Gillooly, D.J., D'Arrigo, A., Stang, E. und Stenmark, H. (2001b). FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *J Cell Sci* 114, 2255-2263.
- Rapoport, I., Chen, Y.C., Cupers, P., Shoelson, S.E. und Kirchhausen, T. (1998). Dileucine-based sorting signals bind to the beta chain of AP-1 at a site distinct and regulated differently from the tyrosine-based motif-binding site. *Embo J* 17, 2148-2155.
- Reusch, U., Bernhard, O., Koszinowski, U. und Schu, P. (2002). AP-1A and AP-3A lysosomal sorting functions. *Traffic* 3, 752-761.
- Ricotta, D., Conner, S.D., Schmid, S.L., von Figura, K. und Höning, S. (2002). Phosphorylation of the AP2 mu subunit by AAK1 mediates high affinity binding to membrane protein sorting signals. *J Cell Biol* 156, 791-795.
- Ricotta, D., Hansen, J., Preiss, C., Teichert, D. und Höning, S. (2008). Characterization of a protein phosphatase 2A holoenzyme that dephosphorylates the clathrin adaptors AP-1 and AP-2. *J Biol Chem* 283, 5510-5517.
- Riel, C. (2004).  $\sigma$ 1-adaptin - the Small Subunit of the Clathrin Adaptor Complex AP-1, Georg-August-Universität, Göttingen.
- Robinson, M.S. und Bonifacino, J.S. (2001). Adaptor-related proteins. *Curr Opin Cell Biol* 13, 444-453.
- Rohrer, J., Schweizer, A., Russell, D. und Kornfeld, S. (1996). The targeting of Lamp1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosine sorting motif relative to the membrane. *J Cell Biol* 132, 565-576.
- Rosen, E.D. und MacDougald, O.A. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 885-896.
- Rosen, E.D. und Spiegelman, B.M. (2000). Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 145-171.
- Ross, S.E., Erickson, R.L., Gerin, I., DeRose, P.M., Bajnok, L., Longo, K.A., Misek, D.E., Kuick, R., Hanash, S.M., Atkins, K.B., Andresen, S.M., Nebb, H.I., Madsen, L., Kristiansen, K. und MacDougald, O.A. (2002). Microarray analyses during adipogenesis: understanding the effects of Wnt signaling on adipogenesis and the roles of liver X receptor alpha in adipocyte metabolism. *Mol Cell Biol* 22, 5989-5999.
- Ross, S.E., Hemati, N., Longo, K.A., Bennett, C.N., Lucas, P.C., Erickson, R.L. und MacDougald, O.A. (2000). Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* 289, 950-953.
- Royle, S.J., Bright, N.A. und Lagnado, L. (2005). Clathrin is required for the function of the mitotic spindle. *Nature* 434, 1152-1157.

Sachse, M., Strous, G.J. und Klumperman, J. (2004). ATPase-deficient hVPS4 impairs formation of internal endosomal vesicles and stabilizes bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles. *J Cell Sci* 117, 1699-1708.

Saint-Pol, A., Yelamos, B., Amessou, M., Mills, I.G., Dugast, M., Tenza, D., Schu, P., Antony, C., McMahon, H.T., Lamaze, C. und Johannes, L. (2004). Clathrin adaptor epsinR is required for retrograde sorting on early endosomal membranes. *Dev Cell* 6, 525-538.

Scavo, L.M., Karas, M., Murray, M. und Leroith, D. (2004). Insulin-like growth factor-I stimulates both cell growth and lipogenesis during differentiation of human mesenchymal stem cells into adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 3543-3553.

Schledzewski, K., Brinkmann, H. und Mendel, R.R. (1999). Phylogenetic analysis of components of the eukaryotic vesicle transport system reveals a common origin of adaptor protein complexes 1, 2, and 3 and the F subcomplex of the coatomer COPI. *J Mol Evol* 48, 770-778.

Schu, P. (2001). Vesicular protein transport. *Pharmacogenomics J* 1, 262-271.

Schu, P. (2005). Adaptor Proteins in Lysosomal Biogenesis. In: *Lysosomes*, ed. P. Saftig.

Shi, J. und Kandror, K.V. (2005). Sortilin is essential and sufficient for the formation of Glut4 storage vesicles in 3T3-L1 adipocytes. *Dev Cell* 9, 99-108.

Shi, J. und Kandror, K.V. (2007). The luminal Vps10p domain of sortilin plays the predominant role in targeting to insulin-responsive Glut4-containing vesicles. *J Biol Chem* 282, 9008-9016.

Shin, N., Ahn, N., Chang-Ileto, B., Park, J., Takei, K., Ahn, S.G., Kim, S.A., Di Paolo, G. und Chang, S. (2008). SNX9 regulates tubular invagination of the plasma membrane through interaction with actin cytoskeleton and dynamin 2. *J Cell Sci* 121, 1252-1263.

Shinotsuka, C., Yoshida, Y., Kawamoto, K., Takatsu, H. und Nakayama, K. (2002). Overexpression of an ADP-ribosylation factor-guanine nucleotide exchange factor, BIG2, uncouples brefeldin A-induced adaptor protein-1 coat dissociation and membrane tubulation. *J Biol Chem* 277, 9468-9473.

Sigismund, S., Woelk, T., Puri, C., Maspero, E., Tacchetti, C., Transidico, P., Di Fiore, P.P. und Polo, S. (2005). Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2760-2765.

Simmen, T., Höning, S., Icking, A., Tikkanen, R. und Hunziker, W. (2002). AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells. *Nat Cell Biol* 4, 154-159.

- Simpson, F., Bright, N.A., West, M.A., Newman, L.S., Darnell, R.B. und Robinson, M.S. (1996). A novel adaptor-related protein complex. *J Cell Biol* 133, 749-760.
- Simpson, F., Peden, A.A., Christopoulou, L. und Robinson, M.S. (1997). Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3. *J Cell Biol* 137, 835-845.
- Smas, C.M., Chen, L. und Sul, H.S. (1997). Cleavage of membrane-associated pref-1 generates a soluble inhibitor of adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 17, 977-988.
- Smith, P.J., Wise, L.S., Berkowitz, R., Wan, C. und Rubin, C.S. (1988). Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 263, 9402-9408.
- Sosa, M.A., Schmidt, B., von Figura, K. und Hille-Rehfeld, A. (1993). In vitro binding of plasma membrane-coated vesicle adaptors to the cytoplasmic domain of lysosomal acid phosphatase. *J Biol Chem* 268, 12537-12543.
- Spassky, N., Goujet-Zalc, C., Parmantier, E., Olivier, C., Martinez, S., Ivanova, A., Ikenaka, K., Macklin, W., Cerruti, I., Zalc, B. und Thomas, J.L. (1998). Multiple restricted origin of oligodendrocytes. *J Neurosci* 18, 8331-8343.
- Stanford, W.L., Cohn, J.B. und Cordes, S.P. (2001). Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. *Nat Rev Genet* 2, 756-768.
- Stenmark, H., Vitale, G., Ullrich, O. und Zerial, M. (1995). Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion. *Cell* 83, 423-432.
- Sugimoto, H., Sugahara, M., Folsch, H., Koide, Y., Nakatsu, F., Tanaka, N., Nishimura, T., Furukawa, M., Mullins, C., Nakamura, N., Mellman, I. und Ohno, H. (2002). Differential recognition of tyrosine-based basolateral signals by AP-1B subunit mu1B in polarized epithelial cells. *Mol Biol Cell* 13, 2374-2382.
- Takatsu, H., Futatsumori, M., Yoshino, K., Yoshida, Y., Shin, H.W. und Nakayama, K. (2001). Similar subunit interactions contribute to assembly of clathrin adaptor complexes and COPI complex: analysis using yeast three-hybrid system. *Biochem Biophys Res Commun* 284, 1083-1089.
- Takatsu, H., Sakurai, M., Shin, H.W., Murakami, K. und Nakayama, K. (1998). Identification and characterization of novel clathrin adaptor-related proteins. *J Biol Chem* 273, 24693-24700.



Tang, Q.Q., Otto, T.C. und Lane, M.D. (2004). Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 9607-9611.

Tarpey, P.S., Stevens, C., Teague, J., Edkins, S., O'Meara, S., Avis, T., Barthorpe, S., Buck, G., Butler, A., Cole, J., Dicks, E., Gray, K., Halliday, K., Harrison, R., Hills, K., Hinton, J., Jones, D., Menzies, A., Mironenko, T., Perry, J., Raine, K., Richardson, D., Shepherd, R., Small, A., Tofts, C., Varian, J., West, S., Widaa, S., Yates, A., Catford, R., Butler, J., Mallya, U., Moon, J., Luo, Y., Dorkins, H., Thompson, D., Easton, D.F., Wooster, R., Bobrow, M., Carpenter, N., Simensen, R.J., Schwartz, C.E., Stevenson, R.E., Turner, G., Partington, M., Gecz, J., Stratton, M.R., Futreal, P.A. und Raymond, F.L. (2006). Mutations in the gene encoding the Sigma 2 subunit of the adaptor protein 1 complex, AP1S2, cause X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* *79*, 1119-1124.

ter Haar, E., Musacchio, A., Harrison, S.C. und Kirchhausen, T. (1998). Atomic structure of clathrin: a beta propeller terminal domain joins an alpha zigzag linker. *Cell* *95*, 563-573.

Tontonoz, P., Hu, E. und Spiegelman, B.M. (1994). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* *79*, 1147-1156.

Umeda, A., Meyerholz, A. und Ungewickell, E. (2000). Identification of the universal cofactor (auxilin 2) in clathrin coat dissociation. *Eur J Cell Biol* *79*, 336-342.

Waguri, S., Dewitte, F., Le Borgne, R., Rouille, Y., Uchiyama, Y., Dubremetz, J.F. und Hoflack, B. (2003). Visualization of TGN to endosome trafficking through fluorescently labeled MPR and AP-1 in living cells. *Mol Biol Cell* *14*, 142-155.

Wan, L., Molloy, S.S., Thomas, L., Liu, G., Xiang, Y., Rybak, S.L. und Thomas, G. (1998). PACS-1 defines a novel gene family of cytosolic sorting proteins required for trans-Golgi network localization. *Cell* *94*, 205-216.

Wang, J., Sun, H.Q., Macia, E., Kirchhausen, T., Watson, H., Bonifacino, J.S. und Yin, H.L. (2007). PI4P promotes the recruitment of the GGA adaptor proteins to the trans-Golgi network and regulates their recognition of the ubiquitin sorting signal. *Mol Biol Cell* *18*, 2646-2655.

Wang, Y.J., Wang, J., Sun, H.Q., Martinez, M., Sun, Y.X., Macia, E., Kirchhausen, T., Albanesi, J.P., Roth, M.G. und Yin, H.L. (2003). Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. *Cell* *114*, 299-310.

Wilde, A. und Brodsky, F.M. (1996). In vivo phosphorylation of adaptors regulates their interaction with clathrin. *J Cell Biol* *135*, 635-645.

---

Willnow, T.E., Petersen, C.M. und Nykjaer, A. (2008). VPS10P-domain receptors - regulators of neuronal viability and function. *Nat Rev Neurosci* 9, 899-909.

Wu, X., Zhao, X., Puertollano, R., Bonifacino, J.S., Eisenberg, E. und Greene, L.E. (2003). Adaptor and clathrin exchange at the plasma membrane and trans-Golgi network. *Mol Biol Cell* 14, 516-528.

Yeung, B.G., Phan, H.L. und Payne, G.S. (1999). Adaptor complex-independent clathrin function in yeast. *Mol Biol Cell* 10, 3643-3659.

Zhu, Y., Doray, B., Poussu, A., Lehto, V.P. und Kornfeld, S. (2001). Binding of GGA2 to the lysosomal enzyme sorting motif of the mannose 6-phosphate receptor. *Science* 292, 1716-1718.

Zizioli, D., Meyer, C., Guhde, G., Saftig, P., von Figura, K. und Schu, P. (1999). Early embryonic death of mice deficient in gamma-adaptin. *J Biol Chem* 274, 5385-5390.

