



UNIVERSITÄT
DES
SAARLANDES

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Universität des Saarlandes

Charakterisierung der *Lphn2*- und *Lphn3*-Expression in genetisch veränderten Reporter-Mäusen

vorgelegt von

Simon Zaffalon

Aus dem Bereich Theoretische Medizin und Biowissenschaften
an der medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg Saar

2023

Zusammenfassung

Diese Arbeit widmet sich der Kartierung extraneuronaler Gewebe bezüglich ihrer *Lphn*-Expression. Die Latrophiline (kurz: *Lphn*), die im Zusammenhang mit dem Gift der schwarzen Witwe (*Latrodectus mactans*) entdeckt wurden, zählen zur Subfamilie der aGPCR [18]. Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (kurz: GPCR) im Allgemeinen stellen eine der größten bekannten Rezeptorklassen dar und haben auf vielfältige Arten Bedeutung als Rezeptoren für Neurotransmitter, Hormone und Cytokine [33]. Dadurch dienen die GPCR mittlerweile als Ziel für 60% der Pharmakotherapie [46]. Unter den GPCR gibt es jedoch einige wenig erforschte Vertreter, die man Waisen-GPCR (engl.: *orphan-GPCR*) nennt. Vertreter dieser Waisen-GPCR sind die Latrophiline. Diese wurden in ersten Arbeiten vor allem in neuronalem Gewebe erforscht, da man einen Zusammenhang zwischen dem Nervengift α -Latrotoxin und den Latrophilinen erkannte [20]. In Folgearbeiten konnte für die *Lphn* durchaus eine klinische Relevanz über die der Neurotransmission hinaus aufgezeigt werden. Beispielsweise wird *Lphn2* mit pulmonalen Erkrankungen wie chronische Bronchitis (kurz: COPD, engl.: *chronic obstructive pulmonary disease*) [36] und dem Plattenepithelkarzinom der Lunge [56] sowie mit immunologischen Störungen wie Allgemeiner variabler Immundefekt (kurz: CVID, engl.: *common variable immunodeficiency*) und juveniler idiopathischer Arthritis [31] in Verbindung gebracht. Für *Lphn3* konnte darüber hinaus ein Zusammenhang mit Erkrankungen wie Asthma bronchiale [15] [34], dem pulmonalen Adenocarcinom [23] oder Diabetes mellitus [41] hergestellt werden.

Dies veranlasst uns zur genaueren Untersuchung der GPCR in extraneuronalen Geweben. Hierzu werden in dieser Arbeit die Latrophiline auf mehreren Ebenen der Molekülexpression beleuchtet. Als Ausgangsmaterial dienen Gewebe von genetisch modifizierten Reporter-mäusen, deren *Lphn*-Gene mittels LoxP/FRT-Sequenzen (engl.: *locus of X-over*

P1/ flippase recognition target) flankiert sind. Im ersten Schritt werden die Desoxyribonukleinsäuren (kurz: DNS) dieser Mäuse mittels Polymerase-Kettenreaktion (kurz: PCR, engl.: *polymerase chain reaction*) untersucht. Somit wird sichergestellt, dass diese homo- oder heterozygote Erbträger der genetischen Modifikation sind. Dies ist wichtig, da es keine etablierten Antikörper gegen die Latrophiline selbst, sondern lediglich gegen an *Lphn* angeheftete Markermoleküle gibt. Im nächsten Schritt wird der Nachweis auf transkriptioneller Ebene geführt, indem mittels quantitativer Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (kurz: qRT-PCR, engl.: *reverse transcription polymerase chain reaction*) mehrere Gewebe der modifizierten Mäuse gescreent werden. So gelingt die Identifikation großer *Lphn2*-Transkriptmengen in den Geweben Herz, Leber, Niere, Gehirn, Retina, Rückenmark und Zunge. Darüber hinaus sind in den Geweben der Retina, Niere, Lunge und des Rückenmarks große *Lphn3*-Transkriptmengen zu finden. Daraufhin erfolgt in ausgewählten Geweben der qualitative Nachweis der *Lphn* im Immunoblot. Hier können wir die Lokalisation von *Lphn2* in Hirn-, Leber-, Nieren- und Zungengewebe und jene von *Lphn3* in Hirn- und Lungengewebe bestätigen [5]. Neu und demnach nicht vorbeschrieben ist die Präsenz von *Lphn2* in der Zunge [18]. Aufgrund dessen führen wir im Rahmen dieser Arbeit explorativ histologische Untersuchungen an Zungengewebe von *Lphn2-mVenus* positiven und *Lphn2-mVenus* negativen Mäusen durch. Hier zeigen sich positive Signale in der Immunhistochemie an der Basis der *Papillae filiformis* von *Lphn2-mVenus* positiven Mäusen, nicht jedoch an den Proben der *Lphn2-mVenus* negativen Kontrollgruppen. Somit gelingt der Nachweis von *Lphn2* im basalen Bereich der Fadenpapillen der Zunge.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen ergeben sich somit zusätzliche Möglichkeiten zur weiterführenden Erforschung der *Lphn*. Zum einen geht aus Arbeiten an *Drosophila melanogaster* hervor, dass *dCIRL* (der Vertreter der *Lphn* in *Drosophila melanogaster*) in Zusammenhang mit der sensomechanischen Kopplung steht [44] [14]. Aufgrund der Funktion der Papillae filiformis als Sinnesorgan für taktile Reize [12] [33] [45] könnte somit *Lphn2* als Rezeptor der sensomechanischen Reizweiterleitung in weiteren Arbeiten diskutiert werden. Ebenfalls interessant wäre diese Methoden auf andere Organsysteme mit sensomotorischer Komponente wie Nieren, Gefäßsystem, Leber oder Herz [45] [33] zu erweitern. Zum anderen eröffnen sich mit Hilfe der durch diese Arbeit erfolgte *Lphn*-

Kartierung und der Erkenntnisse über Dysregulationen im Rahmen von Erkrankungen neue Forschungsansätze. In Anbetracht des oben beschriebenen pharmakologischen Potentials der GPCR [46] wäre eine weiterführende Untersuchung der *Lphn* interessant für die Entwicklung pharmakologischer Interventionen. Des Weiteren ergibt sich aufbauend auf den Ergebnissen aus dem qRT-PCR-*Screening* auf alle putativen Spleißvarianten der *Lphn* die Notwendigkeit zur Untersuchung spezifischer *Lphn*-Varianten. Mithilfe spezifischer Assays für die Gene dieser Varianten wäre es möglich, die *Lphn* und deren Sybtypen genauer zu untersuchen. Letzlich ist es notwendig, mit Hilfe verbesserter Nachweismethoden die Lokalisation von *Lphn2* genauer zu definieren. Aufgrund des limitierten Auflösungsvermögens der in dieser Arbeit verwendeten Immunhistochemie ist es erforderlich, mit Hilfe von Spezialmikroskopen und Filtern Untersuchungen via Immunfluoreszenz an der Basis der *Papillae filiformis* durchzuführen.

Insgesamt betrachtet ergibt sich aus den Erkenntnissen dieser Arbeit ein besseres Verständnis für die *Lphn* und erleichtert somit die weiterführende Erforschung ihrer Funktion, ihrer Rolle in physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen, ihres Zusammenhangs mit Erkrankungen und ihres Potentials als Ziel pharmakologischer Interventionen.

Abstract

The aim of our research was to map out the *Lphn* content of extraneuronal tissues. The *Lphn* were discovered in studies about α -latrotoxin, the poison of the black widow spider (*Latrodectus mactans*) and are part of the aGPCR subfamily [19]. In general the GPCR family is one of the most widespread receptors in nature and has multiple functions as receptors for neurotransmitters, hormones and cytokines [33]. In addition, they are the target for nearly 60% of pharmacological interventions [46]. But there are also some poorly understood GPCRs called orphan GPCRs. Some of these orphan receptors are the *Lphns*. These were mainly studied in neuronal tissue, because of the interaction with the neurotoxin of *Latrodectus mactans* [20]. Subsequent studies put *Lphn2* into context with diseases of the lung, e.g., COPD [36], squamous cell carcinoma [56] and immunological disorders like common variable immunodeficiency (CVID) or juvenile idiopathic arthritis (JIA) [31]. *Lphn3* could be associated with bronchial asthma [15] [34], adenocarcinoma of the lung [23] and diabetes mellitus [41]. Thus, the study of *Lphns* in extraneuronal tissues is appropriate. To achieve this we investigate the *Lphns* on all levels of molecular expression. First, we analyzed the DNA of genetic modified reporter mice. Due to a lack of established antibodies for *Lphns*, the modification through GFP/HA-tagging had to be ensured. In a second step, the transcriptionlevel of *Lphn* in the selected tissues had to be confirmed by qRT-PCR. In the case of *Lphn2* we found large quantities in the tissues of heart, liver, kidney, brain, retina, spinal cord and tongue. In the case of *Lphn3* we discovered high transcriptlevels in kidney, spinal cord, retina, brain and lung. In addition, immunoblotting has been used to confirm the presence of *Lphn2*. In this case, we could confirm the presence of *Lphn2* in brain, liver, kidney and *Lphn3* in brain and lung [5]. As the appearance of *Lphn2* in tongue was not described in previous studies [18] we decided to explore the tissue of the tongue by histological examination via immunohisto-

chemistry. In those studies we confirmed the presence of *Lphn2* protein at the basis of the *papillae filiformis* of the tongue.

The function of *Lphn2* in this case as a part of the mechanosensory transmission of haptic stimulation is up to further investigation. Studies in *Drosophila melanogaster* have demonstrated an involvement of dCIRL, the *Drosophila melanogaster* homolog of *Lphn* as a potential mechanosensor [44] [14]. It would also be interesting to apply these methods to other organ systems with sensorimotor components such as the kidneys, vascular system, liver or heart [45] [33]. Furthermore by using the mapping of *Lphn* and the knowledge about dysregulations in the context of diseases, new research approaches open up. Considering the pharmacological potential of the GPCR described above [46], further investigation of the *Lphn* would be of interest for the development of pharmacological interventions. Moreover, based on the results of the screening via qRT-PCR on all possible splice variants of the *Lphn* it is necessary to investigate specific variants of the *Lphn*. By using specific assays of these variants, it would be possible to study the *Lphn* and their subtypes in more detail. At last, the localisation of *Lphn2* needs to be defined more precisely by utilising improved detection methods. Due to the limited resolution of the immunohistochemistry used in this work, it is essential to carry out further investigations via immunofluorescence analysis at the base of the *papillae filiformis* using special microscopes and filters.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	G-Protein gekoppelte Rezeptoren	1
1.1.1	Allgemeiner Aufbau G-Protein gekoppelter Rezeptoren	1
1.1.2	Funktionsweise G-Protein gekoppelter Rezeptoren	3
1.1.3	Bedeutung G-Protein gekoppelter Rezeptoren	5
1.1.4	”Waisenkinder” unter den GPCR	9
1.2	Latrophiline	10
1.2.1	Aufbau der Latrophiline	10
1.2.2	Chronik der Latrophiline	12
1.2.3	Bedeutung der Latrophiline	15
1.3	Anatomie und Physiologie der Zunge	17
1.3.1	Makroskopischer Aufbau der Zunge	17
1.3.2	Mikroskopischer Aufbau der Zunge	18
1.3.3	Physiologie der Zunge	18
2	Material und Methodik	20
2.1	Material	20
2.1.1	Verbrauchsmaterialien	20
2.1.2	Geräte	21
2.1.3	Chemikalien	22
2.1.4	Puffer und Lösungen	23
2.1.5	Antikörper	26
2.1.6	Enzyme	26
2.1.7	Oligonukleotid-Startermoleküle und DNA Sonden	27
2.1.8	Mausstämme und Mäuse	28
2.2	Methoden	29
2.2.1	Genotypisierung	29
2.2.2	Nachweis ribonukleärer Transkriptmengen	32
2.2.3	Proteinanalytik	35
2.2.4	Histologische Untersuchung	39
3	Ergebnisse	42
3.1	Klassifikation der Reporter-Mäuse	42
3.1.1	Mauslinie zur Untersuchung der <i>Lphn2</i> -Expression	42
3.1.2	Mauslinie zur Untersuchung der <i>Lphn3</i> -Expression	43
3.2	Untersuchung des <i>Lphn2</i> - und <i>Lphn3</i> -mRNA-Gehaltes	45
3.2.1	Relative Quantifizierung der <i>Lphn1</i> -Transkriptmengen	45
3.2.2	Relative Quantifizierung der <i>Lphn2</i> -Transkriptmengen	46

3.2.3	Relative Quantifizierung der <i>Lphn3</i> -Transkriptmengen	49
3.3	Proteinanalytik von <i>Lphn2</i> und <i>Lphn3</i>	52
3.3.1	<i>Lphn2</i> -Expression unterschiedlicher Gewebe	53
3.3.2	Etablierung des HA-Antikörpers zur <i>Lphn3</i> -Detektion	55
3.3.3	<i>Lphn3</i> -Expression unterschiedlicher Gewebe	57
3.4	Histologischer Nachweis <i>Lphn2</i>	58
4	Diskussion	60
4.1	Bedeutung der Auswahl geeigneter Primerpaare	60
4.2	Etablierung des HA-Antikörpers zum Nachweis von <i>Lphn3</i>	63
4.3	Vergleich Immunhistochemie und Immunfluoreszenz als Nachweismethode der <i>Lphn2-mVenus</i> -Fusionsproteine	65
4.4	Folgearbeit zur Beurteilung der Funktion von <i>Lphn2</i> als Mechanosensoren	66
4.5	Bewertung der Ergebnisse dieser Arbeit in Bezug auf ihre potentielle Be- deutung für die gegenwärtige Forschung	67
	Literaturverzeichnis	69
	Abbildungsverzeichnis	I
A	Publikation und Dank	III
A.1	Publikation	III
B	Dank	VIII
C	Lebenslauf	IX

Abkürzungsverzeichnis

α -LTX	engl.: <i>alpha-latrotoxin</i>
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADGRL 1-3	Adhesion G-Protein-Coupled Receptor Latrophilin 1-3
ATP	Adenosintriphosphat
aGPCR	Adhesion G-Protein-Coupled Receptor
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
ASS	Autismus-Spektrum-Störung
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCDS	engl.: <i>consensus coding sequence</i>
CIRL	Calcium Independent Receptor of α -Latrotoxin
Cre	engl.: <i>cyclization recombination</i>
CREb	engl.: <i>cAMP responsive element binding protein</i>
CRF	engl.: <i>corticotrophin-releasing factor receptor</i>
COPD	engl.: <i>chronic obstructive pulmonal disease</i>
CVID	engl.: <i>Common Variable Immunodeficiency</i>)
DAG	Diacylglycerol
Dlga	Drosophila disc large tumor suppressor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
GAIN	GPCR-autoproteolyseinduzierend
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	engl.: <i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP	Green Flourescent Protein
GHRH	<i>Growth-Hormon-Releasing-Hormon</i>
G _i	inhibierendes G-Protein
GnRH	Gonadotropin <i>Releasing-Hormon</i>
GPCR	Guaninnukleotid-bindendes-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GPS	G-Protein-gekoppelte proteolytische Seite
G _q	Phospholipase-C-sensitives G-Protein
G _s	stimulierendes G-Protein
GTP	Guanosintriphosphat

H ₂ O dd	doppelt destilliertes Wasser
HA	Hämagglutinin
IF	Immunfluoreszenz
IP ₃	Inositoltriphosphat
IHC	Immunhistochemie
FRT	Flippae recombinase target
Flp	Flippase
FSH	follikelstimulierendes Hormon
LH	Luteinisierendes Hormon
loxP	engl.: <i>locus of X-over P1</i>
Lphn	Latrophilin
mRNA	engl.: <i>messenger RNA</i>
N/A	nicht angegeben, engl.: not available
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NRXN	Neurexin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase-chain-reaktion</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PP _i	Phosphatidylinositolphosphat
PIP ₂	Phosphatidylinositolbisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PNS	Peripheres Nervensystem
PSD95	engl.: <i>postsynaptic density protein</i>
PTH	Parathormon
PThrP	Parathormon <i>related hormon</i>
qRT-PCR	quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion: (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulfate
TEN	Teneurin
TSH	thyreodeastimulierendes Hormon
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO-1	zonula occludens-1 protein

1 Einleitung

1.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

1.1.1 Allgemeiner Aufbau G-Protein gekoppelter Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (engl.: G-protein-coupled-receptor; Abk.: GPCR) sind Proteine, die in der Regel als Membranrezeptoren fungieren [33]. Zur Zellverankerung besitzen sie sieben helikale Transmembrandomänen, die die Zellmembran von extrazellulär intrazellulär durchspannen. Extrazellulär befindet sich ein N-terminaler und intrazellulär ein C-terminaler Rest [46]. Abb. 1.1 zeigt exemplarisch den allgemeinen Aufbau eines GPCR mit intra- und extrazellulärer Domäne, die mittels sieben transmembranärer Untereinheiten miteinander verbunden sind. Je nach Funktion unterscheiden sich die unterschiedlichen GPCR bezüglich ihrer Größe und des Aufbaus des extrazellulären Aminosäurerestes, um durch Konformationsänderung als Ziel unterschiedlicher Liganden zu fungieren [6]. Zwischen den transmembranären Domänen befinden sich jeweils drei intra- und extrazelluläre Schleifen. Zur Signalweiterleitung ist an die intrazelluläre Schleife zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne ein in der Membran verankertes heterotrimäres Guaninnucleotid-bindendes-Protein gekoppelt [33]. Die G-Proteine sind GTP-hydrolysierende Proteine, die aus einer α -, β - und γ -Untereinheit aufgebaut sind, wobei die α -Domäne mit dem GTP- bzw. GDP-Molekül verbunden ist. Die größte der drei Domänen ist die α -Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 40-50 kDa. Die beiden kleineren β - und γ - Untereinheiten besitzen ein Molekulargewicht von 35 kDa und 8 kDa [6].

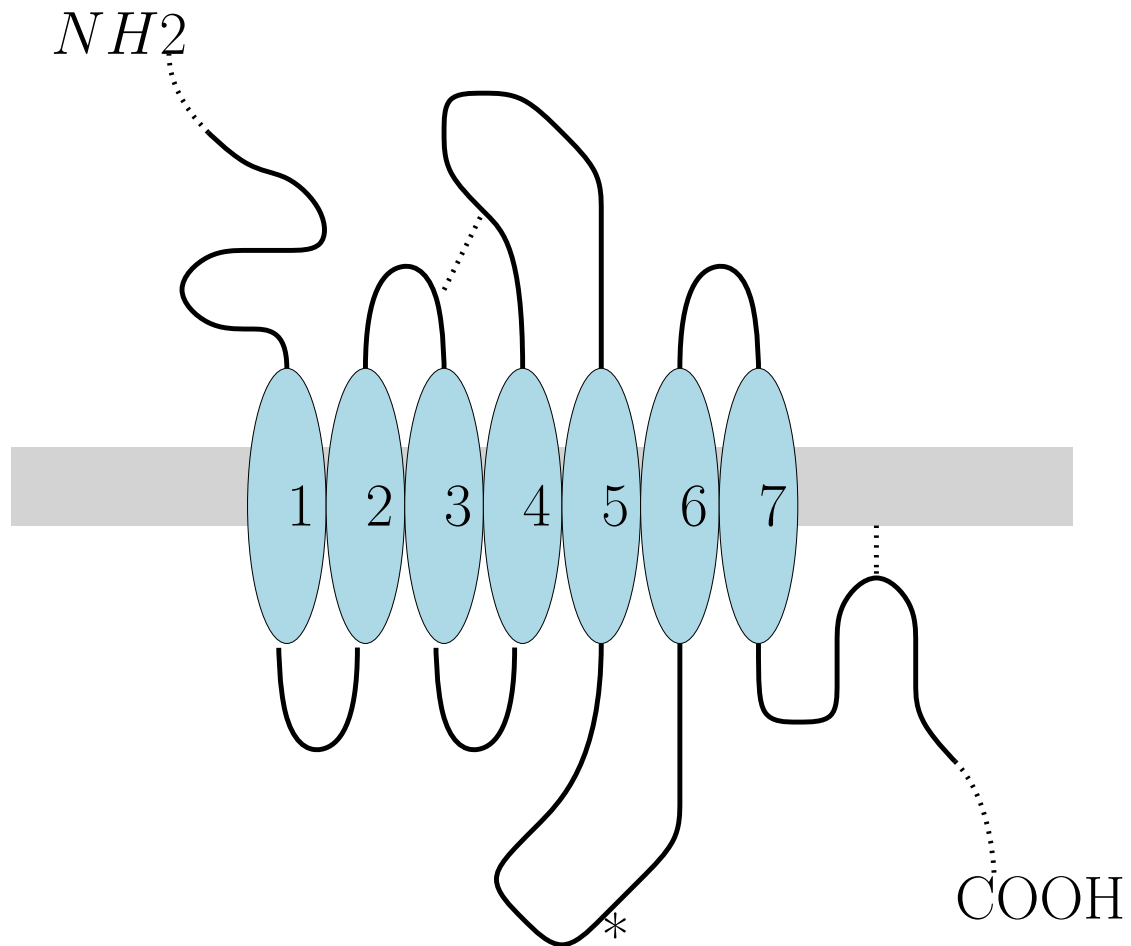


Abb. 1.1: Aufbau eines typischen G-Protein gekoppelten Rezeptors. Ansicht von lateral: Extrazellulärer N-terminaler Rest (NH₂), 7-fach membrangängigen Ligandenbindungen und intrazellulärer C-terminaler Rest (COOH). An der intrazellulären Schleife(*) zwischen der 5. und 6. Transmembrandomäne ist das G-Protein gekoppelt. Die Schleifen sind häufig untereinander oder mit der Zellmembran kovalent verbunden (hier exemplarisch mittels gestrichelter Linien gekennzeichnet).

1.1.2 Funktionsweise G-Protein gekoppelter Rezeptoren

Die Bindung an die unterschiedlichen GPCR ist spezifisch, aber die daraus resultierende Reaktion ist vielfältig. Entscheidend für die Wirkungsweise des GPCR ist die Konfiguration der GTP-Molekül-bindenden α -Untereinheit. So entfalten die α_s - und α_q -Untereinheit einen stimulierenden, die α_i - und α_o -Untereinheit einen inhibierenden Effekt [24]. Im inaktiven Zustand ist an die entsprechende α -Untereinheit ein GDP-Molekül gebunden. Nach Bindung eines Liganden an das extrazelluläre N-terminale Ende wird durch eine Konformationsänderung das intrazelluläre GDP-Molekül durch GTP ausgetauscht. Somit wechselt der GPCR in den aktiven Zustand, indem das trimere G-Protein in eine monomere α -Untereinheit und in eine dimere $\beta\gamma$ -Untereinheit zerfällt. Diese Untereinheiten aktivieren dann jeweils weitere Effektorproteine, wie die Adenylatcyclase oder die Phospholipase C [33]. Dadurch werden intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst. Im Falle der Adenylatcyclaseaktivierung wird ATP (Adenosintriphosphat) zu cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) umgewandelt. cAMP dient als Botenstoff zur Aktivierung der phosphorylierenden Proteinkinase A, welche wiederum den Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP responsive element binding protein*) aktivieren kann. CREB stimuliert letztendlich Prozesse auf Nukleinsäureebene und löst damit Effekte auf zellulärer Ebene aus. Bei der Adenylatcyclaseinaktivierung wird cAMP zu AMP enzymatisch deaktiviert und der Prozess damit inhibiert. Im Falle der Phospholipase-C-Aktivierung wird über bestimmte Membranphospholipide (Phosphatidylinositolphosphaten) und IP₃ (Inositoltriphosphat) Ca²⁺ aus dem endoplasmatischen Retikulum freigesetzt. Die Konzentrationserhöhung von Ca²⁺ im Zytosol führt zusammen mit dem PIP₂-Spaltprodukt DAG (Diacylglycerol) zur Aktivierung von PKC (Proteinkinase C). PKC wiederum reguliert Transportproteine, dient der Vernetzung des Zytoskelettes und führt mittels Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zur schnellen Anpassung der Zelle an veränderte Umweltbedingungen über die sog. *early response genes*. Darüber hinaus fungiert Ca²⁺ als eigenständiger Signaltransduktor bei der Regulation der Hormonausschüttung, bei der Muskelkontraktion, bei der Aktivierung von Lymphozyten und der Initiierung der Apoptose [46]. Abbildung 1.2 zeigt einen exemplarischen Ablauf nach Aktivierung eines GPCR.

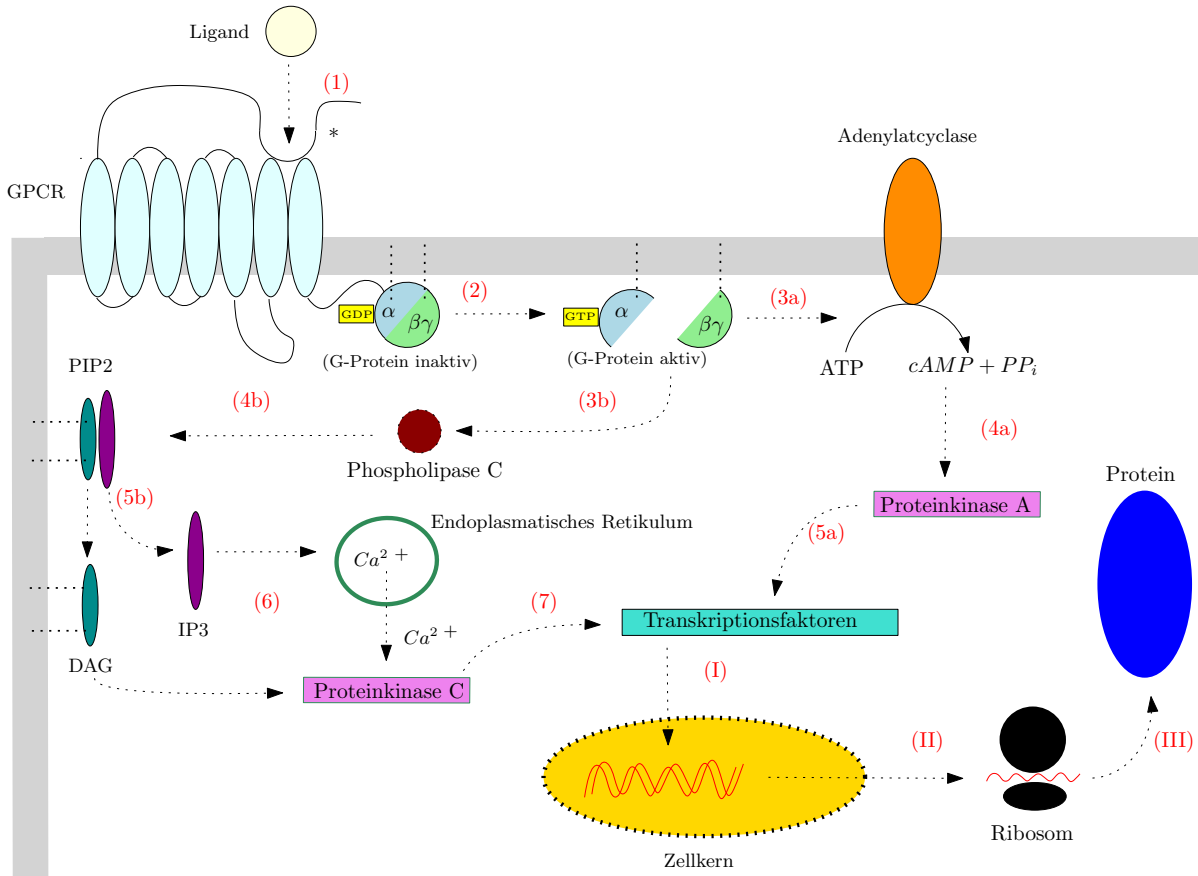


Abb. 1.2: Exemplarische Signalkaskaden nach Aktivierung eines GPCR. (1) Bindung eines Guaninnucleotid-austauschenden Faktors (GEF= engl.: *guanine nucleotide exchange factor*) an die extrazelluläre Ligandenbindungsstelle am N-Terminus des GPCR. (2) Austausch von GDP mit GTP, Aktivierung des G-Proteins und Dissoziation des G-Proteins in eine α und eine $\beta\gamma$ -Untereinheit. (3a) **Adenylatcyclaseweg:** Aktivierung der Adenylatcyclase durch die aktive $\beta\gamma$ -Untereinheit und Spaltung von ATP in cAMP und PP_i . (4a) Aktivierung der Proteinkinase A durch cAMP. (5a) Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch die Proteinkinase A. (3b) **Phospholipase-C-Weg:** Aktivierung der Phospholipase C durch die aktive $\beta\gamma$ -Untereinheit. (4b) Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) durch Phospholipase C. (5b) Spaltung von PIP₂ in Inositol- (1,4,5)-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG). (6) Aktivierung der Proteinkinase C durch Diacylglycerin (DAG) Inositol- (1,4,5)-trisphosphat (IP₃) bzw. Ca^{2+} . (7) Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch Proteinkinase C. (I) Initiierung der Transkription durch Transkriptionsfaktoren. (II) Translation von mRNA durch Ribosomen (III) Posttranslationale Modifikation zum Zielprotein. Abbildung basiert auf inhaltlichem Konsens mehrerer Referenzen [24] [33] [46] [6]

Nach Dissoziation des Liganden vom GPCR wird das G-Protein vom aktiven in den inaktiven Zustand erneut mittels Konformationsänderung überführt. So ergeben sich aus der Kombination aus Liganden, aktivierenden bzw. inaktivierenden Untereinheiten

und unterschiedlichen Effektorproteine sehr unterschiedliche Wirkungen, die durch die GPCR verursacht werden können. Diese Vielfalt erklärt die weite Verbreitung dieser Rezeptorklasse.

1.1.3 Bedeutung G-Protein gekoppelter Rezeptoren

Unter den Zelloberflächenrezeptoren stellen die GPCR mit etwa 950 identifizierten Varianten die größte Rezeptorklasse dar [33]. Sie dienen der Signaltransduktion von Hormonen, Neurotransmittern und Cytokinen. Darüber hinaus können divalente Kationen, Lichtquanten, Geruchs- und Geschmacksstoffe als Liganden fungieren [33]. Tabelle 1.1 zeigt einen Überblick möglicher Liganden zur Regulation zellulärer Effekte via GPCR.

Ligand	G-Familie	Effekt
Katecholamine	G_s	Aktivierung der Adenylatcyclase
	G_i	Hemmung der Adenylatcyclase
	G_q	Aktivierung der Phospholipase C
Histamin	G_s	Aktivierung der Adenylatcyclase
	G_i	Hemmung der Adenylatcyclase
Glucagon	G_s	Aktivierung der Adenylatcyclase
LH	G_s	Aktivierung der Adenylatcyclase
FSH	G_s	Aktivierung der Adenylatcyclase
TSH	G_s	Aktivierung der Adenylatcyclase
Vasopressin	G_s	Aktivierung der Adenylatcyclase
Angiotensin	G_i	Hemmung der Adenylatcyclase
	G_q	Aktivierung der Phospholipase C
Bradykinin	G_q	Aktivierung der Phospholipase C
Somatostatin	G_i	Hemmung der Adenylatcyclase
Opiate	G_i	Hemmung der Adenylatcyclase
Prostaglandin E2	G_s	Aktivierung der Adenylatcyclase
Chemokine	G_i	Hemmung der Adenylatcyclase
Geruchsstoffe	G_s	Aktivierung der Adenylatcyclase
Geschmacksstoffe	G_i	Aktivierung der cGMP-Phosphodiesterase
Photonen, Opsin, Rhodopsin	G_i	Aktivierung der cGMP-Phosphodiesterase
Glutamat	G_i	Hemmung der Adenylatcyclase

Tab. 1.1: Auswahl möglicher Liganden der GPCR [33]. G_s = stimulierendes G-Protein, G_i = inhibierendes G-Protein, G_q = Phospholipase-C-sensitives G-Protein, LH= luteinisierendes Hormon, FSH= follikelstimulierendes Hormon, TSH= thyreostimulierendes Hormon, cGMP= cyclisches Guanosinmonophosphat

Die Vielfalt an Interaktionsmöglichkeiten macht die GPCR-Familie besonders interessant als Ziel für pharmakologische Interventionen. So wirken ca. 60% aller Arzneimittel über diese Rezeptorklasse [46]. Tabelle 1.2 zeigt eine Auswahl bereits etablierter Arzneistoffe, die an GPCRs ihre Wirkung entfalten.

Rezeptorklassen	Arzneistoffklassen	Vertreter
α -Adrenorezeptoren	α_1 -Rezeptoragonisten	Midodrin
	α_1 -Rezeptorantagonisten	Doxazosin Phenoxybenzamin
	α_2 -Rezeptoragonisten	Clonidin α -Methyldopa
β -Adrenorezeptoren	β_1 -Rezeptoragonisten	Isoprenalin
	β_2 -Rezeptoragonisten	Fenoterol Salbutamol
	semiselektive β -Rezeptoragonisten	Orciprenalin
	selektive β_1 -Rezeptorantagonisten	Metoprolol Bisoprolol
	unselektive β -Rezeptorantagonisten	Propranolol
α und β Adrenorezeptoren	semiselektive β -Rezeptoragonisten	Adrenalin
	semiselektive α -Rezeptoragonisten	Noradrenalin
m-Cholinrezeptoren	unselektive Muskarinrezeptorantagonisten	Atropin Butylscopolamin Biperiden Ipratropium
	M ₃ Rezeptor-Antagonisten	Tiotropium
Dopaminrezeptoren	unselek. Dopaminrezeptoragonisten	L-Dopa
	D ₂ -Rezeptoragonisten	Apomorphin Bromocriptin Pramipexol Cabergolin
	D ₂ -Rezeptorantagonisten	Haloperidol Metoclopramid Domperidon
	D ₄ -Rezeptorantagonisten	Clozapin
Angiotensinrezeptoren	Angiotensin-II-rezeptorantagonisten	Candesartan Olmesartan Valsartan
Opioid-Rezeptoren	μ - und κ -Rezeptoragonisten	Morphin Tramadol Tilidin Pethidin Piritramid Fentanyl
	μ -Rezeptoragonisten	Buprenorphin
	μ -, κ und δ -Rezeptorantagonisten	Naloxon Naltrexon

Tab. 1.2: Auswahl pharmakologischer Interaktion mit GPCRs [24].

Außerdem sind eine Vielzahl von aktivierenden und inaktivierenden Mutationen identifiziert, die aufgrund der daraus resultierenden dysregulierten GPCRs zu Erkrankungen führen [46]. Tabelle 1.3 zeigt einen Überblick dieser Erkrankungen.

Rezeptor	Erkrankung	Vererbung
V ₂ Vasopressin (inaktivierend)	nephrogener Diabetes inspidus	X-chromosomal
TSH (inaktivierend)	familiäre Hypothyreose	autosomal-rezessiv
TSH (aktivierend)	nicht-autonome Hyperthyreose	keine (somatisch)
ACTH (inaktivierend)	familiäre ACTH-Resistenz	autosomal-rezessiv
GHRH (Inaktivierend)	familiäre Wachstumshormon-resistenz	autosomal-rezessiv
GnRH (inaktivierend)	hypogonadotroper Hypogonadismus	autosomal-rezessiv
GnRH (aktivierend)	familiäre weibliche Pubertas präcox	autosomal-dominant
FSH (inaktivierend)	hypergonadotrophe ovarielle Dysgenese	autosomal-rezessiv
LH (inaktivierend)	männlicher Pseudohermaphroditismus	autosomal-rezessiv
LH (aktivierend)	familiäre männliche Pubertas präcox	autosomal-dominant
Calcium-sensing (inaktivierend)	familiäre hyperkalziurische Hyperkalziämie	autosomal-rezessiv, autosomal-dominant
Calcium-sensing (aktivierend)	familiäre hypokalziämische Hyperkalzurie	autosomal-dominant
Melanocortin 4 (inaktivierend)	Adipositas	autosomal-rezessiv
PTH/PThrP (inaktiv.)	Bloomstrand-Chondrodysplasie	autosomal-rezessiv
PTH/PThrP (aktiv.)	Jansen-Chondrodysplasie	autosomal-dominant

Tab. 1.3: Auswahl von Erkrankungen durch Mutationen an GPCR [46]. LH= luteinisierendes Hormon, FSH= follikelstimulierendes Hormon, TSH= thyreostimulierendes Hormon, ACTH=Adrenocorticotropes Hormon, GHRH= *Growth-Hormon-Releasing-Hormon*, GnRH= Gonadotropin *Releasing-Hormon*, PTH= Parathormon, PThrP= Parathormon *related* Hormon

1.1.4 "Waisenkinder" unter den GPCR

Obwohl man im Laufe der Jahre einer Vielzahl der entdeckten GPCR eine Funktion zuweisen konnte, gibt es noch immer eine große Anzahl solcher Rezeptoren, deren Bedeutung unklar ist. Diese werden *orphan-receptors* (engl.: *orphan* = dt.: Waisen) genannt. Abbildung 1.3 zeigt einen Überblick des aktuellen Standes funktionell charakterisierter GPCR.

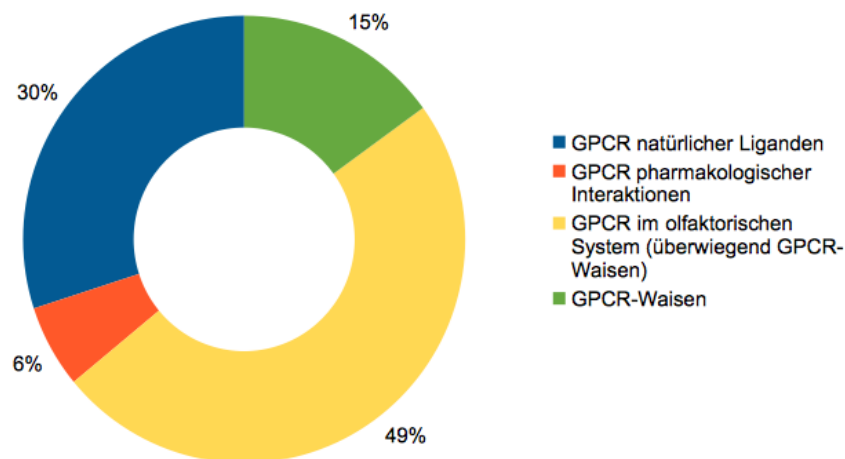


Abb. 1.3: Aktueller Stand der GPCR-Forschung im Überblick [49]. Grün: 15% aller GPCR gehören der Gruppe der GPCR unbekannter Funktion an. Gelb: 49% aller GPCR wurden in Zusammenhang der olfaktorischen Signalverarbeitung entdeckt, jedoch konnte vielen dieser GPCR noch keine eindeutige Funktion zugeordnet werden. Blau: 30% aller GPCR sind als Ziel natürlicher Liganden identifiziert. Orange: 6% aller GPCR werden zur pharmakologischen Interaktion genutzt.

Somit erschließt sich, dass viele der entdeckten GPCR der weiterführenden Forschung bedürfen, um deren Funktion zu identifizieren, ihren Zusammenhang mit Erkrankungen zu verstehen und sie gegebenenfalls als Zielstruktur für pharmakologische Interventionen zu nutzen. Eine der ersten teilweise entschlüsselten GPCR-Subfamilien war die der aGPCR [40]. So konnte *Lphn1* als calciumunabhängiger Rezeptor für das Gift von *Latrodectus mactans* identifiziert werden [11] [20] [17].

1.2 Latrophiline

Latrophiline (engl.: Latrophilins) sind Proteine der GPCR-Familie, wobei man 3 Vertreter dieser Gruppe unterscheidet: Latrophilin 1, 2 und 3 (*Lphn1-3*). Die Nomenklatur erklärt sich durch ihre Entdeckung im Zusammenhang mit dem α -Latrotoxin, dem Gift der schwarzen Witwe (*Latrodectus mactans*). Dieses Gift entfaltet seine Wirkung vor allem am peripheren Nervensystem, wodurch es innerhalb weniger Stunden zu Krämpfen und Muskelschmerzen kommt. Diese neuronalen Entladungen ergeben sich aus der Wirkung des α -Latrotoxin, das präsynaptisch calciumabhängige Calciumkanäle bzw. prä- und postsynaptisch calciumunabhängige GPCRs aktiviert. In älteren Arbeiten findet man die Bezeichnung CIRL (*Calcium Independent Receptor of α -Latrotoxin*, dt.: calciumunabhängige α -Latrotoxin-Rezeptoren). Diese Bezeichnung weist auf die unterschiedliche Wirkungsweise der Latrophiline im Vergleich zu den calcium-abhängigen α -Latrotoxin sensiblen Neurexinen (*NRXN*, engl.: neurexins) hin. Nach neuester Nomenklatur werden diese auch als *ADGRL 1-3* (*Adhesion G-Protein-Coupled Receptor Latrophilin 1-3*) bezeichnet [17], da diese strukturell sowohl den GPCR als auch den Zelladäsionsproteinen zugeordnet werden können [18] [20] [17].

1.2.1 Aufbau der Latrophiline

Latrophiline bestehen wie alle GPCR aus Transmembranproteinen, die mit 7 α -Helices die Zellmembran durchspannen und den extrazellulären N-Terminus mit dem intrazellulären C-Terminus verbinden. Außerdem werden sie zur Subklasse der Adhensions-GPCR (aGPCR; engl.: adhesion GPCR) gezählt [18]. Diese Gruppe von GPCR enthält zusätzlich intra- und extrazelluläre Domänen, die Protein-Protein-Interaktionen ermöglichen [18] [17]. Besonders charakteristisch für die aGPCR ist der bis zu 1000 Aminosäuren lange extrazelluläre Rest [21] [18] [47]. Im Gegensatz zu sonstigen GPCR, die lediglich mit Peptiden oder kleinen Molekülen interagieren können, ermöglicht dieser lange extrazelluläre N-Terminus Interaktionen mit größeren und sogar mehreren Molekülen [18]. Von apikal nach basal findet man die lectinähnliche, die olfactomedinähnliche, die serin-/threoninreiche und die hormonbindende Domäne. An der extrazellulären Basis des Latrophilin sitzt die sogenannte GPCR-autoproteolyseinduzierende Domäne

(GAIN-Domäne). Dieser Proteinbestandteil klassifiziert die aGPCR in Abgrenzung zu den anderen GPCR-Subklassen [18] [17]. Die GAIN-Domäne ist über eine weitere Proteinuntereinheit, die sogenannte G-Protein-gekoppelte proteolytische Seite (GPS), an der Zellmembran verankert. Am intrazellulären C-terminalen Ende befindet sich die PDZ-Domäne (benannt nach den ersten Buchstaben der Aminosäureketten, die alle PDZ-Domänen gemein haben: *postsynaptic density protein* (PSD95), *Drosophila disc large tumor suppressor* (DlgA) und *zonula occludens-1 protein* (ZO-1)) [39]. Abbildung 1.4 zeigt den schematischen Aufbau der *Lphn* [18].

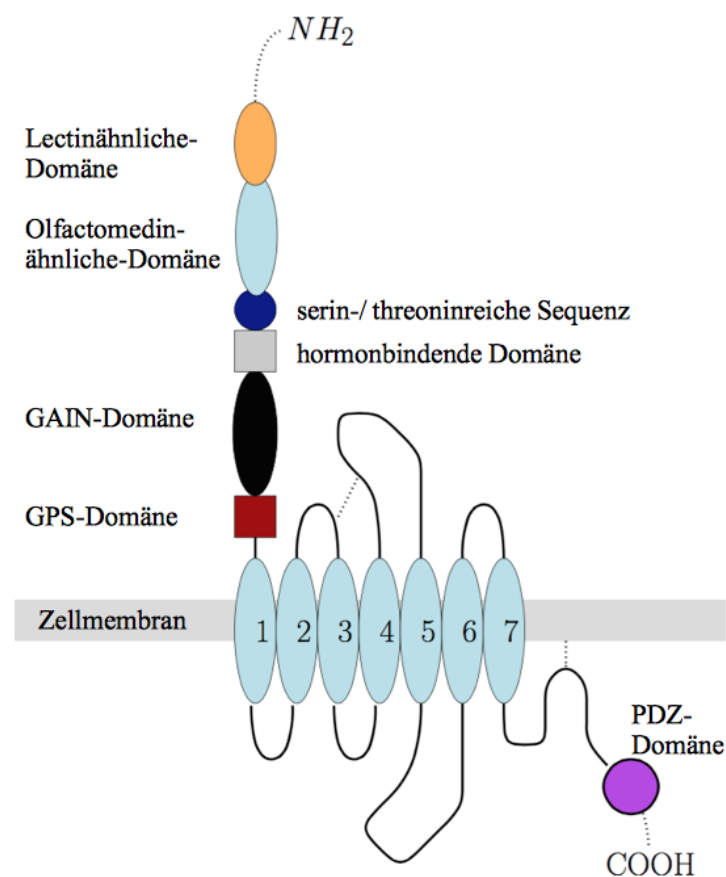


Abb. 1.4: Aufbau eines Latrophilinmoleküls. [17] NH_2 = Aminogruppe, COOH = Carboxylgruppe, GAIN-Domäne = GPCR-Autoproteolyseinduzierende Domäne, GPS-Domäne = G-Protein-gekoppelte Proteolytische Seite, PDZ-Domäne = PSD95 (postsynaptic density protein), DlgA (Drosophila disc large tumor suppressor), ZO-1 (zonula occludens-1 protein). 1-7 = sieben Transmembrandomänen.

Die unterschiedlichen Domänen des extrazellulären N-Terminus fungieren als Ligandenbindungsstellen verschiedener Bindungspartner. Im Folgenden sind exemplarisch eini-

ge dieser bekannten Funktionen der extrazellulären Domänen aufgeführt. So dient die lectinähnliche Domäne, die initial als Bindungspartner des seltenen Kohlenhydrats Rhamnose in Seeigeleiern entdeckt wurde, als Ligandenbindungsstelle für Transkriptionsfaktoren wie *TEN* (engl.: *teneurin*) [17] [47]. Die olfactomedinähnliche Domäne konnte als Interaktionspartner in *Lphn1* für *NRXN* (engl.: *neurexin*), eine Klasse präsynaptischer Zelladhensionsproteine [7] [17], identifiziert werden. In *Lphn2* und *Lphn3* bildet die olfactomedinähnliche Domäne gemeinsam mit FLRT3 (engl.: *fibronectin-like domain containing leucine rich transmembrane protein 3*) eine Ligandenbindungsstelle für TEN [32] [21] [17]. Die serin- bzw. threoninreiche-Sequenz scheint in Aufbau und Funktion noch weitestgehend unverstanden [17]. Die hormonbindende-Domäne, die Ähnlichkeit zum CRF-Rezeptor (engl.: *corticotrophin-releasing factor receptor*) hat, dient der Signaltransduktion nach Aktivierung durch Polypeptide und Hormone [19] [17]. Die aus einer C- sowie N-terminalen Untereinheit bestehende GAIN Domäne wird als autoproteolytisches Zentrum zur funktionellen Modifikation der *Lphn* beschrieben [18] [17]. Die GPS-Domäne verbindet den C-Terminus mit den transmembranären *alpha*-Helices, dient aber auch der Signaltransduktion von extra- nach intrazellulär [17]. Des Weiteren konnte für die intrazelluläre PDZ-Domäne des C-Terminus eine Funktion bei der exzitatorischen synaptischen Signalübertragung zugeschrieben werden [42] [17].

1.2.2 Chronik der Latrophiline

Da die Latrophiline im Zusammenhang mit dem Gift der schwarzen Witwe (*α -latrotoxin*) entdeckt wurden, konzentrierten sich die ersten Arbeiten auf die Lokalisation innerhalb des Nervensystems [17] [20] [48]. Bereits 1996 konnte gezeigt werden, dass α LTX (engl.: *latrotoxin*) via Ca^{2+} -abhängigen sowie Ca^{2+} -unabhängigen Mechanismen die Neurotransmission beeinflusst [11] und dass die Signaltransduktion nach Auslösung durch α LTX via GPCR mit konsekutiver PLC-Aktivierung stattfindet [18] [11]. In späteren Arbeiten konnte dieser Mechanismus durch die Signalweiterleitung via intrazellulärer cAMP-Regulation ergänzt werden [37]. Somit konnten zwei Rezeptortypen der durch α LTX ausgelösten Neurotransmission identifiziert werden. *NRXN* (engl.: *neurexin*) als Mediator der Ca^{2+} -abhängigen und *Lphn* (deshalb auch *CIRL*= *Calcium Independent Re-*

ceptor of α -Latrotoxin) als Mediator der Ca^{2+} -unabhängigen Signalweiterleitung [3] [11]. Hierbei wirken beide Rezeptoren kooperativ, wohingegen diese unabhängig voneinander ausgelöst werden [51]. Obwohl α LTX primär seine Wirkung über das periphere Nervensystem entfaltet, wurden die *Lphn*-Subklassen auch in extraneuronalen Geweben bereits 1999 gefunden [20]. Vor allem *Lphn2* nimmt in diesem Zusammenhang eine Sonderstellung ein. Tabelle 1.4 gibt einen Überblick der bisher nachgewiesenen *Lphn*-haltigen Gewebe [18].

Gewebe	<i>Lphn1</i>	<i>Lphn2</i>	<i>Lphn3</i>
Neuronale Gewebe			
ZNS	Protein	Protein	Protein
PNS	Protein	Protein	unbekannt
Rückenmark	unbekannt	unbekannt	unbekannt
Retina	unbekannt	unbekannt	unbekannt
Muskuläre Gewebe			
Skelettmuskulatur	mRNA	Protein	mRNA
Zunge	unbekannt	unbekannt	unbekannt
Kardiovaskuläre Gewebe			
Herz	Protein	mRNA	Protein
Respiratorische Gewebe			
Lunge	Protein	mRNA	Protein
Trachea	unbekannt	unbekannt	unbekannt
Gastrointestinale Gewebe			
Magen	unbekannt	unbekannt	unbekannt
Duodenum	unbekannt	unbekannt	unbekannt
Ileum	unbekannt	unbekannt	unbekannt
Colon	unbekannt	unbekannt	unbekannt
Leber	Protein	mRNA	Protein
Galle	unbekannt	unbekannt	unbekannt
Exokrine Pankreas	Protein	Protein	abwesend
Urogenitale Gewebe			
Niere	mRNA	Protein	abwesend
Blase	unbekannt	unbekannt	unbekannt
Reproduktive Gewebe			
Uterus	unbekannt	unbekannt	unbekannt
Ovarien	unbekannt	unbekannt	unbekannt
Testikel	unbekannt	unbekannt	unbekannt
Plazenta	mRNA	mRNA	mRNA
Brustdrüsengewebe	unbekannt	Protein	Protein
Lymphatische Gewebe			
Milz	unbekannt	unbekannt	unbekannt
Thymus	unbekannt	unbekannt	unbekannt
Blut	unbekannt	unbekannt	unbekannt
Endokrine Gewebe			
	Protein	unbekannt	unbekannt
Hypophysenvorderlappen	Protein	unbekannt	
Nebennierenmark	Protein	unbekannt	unbekannt

Tab. 1.4: Überblick der bisher nachgewiesenen Lokalisationen der *Lphn*. [19] [17]

In den folgenden Jahren konnte die Funktionsweise der *Lphn* besser verstanden und darüber hinaus Zusammenhänge mit Erkrankungen bei Dysregulation hergestellt werden.

1.2.3 Bedeutung der Latrophiline

Wie unter 1.1.3 beschrieben, konnte den GPCR bereits vielfältige Funktionen, Fehlfunktionen bei Erkrankungen sowie medikamentöse Beeinflussbarkeit zugeordnet werden [33] [6] [46]. Als ein Vertreter der GPCR wurden die *Lphn* ebenfalls in Kontext einiger Regulationsmechanismen und Störungen bei Dysregulation untersucht [17]. So konnte für die *Lphn* neben physiologischer Funktionen bei der kardiovaskulären Genese [9] [30], der sensomotorischen Kopplung von Mechanosensoren [44] [14], der cerebellären und hippocampalen Neurotransmission [1] [55], ein Zusammenhang mit Erkrankungen bzw. Störungen hergestellt werden. In mehreren Arbeiten wurden die *Lphn* bezüglich ihrer Bedeutung bei Erkrankungen des Nervensystems, der Lunge, des Immunsystems, des Gastrointestinaltraktes und des Stoffwechsels untersucht. Tabelle 1.5 bietet einen exemplarischen Überblick dieser Zusammenhänge.

Erkrankungen und Störungen	beteiligtes <i>Lphn</i>
Neuropsychiatrische Störungen	
Mentale Retardierung [4]	<i>Lphn1</i>
bilaterale frontoparietale Mikrogyrierung [29]	<i>Lphn1</i>
Rhombenzephalosynapsis (RS) und Mikrozephalie [52] [35]	<i>Lphn2</i>
Schizophrenie [35]	<i>Lphn2</i>
Epilepsie [35]	<i>Lphn3</i>
Autismus-Spektrum-Störungen (ASS) [35]	<i>Lphn3</i>
Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS) [13] [2] [38] [26] [28] [8] [16]	<i>Lphn3</i>
Störungen der Lunge	
Asthma bronchiale [15] [34]	<i>Lphn1, Lphn3</i>
Chronisch obstruktives pulmonales Defizit (COPD) [36]	<i>Lphn2</i>
Pulmonales Plattenepithelkarzinom [56]	<i>Lphn2</i>
Pulmonales Adenokarzinom [23]	<i>Lphn3</i>
Störungen des Immunsystems	
Neuroinflammation [50]	<i>Lphn2</i>
Akute-Phase-Reaktion via IL6 [27]	<i>Lphn2</i>
Variables Immundefektsyndrom (CVID= engl.: <i>Common Variable Immunodeficiency</i>) [31]	<i>Lphn2</i>
Juvenile idiopathische Arthritis [31]	<i>Lphn2</i>

Erkrankungen und Störungen	beteiligtes <i>Lphn</i>
Störungen des Stoffwechsels	
Diabetes mellitus Typ 2 [41]	<i>Lphn3</i>
Gastrointestinale Störungen	
Cisplatin-sensitives Kolorektales Karzinom [22]	<i>Lphn2</i>

Tab. 1.5: Exemplarischer Überblick von Störungen, die mit dysregulierten *Lphn* in Zusammenhang gebracht werden.

1.3 Anatomie und Physiologie der Zunge

1.3.1 Makroskopischer Aufbau der Zunge

Makroskopisch betrachtet gliedert man die Zunge von oral nach aboral in Radix, Corpus und Apex linguae. Die Zunge besteht zum größten Teil aus Muskelgewebe und ist von Schleimhaut bedeckt. Die Zungenmuskeln (Mm. linguae) gliedern sich in innere und äußere Zungenmuskeln. Die äußeren Muskeln (M. genioglossus, M. hyoglossus und M. styloglossus) bewegen die Zungen in allen drei Dimensionen des Raumes. Die inneren Zungenmuskeln (Mm. longitudinales superior und inferior, M. transversus linguae und M. verticales linguae) hingegen verformen die Zunge. Beide Muskelgruppen werden vom N. hypoglossus innerviert. Charakteristisch für die Zunge ist ihr Schleimhautrelief am Dorsum linguae. Hier erkennt man den V-förmigen Sulcus terminales, der die Zunge in einen vorderen und hinteren Anteil teilt. Im vorderen Teil befinden sich papilläre Aufwältungen, die von Speicheldrüsen untermauert werden. Zwischen den einzelnen Papillen sind die Geschmacksknospen zu finden, die auch als Von-Ebner-Spülndrüsen bezeichnet werden. [45]

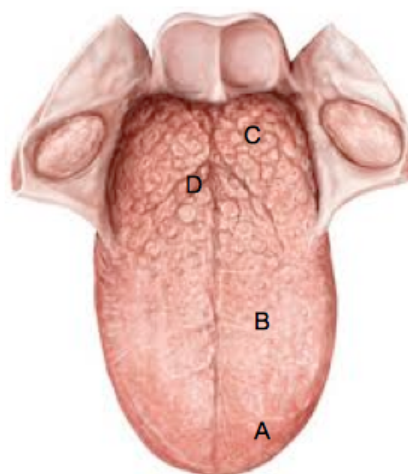


Abb. 1.5: Makroskopischer Aufbau der Zunge. [45] Ansicht von kranial. A: Apex linguae. B: Corpus linguae. C: Radix linguae. D: Sulcus terminales.

1.3.2 Mikroskopischer Aufbau der Zunge

Mikroskopisch betrachtet besteht die Zunge aus quergestreifter Muskulatur, die durch mehrschichtiges, unverhorntes Plattenepithel bedeckt ist. Diese Schleimhaut bildet die charakteristischen Zungenpapillen, die man in unterschiedliche Typen untergliedert. Die Papillae valatae (die von einem Ringwall umgeben sind) und die blattförmigen Papillae foliatae enthalten sehr viele Geschmacksknospen und sind vor allem am Zungengrund lokalisiert. Die pilzförmigen Papillae fungiformes befinden sich vor allem am Zungenrand und sind zahlreich an Geschmacksknospen, Mechano- und Thermosensoren. Die fadenförmigen Papillae filiformis verteilen sich über die gesamte Zungenoberfläche und dienen hauptsächlich der Tastempfindung [45]. In Kapitel 3.4 werden die Papillae filiformis differenzierter betrachtet, da dort im Rahmen dieser Doktorarbeit der Nachweis von *Lphn2* gelang. Die schlundwärts gerichteten fadenförmigen Papillen sind bei vielen Tieren sehr stark ausgebildet und verleihen der Zunge die raue Oberfläche [12].

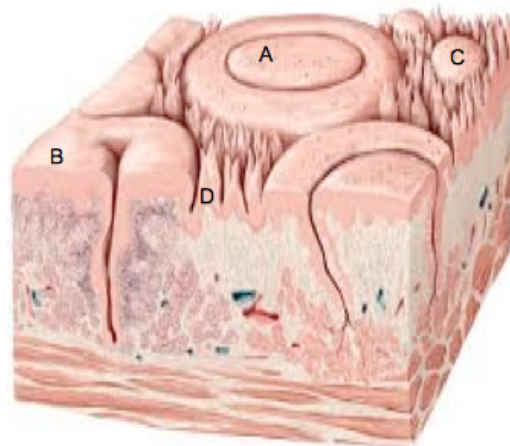


Abb. 1.6: Schleimhautrelief der Zunge. [45] A: Papillae valatae. B: Papillae foliatae. C: Papillae fungiformis. D: Papillae filiformis.

1.3.3 Physiologie der Zunge

Die Zunge als muskuläres Organ des Verdauungstraktes befindet sich in der Mundhöhle. Dort dient sie neben der mechanischen Zerkleinerung und dem Transport der aufgenommenen Nahrung als Tast- und Geschmacksorgan. Sobald Nahrung in die Mundhöhle gelangt, wird diese auf Form, Konsistenz, Temperatur und Geschmack getestet.

Somit kann vermieden werden, dass scharfkantige, zu heiße oder gar giftige, meist bitter schmeckende Stoffe, inkorporiert werden. Hierfur befinden sich auf der Zunge Rezeptoren unterschiedlichen Typs und unterschiedlicher Funktion. Wie bereits unter 1.3.2 beschrieben, befinden sich die meisten dieser Rezeptoren im Bereich der verschiedenen Papillen der Zunge.

2 Material und Methodik

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Biosphere® FilterTips 0,1-10 µl	SARSTEDT, Nümbrecht
Cellstar® TUBES 15 ml / 50 ml	Greiner Bio One, Gremsmünster
cOmplete Protease-Inhibitor	Merck, Darmstadt
Desoxynukleotidtriphosphate	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
eT.I.P.S. PCR clean / steril Dualfilter 200 µl / 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Eis	AF 100 Scotsman Flockeneisbereiter Eppendorf, Hamburg
Eppendorf TUBES 5,0 ml	Science Services, München
PAP-Pen Mini Liquid Repellent Slide	
Marker Pen	
Magermilchpulver Sucofin, leicht löslich	TSI, Zeven
Midori Green Advance	NIPPON Genetics EUROPE, Düren
Mikroschraubenröhren 2 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
Mikrotiterplatte	Bio-Rad, München
Multititerplatte, 96 well, TC Platte, Standard F	SARSTEDT, Nümbrecht
Multititerplatte 96 well, thin wells, PCR plates	HARD-Shell
Objektträger und Deckgläser 14 x 60 mm	Roth, Karlsruhe
Objektträger Wärmetisch	Medax, Neumünster
Pipetten, serologisch 2 ml/5 ml/10 ml/25 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
Pipettierhilfen LABSOLUTE®	Th. Geyer, Renningen
Probenleiter Precesion Plus Protein	Bio-Rad, München
All Blue Standards	

Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts
Reaktionsgefäße 0,5 ml / 1,5 ml / 2 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
Tissue-Tek [®] O.C.T Compound,	Sakura [®] Fine Tek, Torrance, USA
Tissue Freezing Medium	Leica, Nussloch
Vasco [®] Einmalhandschuhe Nitril long L	B. Braun, Melsungen

2.1.2 Geräte

Absaugereinheit Knf LAB Laboport	Knf Neuberger, Freiburg
CFX-Connect Real-Time System	Bio-Rad, München
Chemi Doc XRS + System	Bio-Rad, München
Fisherbrand accuSpin Micro17	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mikrozentrifuge	Zeiss, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop, Axio Imager M.2 mit Axiocam 512 color	
Sub-Cell [®] GT Gelelektrophoresekammer mit PowerPac Basic Supply	Bio-Rad, München
Kryostat CM 1950	Leica, Nussloch
Lichtmikroskop CHK	Olympus, Hamburg
Magnetrührer IKAMAG [®] RET G	Kurt Migge, Heidelberg
Sigma 3-18KS Tischkühlzentrifuge	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz
Ultraschall-Homogenisator Sonoplus HD 2070	Bandelin electronic, Berlin
Schüttelgerät ST 5, wippend	M. Zipperer, Ballrechten-Dottingen
Thermalcycler T100	Bio-Rad, München
Homogenisator TissueRuptor	Qiagen, Hilden
Vortexer RS-VA 10	Phonix Instrument, Garbsen
VWR OS-500 Shaker	Marshall Scientific, Hampton, USA

2.1.3 Chemikalien

ABC Peroxidase Staining Kit	Vectorlabs, Burningham, CA, USA
Acrylamid/Bis-acrylamid 30%/0,8%	Bio-Rad, München
Agarose Biozym LE	Biozym Scientific, Oldendorf
Ambion [®] Nuclease-free water	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad, München
BCA-Protein-Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Rinderserumalbumin	Biomol, Hamburg
Betaine	Sigma Aldrich, Steinheim
Beta-Mercaptoethanol Gibco [®]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Coomassie brilliant blue	Bio-Rad, München
cOmplete Protease-Inhibitor	Sigma Aldrich, Steinheim
Destilliertes Wasser (Aqua bidest)	B. Braun, Melsungen / Zentrales Chemikalienlager, UKS
DMSO for molecular biology	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethanol 70%	Zentrales Chemikalienlager, UKS
EDTA disodium salt dihydrate	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure p.a. (Acetic acid glacial)	VWR CHEMICALS, Radnor, PA
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
Polyvinylalkohol (Mowiol [®])	Sigma Aldrich, Steinheim
Orange G	Sigma Aldrich, Steinheim
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Super Signal West Pico Peroxide Solution	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TEMED	Bio-Rad, München
Trizma base	Sigma-Aldrich, Steinheim
TRIzol [®]	Ambion by life technologies, CA, USA
Tween 20	Sigma Aldrich, Steinheim

2.1.4 Puffer und Lösungen

APS Stammlösung	10% (w/v)	1 g ad 10 ml	Ammoniumpersulfat Aqua bidest, Lagerung bei 4 °C
Coomassie-Entfärber	10% (v/v) 30% (v/v)	50 ml 150 ml ad 500 ml	Essigsäure Methanol Aqua bidest
Coomassie- Färbelösung	0,25% (w/v)	1,25 g	Coomassie Brilliant Blue R-250 Essigsäure
	10% (v/v) 50% (v/v)	50 ml 250 ml	Methanol Aqua bidest, filtrieren durch Faltenpapier bei RT lichtgeschützt lagern
Complete (25x)		1 Tbl. ad 2 ml	Complete (Roche) Aqua bidest; Lagerung bei -20 °C
DEPC-H ₂ O		0,1% (v/v)	Aqua bidest mit Diethyl- pyrocarbonat versetzten, über Nacht rühren, 1h autoklavieren
Gewebe-Lysis-Puffer	1% (v/v)	10 µl	ProteinaseK- Stammlösung
Histoblocklösung	10% 0,5% 0,1%	ad 1 ml 10 ml 0,5 ml 0,1 g	Larid-Puffer Pferde-Serum Tween BSA
Immunoblot- Blockierungslösung	5% (w/v)	89,4 ml 2,5 g ad 50 ml	PBS, pH 7,4 Magermilchpulver (Suco- fin) Waschblotpuffer. frisch ansetzen
Laird-Puffer	0,1 M 5 mM 0,2 M 0,2% (v/v)	12,1 g 1,86 g 11,69 g 20 ml ad 1 l	Tris EDTA NaCl SDS-Lösung (10%) Aqua bidest; pH 8,5
Lysozym- Stammlösung	10 µl / mg	0,5 g ad 50 ml	Lysozym Aqua bidest, Lagerung bei -20 °C
NaCl-Lösung, isotonisch	0,9% (w/v)	4,5 g ad 500 ml	NaCl H ₂ Odd; pH 7,4; 1 h auto- klavieren

Paraformaldehyd-Lösung		4 g	Paraformaldehyd-Pulver
		ad 100 ml	H ₂ Odd; pH 7,4 Titration mit Natronlauge bis sich durch das Paraformaldehyd eine milchig, weiße Flüssigkeit bildet (pH >7)
Phosphat-gepufferte Salzlösung	137 mM	0,8 g	NaCl
	2,7 mM	0,2 g	KCl
	8,1 mM	1,44 g	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
PCR 10x Reaktionspuffer	500 mM		KCl,
	100 mM		Tris-HCl (pH 9,0 bei 25°C)
		1%	Triton [®] X-100
Ponceau-Färbelösung	0,2% (w/v)	1 g	Ponceau S
	3% (v/v)	15 ml	Trichloressigsäure
		ad 500 ml	Aqua bidest
ProteinaseK-Stammlösung	20mg/ml	1 g	ProteinaseK
		ad 50 ml	Aqua bidest, Lagerung bei -20 °C
RIPA Puffer		1,5 ml	Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O-Lösung (0,5 M)
	10 mM	0,5 ml	Na ₂ HPO ₄ -Lösung (0,5M)
	0,1% (v/v)	1 ml	SDS-Lösung (10%)
	40 mM	0,168 g	Natriumfluorid
	2 mM	74,4mg	EDTA
	1% (v/v)	1 ml	Triton X-100
	0,1% (v/v)	ad 100 ml	Aqua bidest; pH 7,2, 1 h autoklavieren, dann
		1 ml	10%ige Deoxycholat Lsg.
SDS-Elektrophorese-Puffer	0,25 M	15 g	Tris-Base
	1,92 M	72 g	Glycin
	1% (v/v)	50 ml	SDS-Lösung, 10%
		ad 5 l	Aqua bidest, pH 8,3

SDS-Probenpuffer	62,5 mM 3% (w/v) 10% (v/v) 0.01% (w/v) 5% (v/v)	0,757 g 3 g 10 ml 10 mg 5 ml ad 100 ml	Tris SDS (Pulver) Glycerin Bromphenolblau β -Mercaptoethanol Aqua bidest; pH 6,8; Lagerung bei Raumtempe- ratur ohne β -Mercapto- ethanol
1x SDS-Transferpuffer	20% (w/v)	200 ml 200 ml ad 1 l	5x SDS-Transferpuffer Methanol Aqua bidest
5x SDS-Transferpuffer	50 mM 0,1 M 0,8 M	15,4 g 18,5 g 144,2 g ad 2 l	Tris-HCl Tris-Base Glycin Aqua bidest; pH 8,3
50x TAE-Puffer	20mM 1 mM	242g 37,2 mg 57,1ml ad 1000 ml	Trizma Base EDTA Essigsäure Aqua bidest
1x TAE-Puffer			50x TAE-Puffer 1:5 ver- dünnen mit Aqua bidest
TE-Puffer	10 mM 1 mM	121 mg 37,2 mg ad 100 ml	Tris EDTA Aqua bidest, pH 8,0; 1h autoklavieren
Tris-HCl	500 mM	6,06 g ad 1 l	Tris Aqua bidest, pH 7,6
Tris HCl 1,5 M (pH 8,8)	1500 mM	45,43 g ad 250 ml	Trizmabase Aqua bidest, titriert mit HCl auf pH 8,8
Tris-HCl 0,5M (pH 6,8)	500 mM	30,29 g ad 250 ml	Trizmahydrochlorid Aqua bidest, titriert mit NaOH auf pH 6,8
Waschblotpuffer	8,5 mM 1,7 mM 50 mM 0,1%	2,68 g 0,4 g 5,8 g 2 ml ad 2 l	Tris-HCl Tris-Base NaCl Tween 20 Aqua bidest

2.1.5 Antikörper

Bezeichnung	Verwendung (Verdünnung)	Referenz
HA-Tag (C29F4) Rabbit mAb	IHC (1:1000) IB (1:2000)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
GFP Polyclonal Antibody	IHC (1:1000), IB (1:2000)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Tab. 2.1: Primäre Antikörper. IB = Immunoblot, IHC = Immunhistochemie.

Bezeichnung	Verwendung (Verdünnung)	Referenz
Peroxidase Conjugate- Goat Anti-Rabbit	IF (1:2000)	Sigma Aldrich, Steinheim
Anti-Mouse IgG (γ -chain specific)-Peroxidase antibody produced in goat	IB (1:10000)	Sigma Aldrich, Steinheim
Anti-Rabbit-IgG (whole molecule)-Peroxidase antibody produced in goat	IB (1:10000)	Sigma Aldrich, Steinheim

Tab. 2.2: Sekundäre Antikörper. IB = Immunoblot, IHC = Immunhistochemie.

2.1.6 Enzyme

Produkt	Enzyme und (Komponenten)	Herkunft
Taq-Polymerase aus Laborbestand	Taq-DNA-Polymerase	Überstand aus induzierter <i>E. coli</i> Kultur
Luna [®] WarmStart [®] RT Enzyme Mix #M3002S	Reverse-Transkriptase Murine-RNase-Inhibitor	New England BioLabs, Ipswich, USA
Luna [®] Universal Probe One Step Reaction Mix #M3006S	Taq-DNA-Polymerase Desoxynukleotide fluoreszierender dsDNA bindender Farbstoff	New England BioLabs, Ipswich, USA

Tab. 2.3: Enzyme

2.1.7 Oligonukleotid-Startermoleküle und DNA Sonden

Tabelle 2.4 zeigt die verwendeten Oligonukleotid-Startermoleküle, die ausnahmslos von *Integrated DNA Technologies* bezogen wurden.

Bezeichnung	Assay Name	Basenfolge und (-länge)
PrimeTime® Assay Std Probe 5' 6-FAM™/ZEN™/3' IB®FQ	PRB.mmLphn1.pt	/56-FAM/AGC CAC CTC /ZEN ACC/AAC TTC GCA /3IABkFQ/ (21)
PrimeTime® Std DNA Primer I	FOR.mmLphn1.pt	TCC AAT AAG ACC CAT ACC ACA TG (23)
PrimeTime® Std DNA Primer I	REV.mmLphn1.pt	AGA TGA CAA TAC CAA CCC AGG (23)
PrimeTime® Assay Std Probe 5'6-™/ZEN™/3' IB®FQ	PRB.Lphn2q RTPCRassay.1.pt	/56-FAM/AGA CGA GGG /ZEN/AGA CAA CGA TGC C/3IABkFQ/ (22)
PrimeTime® Std DNA Primer I	FOR.Lphn2qRTPCRassay.1.pt	CAG CCA CCT AAC CAA TTT TGC (21)
PrimeTime® Std DNA Primer I	REV.Lphn2qRTPCRassay.1.pt	GTG AAG ATG CAG ATA GCC AGG (21)
PrimeTime® Assay Std Probe 5'6-FAM™/ZEN™/3' IB®FQ	PRB.mmLphn3.pt	/56-FAM/AGA ACA TGG /ZEN /GCC ACG GAA GTA CC/3IABkFQ/ (23)
PrimeTime® Std DNA Primer I	FOR.mmLphn3.pt	CAA GAC TGA GCA CGG AAG G (19)
PrimeTime® Std DNA Primer I	REV.mmLphn3.pt	AGG ACA AAA GCC ACT CTA ATC TC (23)
PrimeTime® Assay XL Probe 5'HEX™/ZEN™/3' IB®FQ	Mm.PT.39a. 22214843.g	/5HEX/CTG GCC TCA /ZEN/CTG TCC ACC TTC C/3IABkFQ/ (22)
PrimeTime® XL DNA Primer II	Mm.PT.39a. 22214843.g	GAT TAC TGC TCT GGC TCC TAG (21)
PrimeTime® Std DNA Primer I	Mm.PT.39a. 22214843.g	GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG (21)

Tab. 2.4: Oligonukleotid-Startermoleküle

2.1.8 Mausstämme und Mäuse

C57BL/6	Wildtyp-Mausstamm mit schwarzer Fellfarbe für Züchtungen und Rückkreuzungen	Charles River, eigene Zucht
B6;129S6-Adgr12 ^{tm1sud/J}	Mauslinie mit LoxP/FRT-Sequenzen flankiertem <i>Lphn2</i> -Gen modifiziert mit der GFP-Variante mVenus	Dr. Stephan Maxeiner
B6;129S6-Adgr13 ^{tm1sud/J}	Mauslinie mit loxP/FRT-Sequenzen flankiertem <i>Lphn3</i> -Gen mit zusätzlichem HA-Epitop	Dr. Stephan Maxeiner

2.2 Methoden

2.2.1 Genotypisierung

Bei der Genotypisierung handelt es sich um ein analytisches Verfahren zur Identifikation bestimmter Genabschnitte. In dieser Arbeit dient es explizit der Klassifikation der Proben bezüglich ihrer genetischen Herkunft (Wildtyp- oder genetisch veränderter Mausstamm). Hierfür werden Methoden zur Reinigung, Auftrennung und zur Visualisierung der DNS eingesetzt, die im Folgenden genauer beschrieben sind.

Beim Umgang mit DNS sollte man zur Vermeidung von Fragmentationen darauf achten, dass die Proben keinen Scherkräften oder mechanischem Stress ausgesetzt werden. Die Proben sollten während der Arbeiten auf Eis gelagert werden, um eine enzymatische Aufspaltung durch DNasen nicht zu begünstigen. Zur Prophylaxe von Kontaminationen sollten alle Arbeiten mit Einmalhandschuhen, Einmalmaterial und mit größter Sorgfalt durchgeführt werden.

2.2.1.1 Isolierung der DNS

Zur *in-vitro* Bestimmung des Genotyps muss die DNS aus Geweben der Maus isoliert werden. Zwecks Probengewinnung nimmt man eine Gewebebiopsie und überführt sie in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß. Nun fügt man 400 μ l Laird-Puffer mit 1% (v/v) ProteinaseK-Stammlösung hinzu und inkubiert sie über Nacht bei 56°C im Wasserbad. Nicht lösliche Gewebe wie Haare, Knochen und Knorpel können am Folgetag verworfen werden. Dazu zentrifugiert man die Proben (5 min, 13 000 Upm, bei RT) und überführt den Überstand in ein neues Reaktionsgefäß. Mittels Zugabe von 400 μ l Isopropanol und anschließendem Schütteln der Probe flockt die DNS in Form eines weißen Präzipitats aus. Der Überstand wird dekantiert und das Präzipitat mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 13 000 Upm, bei 4°C). Der Überstand wird verworfen und das Präzipitat getrocknet bis die Alkoholreste verdunstet sind. Anschließend bringt man den Bodensatz in TE-Puffer in Lösung (bei 56°C im Wasserbad) und lagert die Proben bei 4°C bis zur

weiteren Verwendung.

2.2.1.2 Amplifikation der DNS mittels PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine molekularbiologische *In-vitro* Methode zur Amplifikation spezifischer DNS-Doppelstrang-Sequenzen, um größere Mengen des gleichen Moleküls zu erhalten. Das Grundprinzip besteht aus drei sich mehrfach wiederholenden Phasen: der Denaturierung, der Anheftung der Oligonukleotid-Startermoleküle und der Elongation zu komplementären Doppelstrang DNS-Sequenzen.

Zyklische Temperaturveränderung gewährleisten den optimalen Ablauf der einzelnen Reaktionen, die in dieser Arbeit mithilfe eines Thermalcyclers wie folgt programmiert wurden: Denaturierung bei 95°C für 5 min und dann für je 30 s pro Zyklus, Anheftung der Oligonukleotid-Startermoleküle bei 63°C für je 30 s und Elongation der Oligonukleotide mittels *Taq*-DNA-Polymerase bei 72°C für je 45 s. Entscheidendes Enzym ist die *Taq*-DNA-Polymerase, die als hitzestabiles Enzym aus dem Organismus *Thermus aquaticus* entstammt und damit der für die Denaturierung notwendigen Temperatur von 95°C standhält. Zusätzlich zur DNS und der *Taq*-DNA-Polymerase werden Puffer, Desoxynukleotide, Oligonukleotid-Startermoleküle und Kofaktoren benötigt, die man als Reaktionsansatz vorpipettiert. In dieser Arbeit wurden folgende Reaktionspartner pro 1 μ l DNS-Probe hinzugefügt:

Reaktionspartner	Konzentration	Menge
Nuklease freies Wasser	N/A	12,82 μl
PCR Puffer	10fach konzentriert	2,5 μl
MgCl ₂	25 mM	1,5
Rinderserumalbumin	10 mg/ml	0,25 μl
Betaine	5 M	5 μl
Dimethylsulfoxid	100%	0,83 μl
Desoxyribonukleosid-triphosphaete	25 mM	0,2 μl
Oligonukleotid-Startermoleküle	100 μM	0,2 μl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	N/A	0,5 μl

Tab. 2.5: PCR-Reaktionsansatz zur PCR

2.2.1.3 Auftrennung und Nachweis mittels Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese werden DNS-Fragmente in einem elektrischen Feld anhand ihrer Molekülmasse aufgetrennt, um anschließend mittels fluoreszierenden Farbstoffes sichtbar gemacht zu werden. Hierzu gießt man ein Agarose-Gel, dessen Konzentration entsprechend der Molekülmasse der zu untersuchenden DNS angepasst werden muss. Um eine optimale Auflösung im Bereich von 300 Basenpaaren zu erreichen, wurden in dieser Arbeit einprozentige Gele (2 g Agarose, auf 200 ml TAE-Puffer), die mit 10 μl Midori-Green (Nippon Genetics Europe, Düren) versetzt wurden, gegossen. Anschließend pipettiert man ca. 20 μl jeder Probe zusammen mit je 5 μl Orange G Ladepuffer in jeweils eine der Geltaschen. Parallel dazu gibt man in jeweils eine weitere Geltasche circa 5 μl DNA-Leiter (in dieser Arbeit 100 Basenpaar-DNA-Leiter, Fisher Scientific, Schwerte) und 25 μl Negativkontrolle (Reaktionsansatz mit 1 μl H₂O statt DNS-Probe und 5 μl Orange G). Nach der elektrophoretischen Auftrennung können die DNS-Fragmente in einem Chemifluoreszenzdetektionssystem (Chemi Doc XRS+ System) mittels UV-Licht im 490 nm Bereich exponiert und mithilfe der darauffolgenden Midori-Green-Emissionen im 530 nm Bereich detektiert und dokumentiert werden.

2.2.2 Nachweis ribonukleärer Transkriptmengen

Zum Nachweis von Ribonukleinsäuren müssen diese ähnlich wie bei der Aufbereitung von DNS isoliert, aufgetrennt und visualisiert werden. Beim Umgang mit RNS gibt es jedoch Unterschiede, die im Folgenden erläutert werden.

Zur Vermeidung von Kontaminationen mit RNasen, sollten alle Arbeiten mit Einmalhandschuhen, Einmalmaterial und mit Diethylpyrocarbonat behandeltem (d.h. RNase freiem) Wasser durchgeführt werden. Die Verarbeitung der Proben sollte auf Eis, die längerfristige Lagerung bis zur Weiterverarbeitung bei -70°C erfolgen. Es empfiehlt sich ferner das Arbeiten in einer störfaktorarmen Umgebung, um Kontaminationen zu vermeiden.

2.2.2.1 Auswahl geeigneter Primer zur qRT-PCR

Zur qRT-PCR benötigt man hochspezifische Primer, um den Start der Polymerase-Kettenreaktion zielgenau an der zu untersuchenden RNS zu ermöglichen. Dabei müssen die Primer komplementär zur gewünschten RNS sein und der entsprechende Genabschnitt sollte so gewählt werden, dass es sich um einen kodierenden Genabschnitt (Exon) handelt, denn nur dort entstehen Transkriptionsprodukte, die mithilfe der qRT-PCR nachzuweisen sind. Außerdem sollte der Genabschnitt so gewählt werden, dass alle putativen Splicevarianten enthalten sind, um quantitative Aussagekraft über alle RNS-Produkte und nicht nur über eine Teilmenge zu erhalten, außer wenn es eine bestimmte Fragestellung veranlasst.

Hierzu wurde in dieser Arbeit mithilfe der NCBI-Datenbank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, VA, USA) aus allen möglichen Genvarianten ein Genabschnitt ausgewählt, der in allen putativen Splicevarianten enthalten ist. Die Nukleotidsequenz zum Design der Primer kann über die CCDS-Sequenz-Datei (engl.: *consensus coding sequence*) abgelesen werden.

2.2.2.2 Isolierung von RNS

Der Nachweis von RNS erfordert eine physikalische und chemische Auftrennung des zu untersuchenden Gewebes. Hierfür werden die Proben nach Gewebeentnahme in ein beschriftetes Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die mechanische Auftrennung erfolgt mit Hilfe eines Homogenisator, in dem das mit TRIzol[®]-Reagenz versetzte Gewebe (1 ml TRIzol[®]-Reagenz pro 100 mg Gewebe) homogenisiert wird. Nach jedem Schritt sollte der Homogenisatorschaft in RNase freiem Wasser gereinigt werden. Anschließend wird das Homogenisat mit 1300 Upm zentrifugiert. Es entsteht eine Phasentrennung in eine obere, klare und eine untere, rötliche Phase. Nach Sedimentation verbliebener Zelltrümmer kann mit dem klaren Überstand weitergearbeitet werden. Die RNS-haltige klare Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Alle folgenden Schritte der RNS-Isolierung wurden in dieser Arbeit mithilfe des Directzol[®]RNA Mini Prep Plus Kits (ZYMO RESEARCH, Freiburg) durchgeführt. Danach können die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C gelagert werden.

2.2.2.3 Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Um eine quantitative Aussage bezüglich der RNS-Transkriptmengen treffen zu können, muss die RNS (Boten-RNA; engl.: messenger RNA) mithilfe einer reversen Transkriptase in komplementäre DNS umgeschrieben, amplifiziert und anschließend detektiert werden. Nach der reversen Transkription gliedert sich die PCR der DNS-Matrize wie in Kap. 2.2.1.1 beschrieben in drei sich mehrfach wiederholende Phasen.

In dieser Arbeit wurden zur qRT-PCR Enzymmixturen von New England BioLabs, Primer und DNS Sonden von Integrated DNA Technologies verwendet. Damit ist es möglich, Reverse-Transkription und PCR in einem Reaktionsansatz durchzuführen. Pro 1 μ l RNS-Probe (bei 100 ng RNS/ μ l) wurden folgende Reaktionspartner pipettiert:

Reaktionspartner	Menge
Nuklease freies Wasser	6 μ l
Luna [®] Universal Probe One Step Reaction Mix	10 μ l
Luna [®] WarmStart [®] RT Enzyme Mix	1 μ l
Prime Time Std qPCR Assay Actin (HEX)	1 μ l
Prime Time Std qPCR Assay Lphn1/ 2/ 3 (FAM)	1 μ l

Tab. 2.6: RT-PCR Reaktionsansatz

Die reverse Transkription der RNS in DNS und die anschließende Amplifikation der komplementären DNS (analog zu Kapitel 2.2.1.2) erfolgt in einem Thermalcycler. Hierzu wurde in dieser Arbeit das CFX-Connect Real-Time System verwendet. Warm-Up für 50 s, Denaturierung bei 95°C für 1 min und dann für je 10 s pro Zyklus, Anheftung der Oligonukleotid-Startermoleküle und Elongation der Oligonukleotide mittels DNA-Polymerase bei 60°C für je 30 s.

Die in diesem Ansatz verwendeten sondenbasierten Assays ermöglichen das Ablesen der amplifizierten RNS-Mengen in Echtzeit (Echtzeit PCR; engl.: Real Time PCR). Dabei werden die fluorogenen Signale, die proportional zur amplifizierten RNS entstehen, mit Hilfe des CFX-Connect Real-Time Systems detektiert, was ein weiteres Nachweisverfahren im Sinne eines Gelelektrophoreseverfahrens erübrigt.

2.2.3 Proteinanalytik

Um Proteine direkt nachzuweisen, müssen diese aus ihrer ursprünglichen Umgebung extrahiert, ihre Konzentration zum Vergleichsgewebe standardisiert, sie im Hinblick auf ihre Molekülgröße aufgetrennt und letztendlich methodisch sichtbar gemacht werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden werden im Folgenden genauer beschrieben.

Beim Umgang mit Proteinen ist es wichtig, die Proben während der Arbeiten auf Eis zu lagern, um Fragmentation durch Proteinasen nicht zu begünstigen. Die längerfristige Lagerung bis zur weiteren Verarbeitung kann bei -70°C erfolgen. Außerdem erfordert die Prophylaxe vor Kontaminationen das Arbeiten mit Einmalhandschuhen, Einmalmaterial und größter Sorgfalt.

2.2.3.1 Isolierung von Proteinen

Zur Isolierung von Proteinen werden die Proben direkt nach Gewebeentnahme in ein entsprechend großes, beschriftetes Reaktionsgefäß überführt und dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zum mechanischen und chemischen Aufschluss der Gewebe bietet sich analog zu Kap. 2.2.2.2 das Arbeiten mit einem Homogenisator an. Hierzu gibt man pro 100 mg Gewebe 1,5 ml Lysispuffer (1 Tablette Complete[®] auf 50 ml RIPA-Puffer) und homogenisiert die Proben solange, bis eine gleichmäßige Masse entsteht. Dabei ist es wichtig, den Homogenisator zwischen jeder Probe mit Wasser zu reinigen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Das Homogenisat lagert man im Anschluss auf Eis und inkubiert es zusammen mit dem Lysat auf Eis für ca. 1 h auf einem Kippschüttler. Nach der Inkubation werden die Proben zur noch feineren Auftrennung und Fragmentierung der DNS sonifiziert (Leistung 20%, Puls à 1 s, für 20 s). Die Separation erfolgt mittels Zentrifugation (4200x G, für 30 s). Dabei ist es wichtig, die Zentrifuge auf 4°C vorzukühlen, um ein Erwärmen der Proben zu vermeiden. Der proteinhaltige in der Regel klare Überstand wird nun in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -70°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert werden.

2.2.3.2 Messung und Standardisierung der Proteinkonzentration

Zur Messung und Standardisierung der Proteinkonzentrationen wurde in dieser Arbeit das BCATM Protein Assay Kit (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben in einer 96 well Mikrotiterplatte verwendet.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülmasse erfolgt mithilfe der Gelelektrophorese. Um eine hochauflösende Separation der Proteine zu ermöglichen, muss die Sekundär- und Tertiärstruktur der nativen Proteine aufgefaltet werden. Hierzu wird den Proben ein sogenannter SDS-Probenpuffer hinzugefügt. Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate oder SDS) ist ein negativ geladenes Detergens, dessen Lipidrest an lipophile Bereiche des Proteins bindet. Dadurch werden die Proteine aufgefaltet und deren Gesamtladung negativiert. Eine negative Gesamtladung ermöglicht ein gleichmäßiges Wanderungsverhalten aller Proteine in Richtung der Anode. Außerdem wird dem SDS-Probenpuffer zwecks zusätzlicher Denaturierung β -Mercaptoethanol, ein reduzierender, disulfidbrückenspaltender Stoff, hinzugefügt. Der Farbstoff Bromphenolblau wird als Lauffrontmarker zugesetzt. Als Grundlage der Auftrennung dient neben der Elektrophorese ein gelatineartiges Laufmedium aus polymerisiertem Acrylamid. Entsprechend der Molekülmasse der zu untersuchenden Proteine kann das Gel unterschiedlich konzentriert werden, um ein optimales Abbild nach elektrophoretischer Auftrennung zu erreichen. In dieser Arbeit wurden zehnpromtente Gele gegossen, um eine optimale Auflösbarkeit im Bereich von 100-150 kDa zu erreichen.

Komponente	Trenngel	Sammelgel
H ₂ O	12,3 ml	6,15 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	7,5 ml	
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8		2,5 ml
Natriumdodecylsulfat 10% (w/v)	300 μ l	100 μ l
30% / 0,8% (w/v) Acrylamid / Bisacrylamid	9,9 ml	1,34 ml
Ammoniumpersulfat 10% (w/v)	150 μ l	50 μ l
TEMED	20 μ l	10 μ l

Tab. 2.7: Pipettierschema zur Herstellung von Polyacrylamid-Gelen

Hierzu benötigt man ein Trenn- und Sammelgel. Das Sammelgel dient dem Sammeln der Probe bis zum Start der Elektrophorese. Im Trenngel werden die durchwanderten Proteine entsprechend ihrer Molekülmasse separiert. Um dies zu gewährleisten, werden die Gele zwischen zwei Glasplatten pipettiert, die parallel zueinander senkrecht zur Oberfläche in eine spezielle Apparatur eingespannt sind. Das Trenngel wird zuerst gegossen. Nach Aushärten des Trenngels durch Abwarten der Polymerisation des Polyacrylamids für ca. 1h wird das Sammelgel darüber gegossen und ebenfalls ausgehärtet. Nachdem die Gele gegossen und die Proben mit dem Probenpuffer versetzt worden sind, erfolgt die gelelektrophoretische Auftrennung. Hierzu werden ein Probenleiter (Precision Plus Protein All Blue, Bio-Rad, München) und die Proben analog zu Kap. 2.2.1.2 in Geltaschen des Sammelgels pipettiert und die Elektrophorese mit 50-80 mA gestartet. Niedermolekulare Proteine können die Poren des Polyacrylamid-Gels schneller passieren und führen damit die Lauffront an. Hochmolekulare Proteine bewegen sich langsamer durch das Gel und werden so von den niedermolekularen Proteinen abgehängt. Somit gelingt die Separation der Proteine anhand ihrer Molekülmasse. Mithilfe des Probenleiters und des Lauffrontmarkers gelingt die Abschätzung der optimalen Laufzeit. Sind die Proben ausreichend aufgetrennt, kann die Gelelektrophorese gestoppt werden.

2.2.3.4 Visualisierung der aufgetrennten Proteine im Gel

Mithilfe der Coomassie-Färbung können die Proteine in dem Gel sichtbar gemacht und anhand des Probenleiters verglichen werden. So können die Proteine entsprechend ihrer Molekülmasse eingeordnet werden. Hierzu werden die Gele entweder unmittelbar nach der Gelelektrophorese oder nach einem Proteintransfer mit Coomassie-Färbelösung (Coomassie brilliant blue, Bio-Rad, Münschen) auf einem Kippschüttler inkubiert (für 1 h bei Raumtemperatur) und anschließend entfärbt. Somit stellen sich die Banden durch den Entfärbeprozess mit Coomassie-Entfärbelösung dar. Diese Methode wird in der Regel nach einem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran durchgeführt, um den Erfolg des Transfers zu evaluieren.

2.2.3.5 Transfer der Proteine auf Nitrocellulosemembran

Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (das sogenannte "Blotting") erfolgt in SDS-Transferpuffer. Dazu werden die Gele mit den aufgetrennten Proteinen zusammen mit der Nitrocellulosemembran in die Elektrophoresekammer eingespannt. Zusätzlich benötigt man ein vertikal zur Nitrocellulosemembran und zum Polyacrylamid-Gel angelegtes elektrisches Feld, um eine Wanderung der negativ geladenen Proteine in Richtung Anode zu ermöglichen. Bei der Durchwanderung der Proteine werden diese entsprechend ihrer Position auf dem Gel an der Nitrocellulosemembran immobilisiert. In dieser Arbeit wurden so für jeweils 2 Stunden bei 250 mA die Proteine entlang des elektrischen Feldes auf die Nitrocellulosemembran übertragen.

2.2.3.6 Visualisierung spezifischer Proteine auf der Nitrocellulosemembran

Um die aufgetrennten Proteine einzeln analysieren zu können, müssen diese mittels spezifischer Antikörper markiert und anschließend sichtbar gemacht werden. Dieser Vorgang lässt sich grob in das Absättigen unspezifischer Bindungsstellen mittels Blockie-

runungslösung (5% Milchpulver in TBST-Puffer), das Inkubieren mit primärem bzw. sekundärem Antikörper und das Visualisieren mittels Chemifluoreszenz einteilen.

Zum Absättigen der unspezifischen Bindungsstellen wird die Nitrocellulosemembran für ca. 60 min auf einem Kippschüttler in der Blockierungslösung inkubiert. Danach erfolgt die Inkubation der Nitrocellulosemembran mit dem primären AK über Nacht bei 4°C im abgedunkelten Raum. Hierzu wurde in dieser Arbeit die Nitrocellulosemembran zusammen mit dem primären Antikörper in Blockierungslösung in eine Klarsichtfolie eingeschweißt. Am Folgetag kann nach dreimaligem Waschen in TBST-Puffer für jeweils 10 min auf einem Kippschüttler die 1,5 stündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgen. Nach erneutem dreimaligem Waschen werden die Proteine auf der Nitrocellulosemembran mit der Chemofluoreszenzlösung beträufelt. Die auf Basis der chemischen Reaktion von Luminol mit Horseradish-Peroxidase emittierten Photonen können anschließend mit Hilfe eines Detektionssystems aufgezeichnet werden. Nach Ablauf der Reaktion können sowohl die antikörpermarkierten Proteine, als auch die Referenzbanden des Probenleiters als „Banden“ dokumentiert werden.

2.2.4 Histologische Untersuchung

Um mikroanatomische Strukturen innerhalb eines Gewebes darzustellen, müssen die Proben zu mikrometerdünnen Gewebsschnitten verarbeitet und anschließend angefärbt werden. Zur vorbereitenden Fixierung der Gewebe wurde in dieser Arbeit das Gewebe entweder in flüssigem Stickstoff (-196°C) schockgefroren oder bei Raumtemperatur in 4%iger Paraformaldehydlösung (PFA) fixiert. Fixierung und Gewebeentnahme wurden von Herrn Dr. Maxeiner durchgeführt. Zur Fixierung mit Paraformaldehyd wurden die Tiere nach Tötung transkardial heparinisiert (300µl 5000IE/ml Heparin), daraufhin mit 19 ml 1x PBS und anschließend mit 50 ml PFA 4% durchspült. Schockgefrorenes Gewebe kann bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert werden, in PFA-Lösung fixiertes Gewebe wird bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert. Die darauffolgenden 10 µm Gewebsschnitte erfolgten am Kryostat bei -20 bis -25°C. Um die histologischen Schnitte beurteilen zu können, wurden diese im Anschluss auf einen Objektträger übertragen und eine Antikörperfärbung durchgeführt. Vor der Inkubation mit Antikörpern ist es wichtig,

unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Hierzu beträufelt man die Gewebsschnitte mit Histoblocklösung und lässt diese für 1 h in einer Feuchtkammer einwirken. Nachdem man Histoblocklösung wieder entfernt und die Proben dreimalig für 10 min. mittels PBS (pH7,4) auf einem Kippschüttler gewaschen hat, kann man die Gewebsschnitte mit den Antikörpern inkubieren (Immunhistologie).

2.2.4.1 Immunhistologie

Die Immunhistologie dient der Visualisierung von spezifischen Antigenen in einem Gewebsschnitt mittels enzym- oder farbstoffgekoppelter Antikörper. In dieser Arbeit wurden zur Darstellung der Proteine im Gewebsschnitt die Immunhistochemie (IHC) eingesetzt. Bei der IHC wird die katalytische Aktivität von an Antikörpern oder an Streptavidin-gekoppelten Enzymen genutzt, um die zu untersuchenden Antigene anzufärben. Dabei setzt man entweder Primärantikörper-Enzym-Konjugate (direkte Methode) oder die Kombination aus primärem Antikörper und darauffolgendem Sekundärantikörper-Enzym-Konjugat (indirekte Methode) ein. Bei der Arbeit mit einem Primärantikörper-Enzym-Konjugat ist das katalytisch aktive Enzym an den Antikörper gebunden, der direkt an das zu untersuchende Antigen spezifisch bindet. Im Gegensatz dazu müssen bei der Arbeit mit Sekundärantikörper-Enzym-Konjugaten die Antigene zuerst mittels antigenspezifischer primärer Antikörper markiert werden, da der sekundäre Antikörper spezifisch an das Fc-Fragment des primären Antikörpers bindet. Da in dieser Arbeit zur IHC Peroxidase-Antikörper verwendet wurden, müssen endogene Peroxidaseaktivitäten vor der Inkubation mit den Antikörpern blockiert bzw. zerstört werden. Dies wird erreicht, indem man die Gewebsschnitte (vor der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen) für ca. 1 h auf dem Kippschüttler mit Pox-Blocklösung absättigt. Nach dreimaligem Waschen in PBS für 5-10 min. und darauffolgender Histoblockierung kann die Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht mit dem primären Antikörper gestartet werden. Hierzu umrandet man nach 10 minütigem Waschen in PBS auf einem Kippschüttler die auf dem Objektträger befindlichen Gewebe mit einem Fettstift (PAP-Pen Mini Liquid Repellent Slide Marker). Dann pipetiert man die Blockierungslösung auf die Gewebs-

schnitte. Nach Blockierung für 1 h in einer Feuchtkammer und anschließendem dreimaligem Waschen für je 5 min. in PBS, pipetiert man den primären Antikörper in Trägerlösung (engl.: Carrier Solution) auf das anzufärbende Gewebe, sodass das Antikörper-Trägerlösung-Gemisch den Fettrand nicht überschreitet. Danach werden die antikörperbeschichteten Gewebsschnitte zur Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Arbeitet man mit Sekundäantikörper-Enzym-Konjugaten, müssen die Gewebsschnitte am Folgetag nach dreimaliger Waschung in PBS für 5-10 min. auf dem Kippschüttler für ca. 2 h dem sekundären Antikörper in Trägerlösung ausgesetzt werden. Mithilfe geeigneter Färbelösungen, die das Antikörper-Enzym-Konjugat in Reaktion bringen, entstehen im Hellfeld detektierbare Präzipitate. Dies wurde in dieser Arbeit mithilfe von peroxidase-detektierende Färbelösungen (NovaRED[®]) umgesetzt. Zur Signalverstärkung und Verbesserung der Sensitivität wurden zusätzlich Avidin-Biotin-Komplexe eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren, bei dem die Gewebsschnitte für 30 min. dem sogenannten ABC-Reagens ausgesetzt werden. Währenddessen bindet der Avidin-Komplex an den mit Biotin gekoppelten sekundären Antikörper, wodurch sich die Konzentration des Enzyms Horseradish-Peroxidase am Antigen erhöht. Dadurch erhöht sich die Intensität der peroxidase-detektierenden Färbelösungen.

Nach abgeschlossener Färbung der auf einem Objektträger befindlichen Gewebsschnitte müssen diese eingedeckt werden, um ein Ausbleichen der Präparate zu verhindern. Dies erfolgte in dieser Arbeit mittels Polyvinylalkohol. Danach können die vollständig ausgehärteten Präparate bei Raumtemperatur gelagert und im Hellfeld mikroskopisch untersucht werden.

3 Ergebnisse

3.1 Klassifikation der Reporter-Mäuse

Zum Nachweis, dass das zu untersuchende Gen tatsächlich im Mausgenom vorhanden ist, wurde in dieser Arbeit eine PCR, wie unter 2.2.1 beschrieben, durchgeführt. Dies dient vor allem der Probenauswahl, um methodische Fehler im Sinne einer falschen Versuchstierauswahl zu minimieren.

3.1.1 Mauslinie zur Untersuchung der *Lphn2*-Expression

Bei den *Lphn2*-Knockin-Mäusen handelt es sich um eine gentechnisch modifizierte Mauslinie zur Detektion der *Lphn2* Expression. Hierzu wurde mittels homologer Rekombination dem *Lphn2*-Gen eine Sequenz eines Markerproteins namens *mVenus* hinzugefügt. Dieses Markerprotein, welches sich von GFP ableitet, das in Quallen der Gattung *Aequorea victoria* entdeckt wurde, dient als Epitop für Antikörper zur Detektion der modifizierten *Lphn2*-Proteine analog zu Kapitel 2.2.3. Diese Mauslinie wurde mittels homologer Rekombination an embryonale Stammzellen hergestellt und mir von Dr. Maxeiner zur Verfügung gestellt [1].

Zur Klassifikation der Mauslinie wurde in dieser Arbeit eine PCR mithilfe von DNS-Proben aus Schwanzspitzen der zu untersuchenden Mäuse angefertigt (Abb. 4.1). Zur Vergleichbarkeit wurden sowohl eine Negativ- als auch eine Positivkontrolle hinzugefügt, um Missinterpretationen zu vermeiden. Mithilfe der Positivkontrolle gelingt die Zuordnung der hetero- bzw. homozygoten Mäuse bzgl. des modifizierten *Lphn2*-Gens. Mäuse ohne das modifizierte *Lphn2*-Allel sind anhand der Negativkontrolle als Wildtyp zu identifizieren. Des Weiteren wurde zur Detektion von möglichen Verunreinigungen eine PCR-

Reaktion mit H₂O statt Probenmaterial hinzugefügt. Somit ergibt sich beispielsweise für die Mäuse #3, 5-11, 14 und 16 eine heterozygote und für die Maus #13 eine homozygote Ausprägung des modifizierten *Lphn2*-Gen. Die Mäuse #1-2,4,12 und 15 entsprechen auf *Lphn2* bezogen einem Wildtyp.

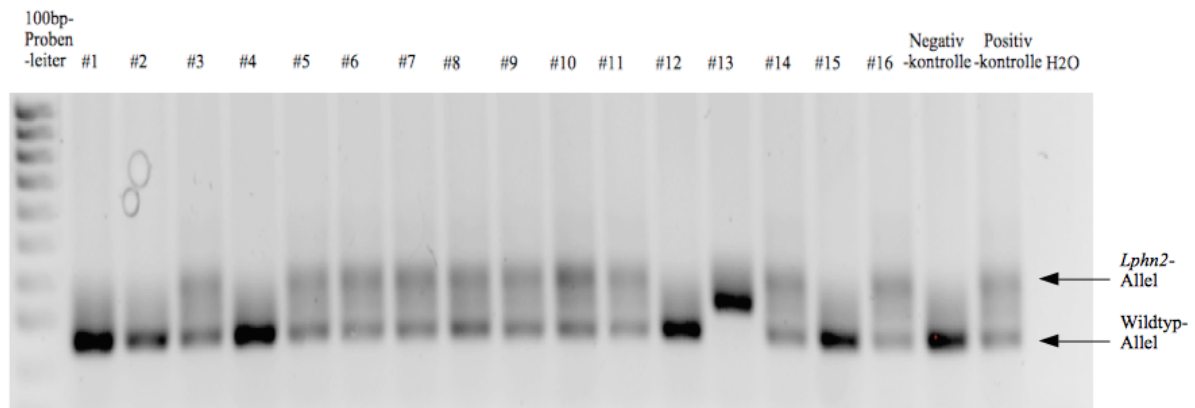


Abb. 3.1: Genotypisierung der Mäuse #1-16. Repräsentative PCR-Analyse der DNS aus Gewebeprobe von verschiedenen Mäusen. Anhand des Vergleichs der Proben mit der Positiv- und Negativkontrolle gelingt die Zuordnung des Genotyps. Im Vergleich mit der Positiv- und Negativkontrolle ergibt sich für die Proben #1-2,4, 12 und 15 eine Wildtypsituation. Bei den Proben #3,5-11,14 und 16 zeigt sich eine heterozygote Ausprägung des ca. 400 bp großen *Lphn2*-Gens. Bei Probe #13 handelt es sich um eine homozygote *Lphn2*-Maus.

3.1.2 Mauslinie zur Untersuchung der *Lphn3*-Expression

Bei den *Lphn3*-Knockin-Mäusen handelt es sich um eine gentechnisch modifizierte Mauslinie zur Detektion der *Lphn3* Expression. Hierzu wurde mittels Rekombinasen dem *Lphn3*-Gen eine Sequenz eines Markerproteins namens *Hämagglutinin (HA)* hinzugefügt. Dieses Markerprotein dient als Epitop für Antikörper zur Detektion der modifizierten *Lphn3*-Proteine analog zu Kapitel 2.2.3. Diese Mauslinie wurde mittels homologer Rekombination an embryonale Stammzellen hergestellt und mir von Dr. Maxeiner zur Verfügung gestellt [43].

Analog zu 2.2.1 wurde die Klassifikation der *Lphn3*-Mäuse durchgeführt 3.2. Hierbei zeigt sich für die Mäuse #17-43 eine Homozygotie bezüglich des *Lphn3*-Gens.

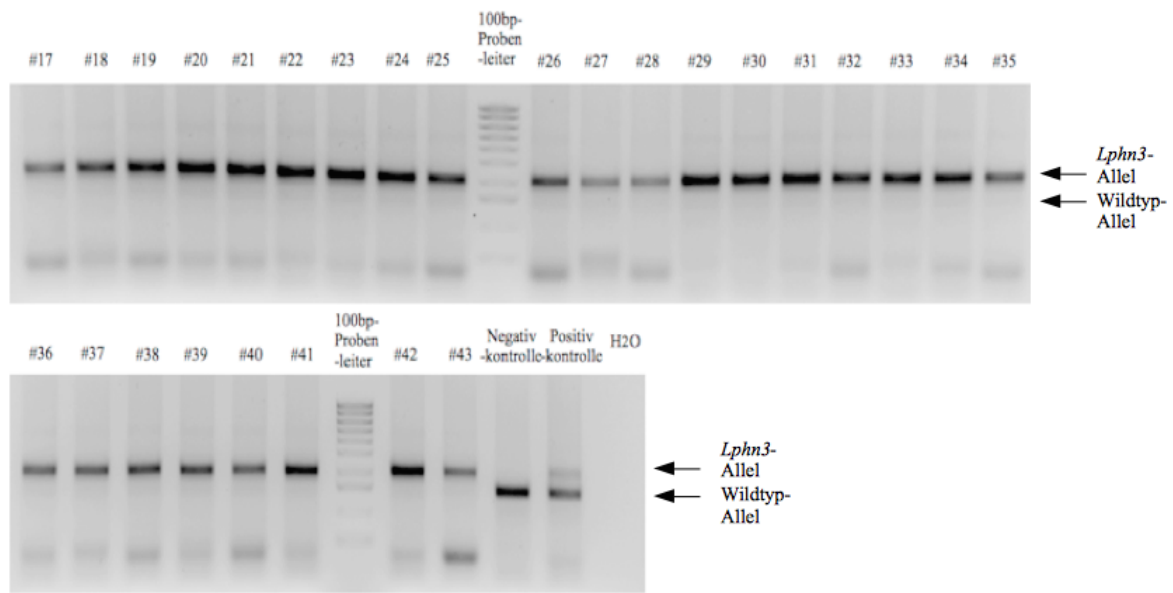


Abb. 3.2: Genotypisierung der Mäuse #17-43. Repräsentative PCR-Analyse der DNS aus den Schwanzspitzen verschiedener Mäuse angefertigt. Anhand des Vergleichs der Proben mit der Positiv- und Negativkontrolle gelingt die Zuordnung des Genotyps. Bei den Proben #17-43 zeigt sich eine homozygote Ausprägung des ca. 400bp großen *Lphn3*-Gens.

3.2 Untersuchung des *Lphn2*- und *Lphn3*-mRNA-Gehaltes

Wie bereits unter 1.2 beschrieben, ist das Kernstück dieser Arbeit die Untersuchung der Latrophiline in extraneuronalen Geweben. Da ein auf dem DNS-Doppelstrang kodiertes Gen nicht zwangsläufig ubiquitär transkribiert wird, sollte zusätzlich zum qualitativen Nachweis des Allels ein quantitativer Nachweis der Transkriptmengen in ausgewählten Geweben erfolgen. Nach der Identifikation der *Lphn2*- und *Lphn3*-Reporterermäuse auf kodierender Ebene wurde in dieser Arbeit ein Überblick der Transkriptmengen mittels qRT-PCR, wie unter 3.2.2 beschrieben, sowohl für *Lphn2* als auch *Lphn3* geschaffen. Um quantitative Aussagen treffen zu können, müssen die Proben mit sogenannten "Housekeeping – Genen" verglichen werden. "Housekeeping – Gene" sind Gene, die konstitutiv in allen Zellen zur Aufrechterhaltung der Basisfunktionen exprimiert werden. Dadurch dienen sie der internen Kontrolle, um Ungenauigkeiten durch fehlerhaftes Pipettieren oder Unterschiede in den Ausgangsmengen zu minimieren. In dieser Arbeit wurden alle Proben zu Aktin (*Actb*) in Relation gesetzt. Des Weiteren dienen die bereits beschriebenen Gewebe des ZNS [17] als Referenzproben, wodurch eine Abschätzung der relativen Transkriptmengen extraneuronaler Gewebe ermöglicht wird.

3.2.1 Relative Quantifizierung der *Lphn1*-Transkriptmengen

Als Referenz zu den folgenden Untersuchungen wurde das bereits in zahlreichen Voruntersuchungen gut beschriebene *Lphn1* reevaluiert [5]. Somit konnten die erbrachten Ergebnisse nicht nur als rein quantitative Größe erfasst werden, sondern standen im Kontext zu bereits gewonnen Erkenntnissen. So zeigten sich große Transkriptmengen in neuronalen Geweben wie Gehirn, Retina und Rückenmark im Vergleich zu den extraneuronalen Geweben Hypophyse, Herz, Nebenniere, Niere und Lunge.

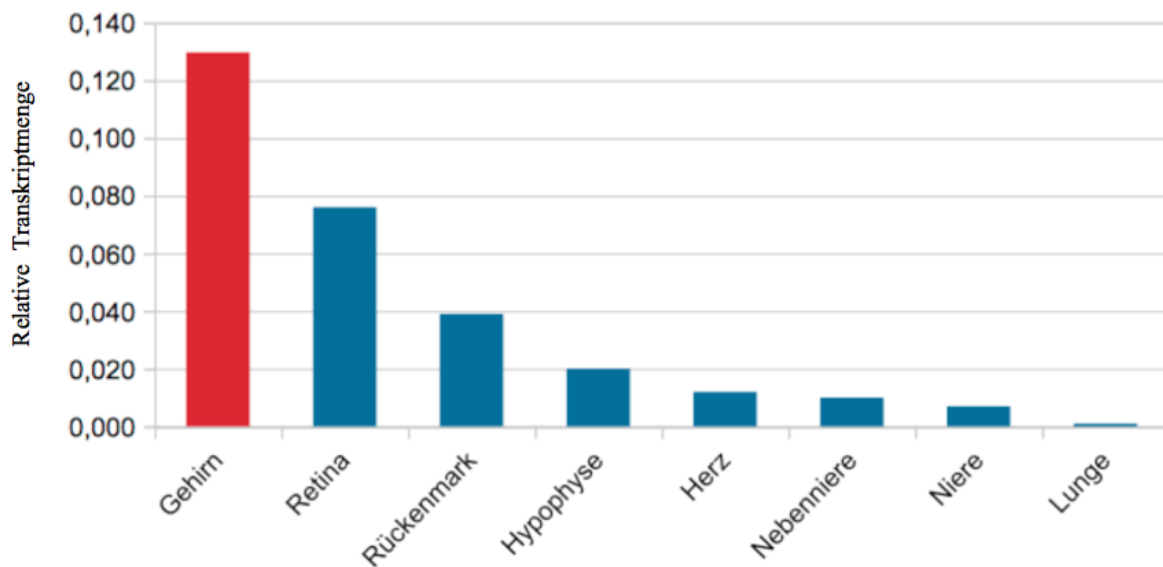


Abb. 3.3: Übersicht der *Lphn1*-Transkriptmengen unterschiedlicher Gewebe relativ zu Aktin. Gewebe mit sehr hoher *Lphn1*-Transkriptmengen (> 10%): Gehirn. Gewebe mit hoher *Lphn1*-Transkriptmengen (2,5-10%): Retina und Rückenmark. Gewebe mit mittlerer bis geringer *Lphn1*-Transkriptmengen (<2%): Hypophyse, Herz, Nebenniere, Niere und Lunge. Wildtyp-Mäuse (C57BL/6, n=1) von S. Maexiner zur Verfügung gestellt

3.2.2 Relative Quantifizierung der *Lphn2*-Transkriptmengen

3.2.2.1 Auswahl geeigneter Primerpaare zur Quantifizierung der *Lphn2*-Transkriptmengen

Wie bereits unter 2.2.2.1 beschrieben, benötigt man zur qRT-PCR hochspezifische Primer zur spezifischen Quantifizierung von RNS. Aus teils theoretischen Überlegungen und teils experimentellen Ergebnissen geht hervor, dass *Lphn2* in unterschiedlicher Variation genetisch kodiert auf Chromosom 3 in *Mus musculus* vorliegt. Darum wurde mithilfe der NCBI-Datenbank aus allen putativen Splicevarianten ein repräsentativer Genabschnitt auf Chromosom 3 in *Mus musculus* gewählt, der möglichst all diese Varianten abdeckt. Abb.3.4 zeigt einen Ausschnitt der NCBI-Datenbank und den daraus gewählten Abschnitt (rot umrandet) für das Design der Primer.

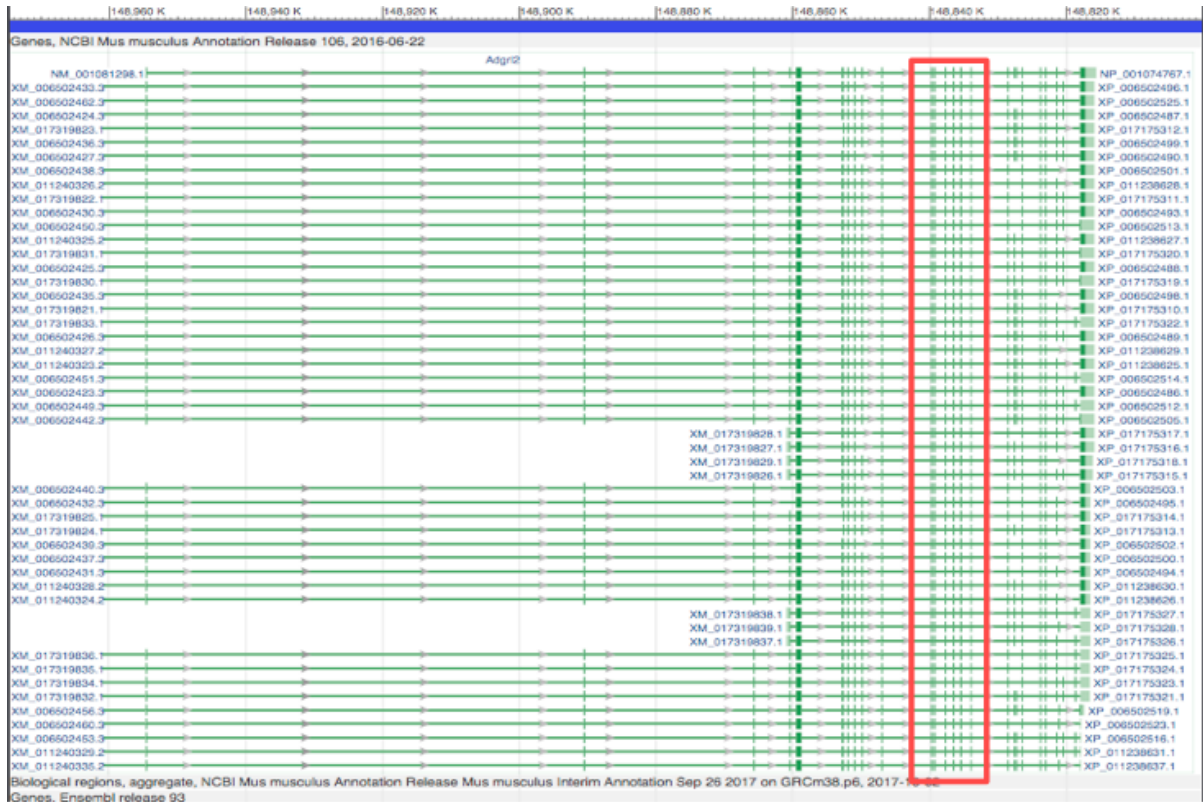


Abb. 3.4: Ausschnitt der NCBI Datenbank bezüglich der putativen Splicevarianten von *Lphn2* auf Chromosom 3 in *Mus musculus* [10]. Die horizontalen grünen Linien stehen jeweils für eine theoretisch mögliche Splicevariante von *Lphn2*, wobei die vertikalen grünen Striche kodierende Genabschnitte (Exone) repräsentieren. Dazwischenliegend die nicht-kodierenden Genabschnitte (Introne). Somit umrandet das rote Kästchen einen Genabschnitt von möglichst vielen Exonen, die in allen zum Teil theoretisch ermittelten Splicevarianten vorhanden sind. Die Übersicht findet man unter der *Gene ID:99613*

3.2.2.2 qRT-PCR zur relativen Quantifizierung von *Lphn2*

Ein Ziel dieser Arbeit war vor allem die Kartierung der extraneuronalen Gewebe bezüglich ihrer *Lphn2* - Konzentration. Somit wurde an dieser Stelle ein Screening der Gewebe mittels qRT-PCR auf *Lphn2* durchgeführt und dessen Resultate mit den Ergebnissen der neuronalen Gewebe verglichen. Abb. 3.5 und 3.6 bieten einen Überblick dieser Ergebnisse.

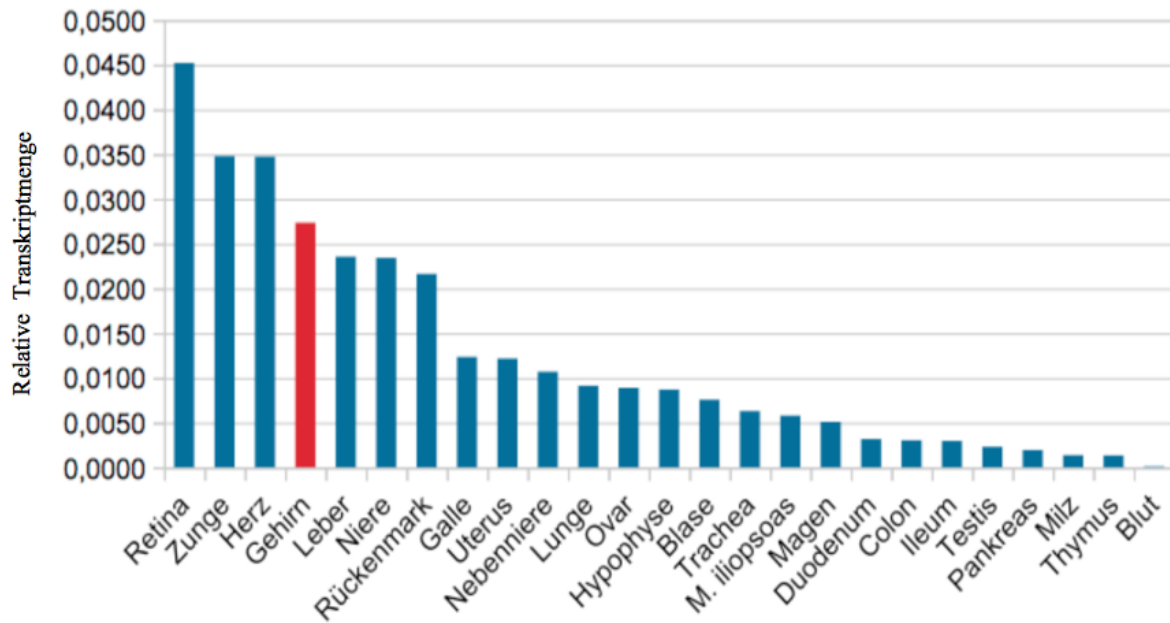


Abb. 3.5: Übersicht der *Lphn2*-Transkriptmengen unterschiedlicher Gewebe relativ zu Aktin. Gewebe mit relativ zu den übrigen Proben sehr hohen *Lphn2*-Transkriptmenge (> 4%): Retina. Gewebe mit relativ hoher *Lphn2*-Transkriptmenge (3-4%): Zunge, Herz und Gehirn. Gewebe mit mittlerer *Lphn2*-Transkriptmenge (2-3%): Leber; Niere und Rückenmark. Gewebe mit relativ geringer *Lphn2*-Transkriptmenge (1-2%): Galle, Uterus, Nebenniere, Lunge, Ovar, Hypophyse, Blase, Trachea und M. iliopsoas. Gewebe mit relativ sehr geringer *Lphn2*-Transkriptmenge (<1%): Magen, Duodenum, Colon, Ileum, Testis, Pankreas, Milz, Thymus und Blut. *Lphn2*-Gen modifizierte Mäuse (B6;129S6-Adgr12^{tm1sud/J}, n=1) von S. Maxeiner zur Verfügung gestellt.

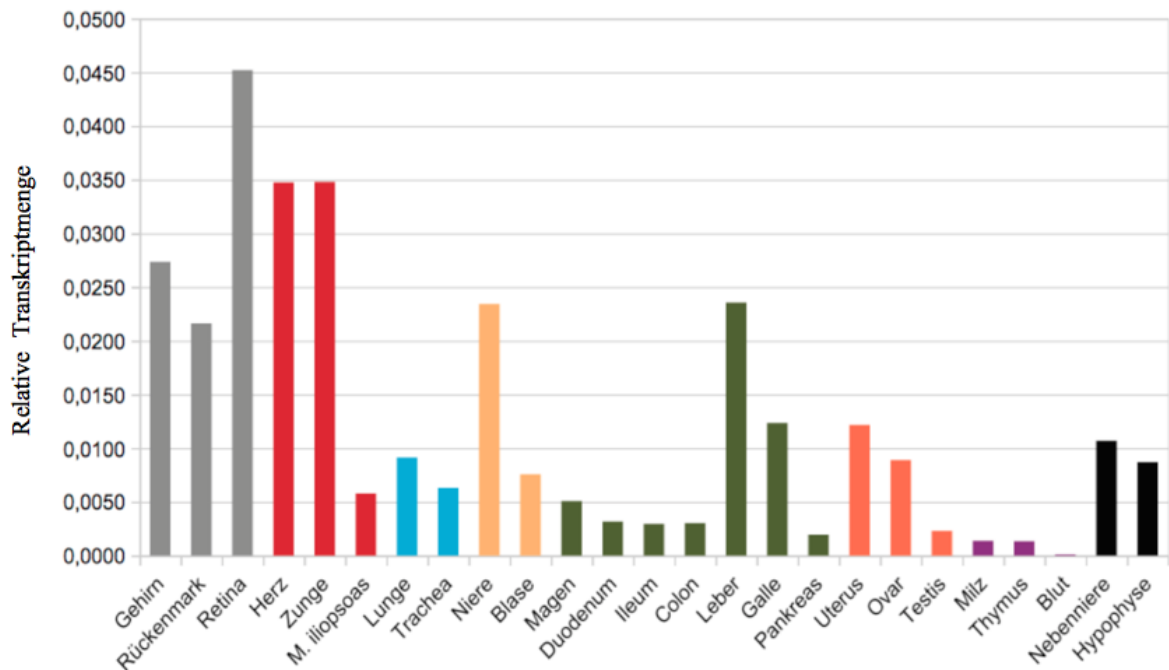


Abb. 3.6: Vergleich unterschiedlicher Gewebetypen bzgl. der *Lphn2*-Transkriptmengen relativ zu Aktin (*Actb*). Grau: Neuronale Gewebe. Rot: Muskuläre Gewebe. Blau: Respiratorische Gewebe. Gelb: Gewebe der ableitenden Harnwege. Grün: Gewebe des Gastrointestinaltraktes. Orange: Genitalorgane. Lila: Lymphatische Gewebe. Schwarz: Hormonaktive Gewebe. *Lphn2*-Gen modifizierte Mäuse (B6;129S6-Adgr12^{tm1sud/J}, n=1) von S. Maxeiner zur Verfügung gestellt.

Hier zeigte sich gemäß der Erwartung aus Vorarbeiten [5] eine ausgeprägte Präsenz von *Lphn2* in neuronalen Geweben wie Gehirn und Retina. Überraschenderweise zeigte sich eine relativ große Menge an *Lphn2*-mRNA in Zungengewebe, wohingegen in anderen extraneuronalen Geweben verhältnismäßig wenig *Lphn2*-mRNA zu finden war. Da jedoch eine reine mRNA-Produktion nicht zwangsläufig zu großen Mengen von Proteinexpression führt, wurde dies unter 3.3.1 und 3.4 genauer untersucht. Eine quantitativ ähnlich stark ausgeprägte *Lphn2*-mRNA-Produktion zeigte sich in den Geweben Herz, Leber und Niere. Dies entspricht ebenfalls den Erkenntnissen aus Voruntersuchungen [5].

3.2.3 Relative Quantifizierung der *Lphn3*-Transkriptmengen

Ein weiterer elementarer Bestandteil dieser Arbeit war es, extraneuronale Gewebe bezüglich ihrer *Lphn3*-Konzentration zu untersuchen. Auch hier ergab sich aus Vorun-

tersuchungen eine starke Produktion von *Lphn3*-mRNA in neuronalen Geweben [17]. Dies bestätigte sich auch in den Untersuchungen dieser Arbeit. So zeigte sich *Lphn3*-mRNA ausgeprägt in Retina, Gehirn und Rückenmark. Abb. 3.7 bietet einen Überblick über die *Lphn3*-mRNA-Mengen in allen untersuchten Geweben.

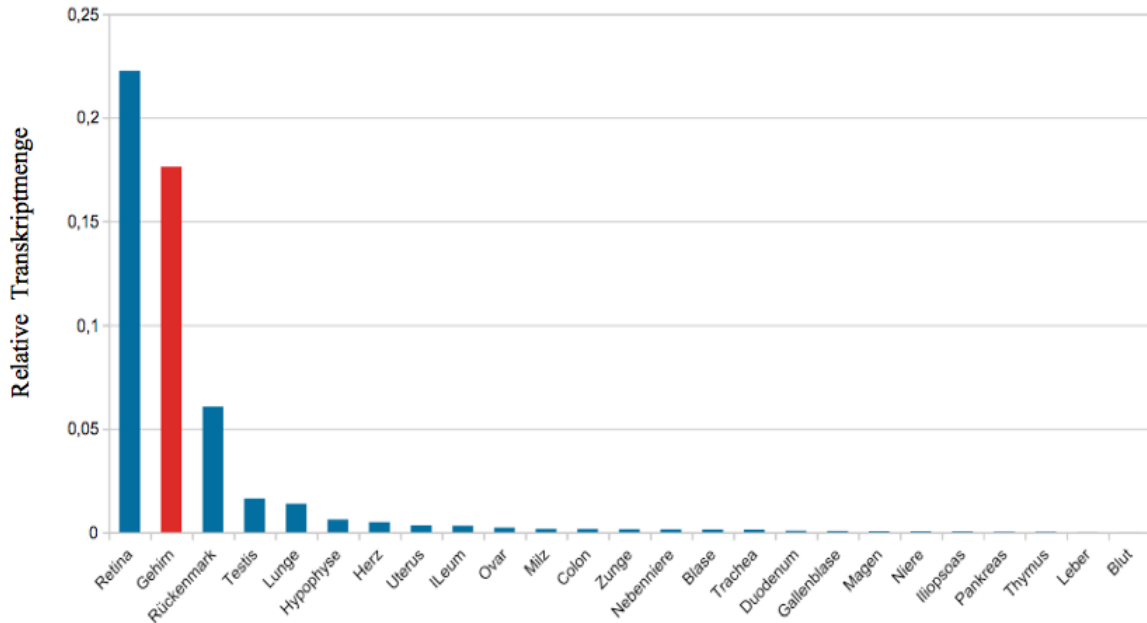


Abb. 3.7: Übersicht der *Lphn3*-Transkriptmengen unterschiedlicher Gewebe relativ zu Aktin. Gewebe mit relativ zu den übrigen Proben sehr hohen *Lphn3*-Transkriptmengen (> 15%): Retina und Gehirn. Gewebe mit relativ hohen *Lphn3*-Transkriptmengen (5%): Rückenmark. Die übrigen untersuchten Gewebe zeigten lediglich relativ geringe bis mittlere *Lphn3*-Transkriptmengen (<5%). *Lphn3*-Gen modifizierte Mäuse (B6;129S6Adgr13^{tm1sud/J}, n=1) von S. Maxeiner zur Verfügung gestellt.

Zur differenzierteren Betrachtung wurden in Abb. 3.8 die *Lphn3*-mRNA-Mengen in ausschließlich extraneuronalen Geweben aufgetragen. Hier zeigte sich im Verhältnis zu anderen extraneuronalen Geweben ein relativ höherer Gehalt an *Lphn3*-mRNA in Lungengewebe. Dies deckt sich mit Erkenntnissen aus früheren Arbeiten, die *Lphn3* mit Lungenerkrankungen wie Asthma bronchiale in Verbindung gebracht haben [34]. Überraschend war hier die relativ starke Produktion von *Lphn3*-mRNA in testikulärem Gewebe.

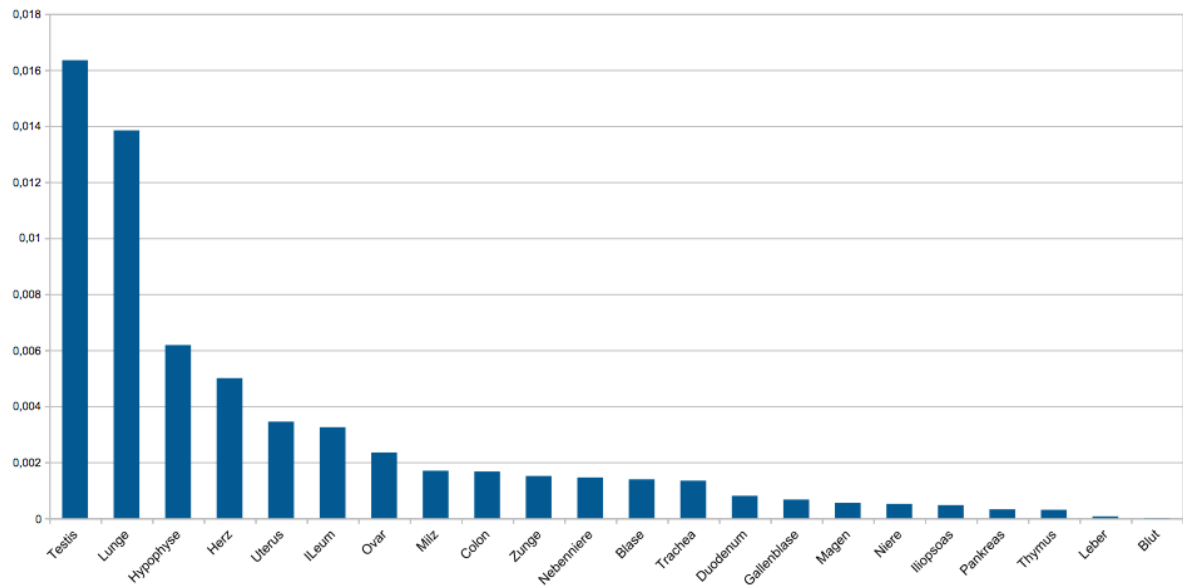


Abb. 3.8: Übersicht der *Lphn3*-Transkriptmengen extraneuronaler Gewebe relativ zu Aktin. Da *Lphn3* vor allem in zentralnervösen Geweben exprimiert wird, dient diese Abbildung zur besseren Vergleichbarkeit extraneuronaler Gewebe mit mittlerer und niedriger Expressionsstärke. Zu sehen sind die relativ hohen *Lphn3*-Transkriptmengen (>1%) in der Lunge und den Testikeln. Niedrigere Konzentrationen (0,5-1 %) zeigen sich in den Geweben Herz und Hypophyse. In den übrigen untersuchten Geweben konnten sich nur geringste Konzentrationen (<0,5%) der *Lphn3*-Transkriptmengen nachweisen lassen. *Lphn3*-Gen modifizierte Mäuse (B6;129S6Adgr13^{tm1sud/J}, n=1) von S. Maxeiner zur Verfügung gestellt.

3.3 Proteinanalytik von *Lphn2* und *Lphn3*

Da nicht jedes transkribierte Gen zwangsläufig translatiert wird, müssen die mittels qRT-PCR erhobenen Daten verifiziert werden. Der Nachweis von Proteinen bzw. der Lathrophiline in unterschiedlichen Geweben erfolgte in dieser Arbeit mittels des sogenannten Immunoblottings, wie unter 2.2.3 beschrieben. Zur Interpretation des Immunoblots ist es wichtig, die Molekülmasse des zu untersuchenden Proteins zu ermitteln. Aufgrund der autoproteolytischen Spaltung der *Lphn* ergibt sich für die beiden *Lphn*-Varianten unterschiedliche Molekülmassen und damit auch verschiedene Laufzeiten im Agarosegel (Vgl. Abb. 3.9). Somit erwarten wir, wie unter 1.2.1 beschrieben, eine positive Bande für *Lphn2* bei 40-90 kDa und *Lphn3* bei 110-140 kDa. Zur Gewährleistung der internen Validität wurde, wie bereits bei der Analyse der mRNA-Transkriptmengen geschehen, das in früheren Arbeiten (Anderson et al 2017) beschriebene Hirngewebe als Referenz mituntersucht.

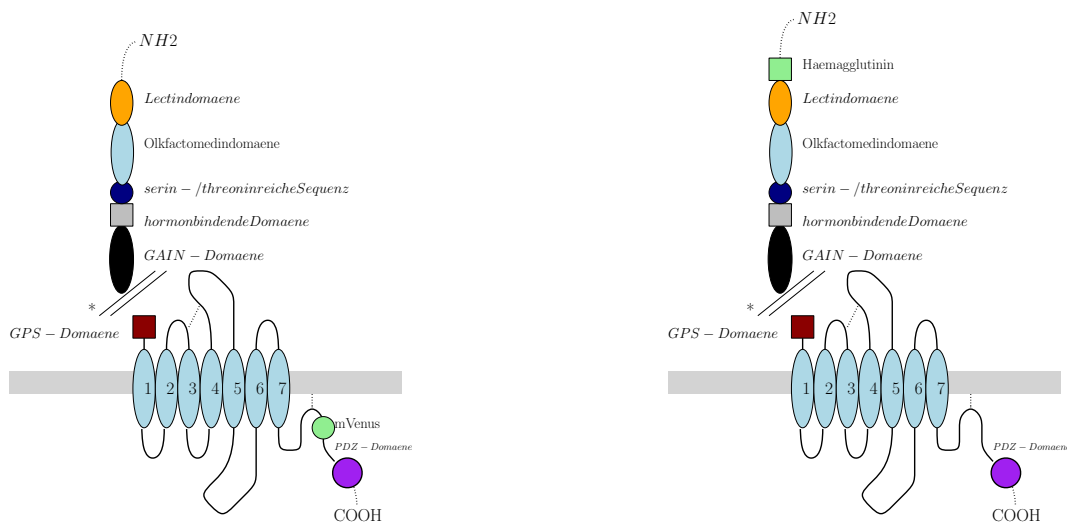


Abb. 3.9: Autoproteolyse von *Lphn2* und *Lphn3*. Autoproteolytische Spaltung der *Lphn* an der GPS-Domäne (*). Entsprechend der genetischen Modifikationen entstehen unterschiedliche Spaltprodukte bei der Autoproteolyse. Am C-terminus befindet sich die *mVenus*-Modifikation von *Lphn2* und am N-terminalen Ende die *HA*-Modifikation von *Lphn3*. Somit ergibt sich zur Detektion von *Lphn2* ein relativ niedermolekulares und für *Lphn3* ein relativ höhermolekulares Spaltprodukt.

3.3.1 *Lphn2*-Expression unterschiedlicher Gewebe

Aus der Analyse der mRNA unterschiedlicher Gewebe ergab sich die Erkenntnis, dass große *Lphn2*-Transkriptmengen in den Geweben Leber, Niere und Zunge zu finden sind. Mittels Immunoblot konnte diese Erkenntnis auf translationaler Ebene bestätigt werden. Hierzu wurden in dieser Arbeit interessante Gewebe, die bereits in Vorarbeit von Maxeiner et al [17] auf transkriptioneller Ebene nachgewiesen wurden, mittels spezifischer Proteinanalyse untersucht. Wie unter 2.1.8 beschrieben, wurde das *Lphn2*-Gen der untersuchten Mäuse so modifiziert, dass am intrazellulären Abschnitt die GFP-Variante mVenus zusammen mit *Lphn2* abgelesen und konsekutiv exprimiert wird. Somit gelang der Nachweis von *Lphn2* über Antikörper, die spezifisch gegen GFP gerichtet sind. Abb. 3.10 zeigt die *Lphn2*-Expression in intraneuronalen und extraneuronalen Geweben.

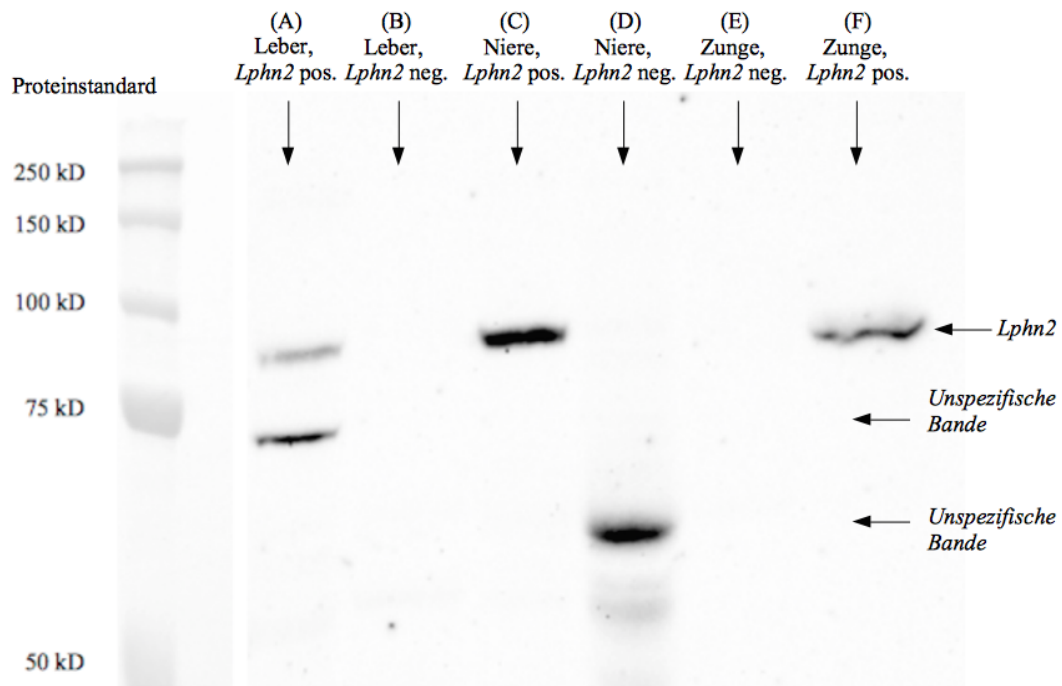


Abb. 3.10: SDS-Gelelektrophorese: anti-GFP-Ak (1:2000), bei RT. *Lphn2*-Expression unterschiedlicher Gewebe. In den Geweben Leber (A), Niere (C) und Zunge (F) zeigten sich positive Banden bei 90 kDa, was dem zu erwartenden Molekulargewicht von *Lphn2* entspricht. Wie unter 2.2.3 beschrieben, wurden als Negativkontrollen zusätzlich die Proben des genetischen Wildtyps mitaufgetragen. Probe B dient hierbei als Negativkontrolle zur Leber, Probe D zur Niere und Probe E zur Zunge.

So findet man ähnlich starke Banden in den extraneuronalen Geweben Niere, Leber

und Zunge wie in neuronalem Gewebe (siehe hierzu Abb.3.10 und 3.11). Zusätzlich zu den Geweben *Lphn2*-positiver Mäuse wurden parallel Proben von Wildtypmäusen untersucht. Im direkten Vergleich erkennt man positive Banden im zu erwartenden Spektrum von 90-100 kDa, die sich in den Wildtypproben nicht widerspiegeln. Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich *Lphn2*-Proteine nicht nur innerhalb des ZNS sondern auch in den Geweben Leber, Niere und Zunge ausgeprägt wird.

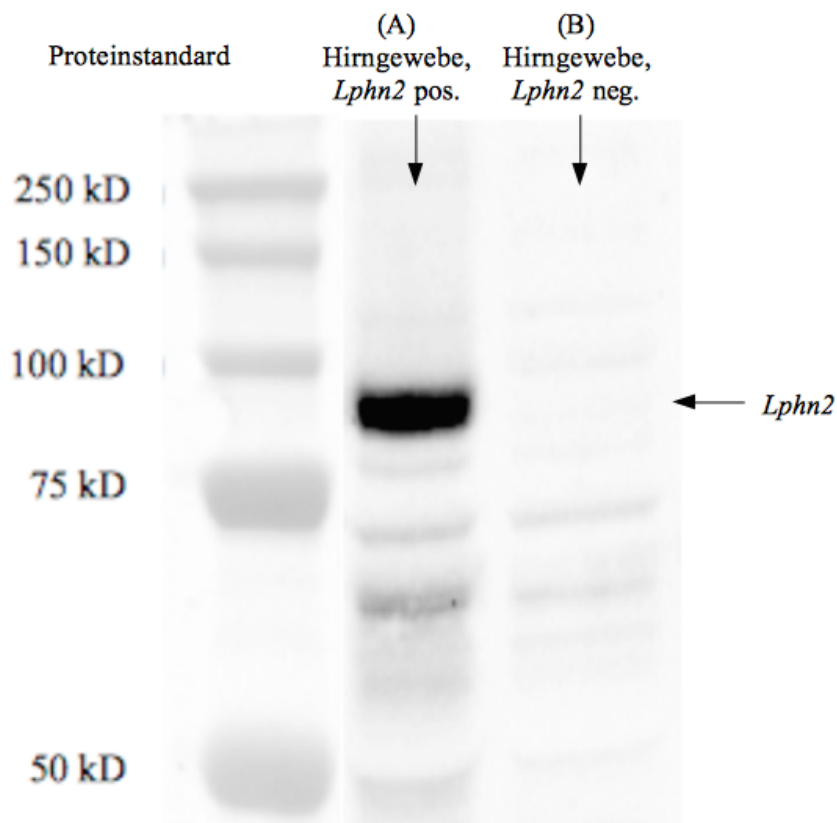


Abb. 3.11: Immunoblot: anti-GFP-AK (1:2000), bei RT. *Lphn2*-Expression in Hirngewebe. Zur Verifizierung der Ergebnisse der Abb.3.6 wurden Hirnproben der *Lphn2*-Reportertermäuse als Referenzgewebe entsprechend 2.2.3 analysiert. Hierbei zeigte sich analog zu Abb.3.6 eine positive Bande bei 90 kDa, die sich anhand der Negativkontrolle (B) als spezifische Bande identifizieren ließ.

Wie bereits unter 3.2.2 beschrieben, war vor allem die Präsenz von *Lphn2* in der Zunge von besonderem Interesse, da diese bisher in keiner vorherigen Arbeit beschrieben wurde.

3.3.2 Etablierung des HA-Antikörpers zur *Lphn3*-Detektion

Zur Visualisierung von Proteinen auf der Nitrocellulosemembran müssen diese mittels spezifischen Antikörpern markiert werden, die wiederum in einer Folgereaktion ein detektierbares Signal emittieren. Ein wichtiger Schritt zur Gewährleistung der Sensivität der Antikörper ist die Ermittlung der optimalen Temperatur, da Membranproteine zur Aggregation neigen und deren Epitope damit unzugänglich für die Antikörper werden. Bis dato wurden diese Verfahren für die *HA*-Antikörper, im Gegensatz zu *mVenus*-Antikörpern für *Lphn2*, noch nicht etabliert. Um hier optimale Bedingungen zu schaffen, wurden Hirnproben unterschiedlich erhitzt und anschließend analog zu Kap. 2.2.3 aufgetrennt und mithilfe des HA-Antikörpers sichtbar gemacht (siehe Abb.3.12). Wie bereits unter 2.1.8 beschrieben, wurde das *Lphn3*-Gen so modifiziert, dass am intrazellulären N-Terminus das *Lphn3*-Gen zusammen mit einem Hämagglutinin-Epitop abgelesen und somit exprimiert wird. Zur Gewährleistung der externen Validität wurde hier ein HA-Antikörper gewählt, der bereits in Vorarbeiten von *Sando et al* benutzt wurde [43].

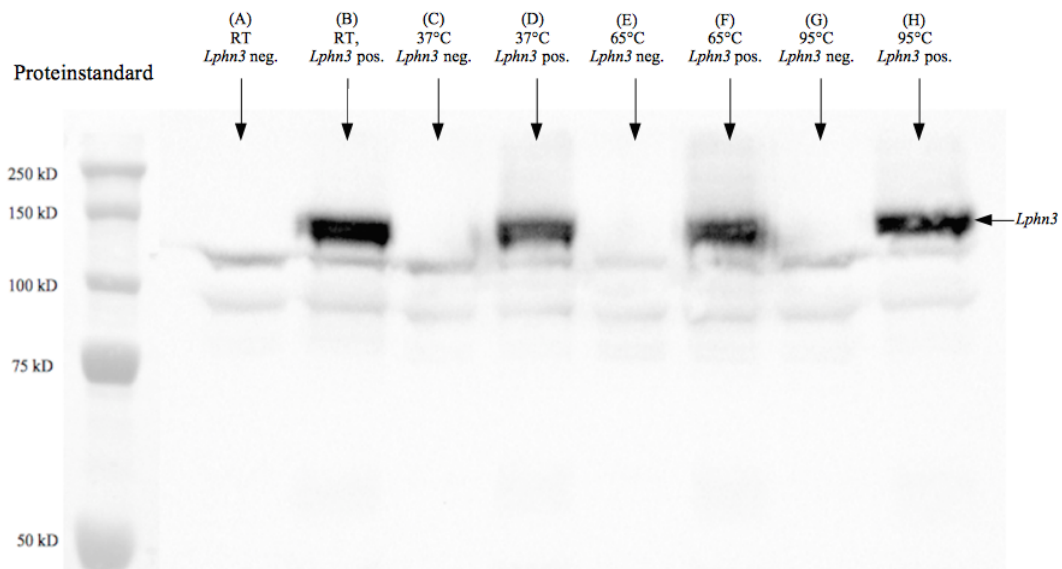


Abb. 3.12: Immunoblot: anti-HA-AK (1:1000). *Lphn3*-Expression in Hirngewebe zur Etablierung des Temperaturoptimums. Die Abbildung stellt Hirngewebe mit unterschiedlichem Erhitzungsgrad dar. Die Proben B, D, F und H entstammen jeweils einer *Lphn3*-Reportermaus. Die Proben A, C, E und G dienen als Negativkontrolle von Wildtypmäusen. A und B: Hirngewebe bei Raumtemperatur. C und D: Hirngewebe bei 37°C. E und F: Hirngewebe bei 65°C. G und H: Hirngewebe bei 95°C. Die Proben der *Lphn3*-Reportermaus zeigen positive Signale bei ca. 140 kDa, die in der jeweiligen Negativkontrolle nicht auftauchen.

Da keine signifikanten Unterschiede in der Signalstärke der unterschiedlich erhitzten Proben zu erkennen sind, aber die Hintergrundsignale bei 95° am geringsten ausgeprägt sind, wurden alle folgenden Arbeiten mit dem HA-Antikörper bei 95° durchgeführt. Eine weitere Möglichkeit zur Reduktion von Hintergrundsignalen ist, eine optimale Verdünnung des Antikörpers zu wählen. Hierbei sollte der Antikörper so verdünnt werden, dass er gerade noch an spezifische, nicht aber an unspezifische Bindungsstellen bindet. Wie in Abb. 3.13 zu sehen ist, wurde hierzu eine Verdünnungsreihe des HA-AK erstellt und mit Hirngewebe nach vorherigem "Blotting" inkubiert.

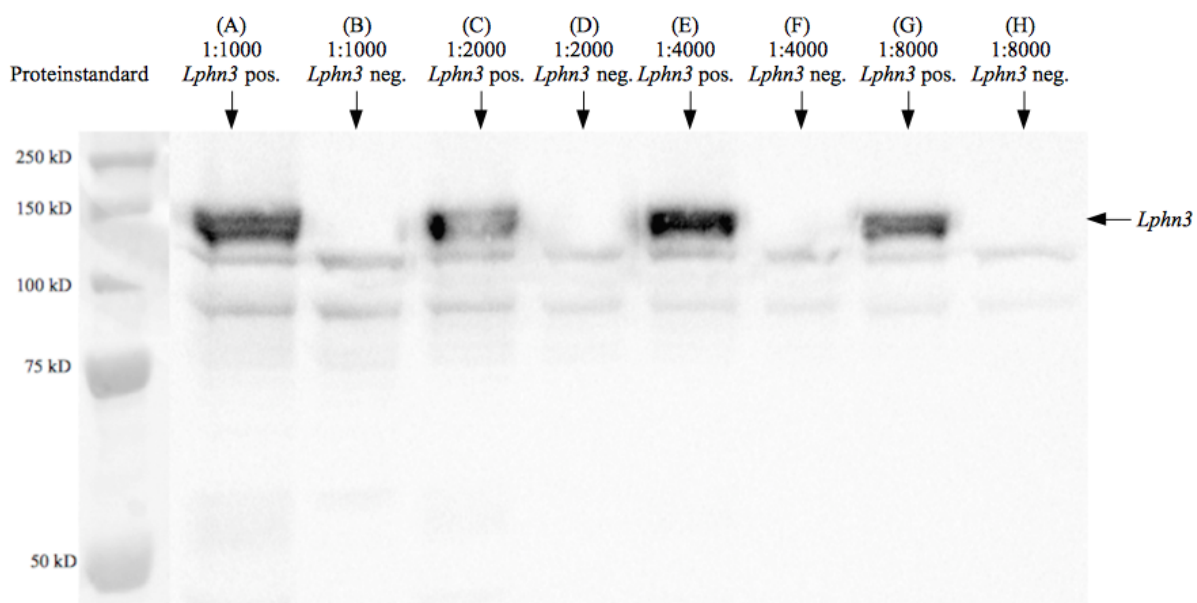


Abb. 3.13: Immunoblot: Anti-HA-AK, bei RT. *Lphn3*-Expression in Hirngewebe bei unterschiedlicher Verdünnung des HA-Antikörpers. Verdünnungsreihe des HA-AK. Proben A und B: HA-AK 1:1000. Proben C und D: HA-AK 1:2000. Proben E und F: HA-AK 1:4000. Proben G und H: HA-AK 1:8000. Als Proben wurden Hirngewebe von *Lphn3*-Reporter-mäusen und des genetischen Wildtyps verwendet. Die Proben A, C, E und G entstammen *Lphn3*-Reporter-mäusen. Die Proben B, D F und H dienen als Negativkontrolle.

Somit ergibt sich ein geringeres Hintergrundsignal bei einer Verdünnung des HA-Antikörpers von 1:8000 bei durchaus vergleichbarer Signalintensität der *Lphn3*-Banden. Daraufhin wurden alle folgenden Analysen von *Lphn3* mit dem HA-Antikörper in 8000-facher Verdünnung durchgeführt. Hierbei wurde der Fokus auf extrakranielle Organsysteme gelegt und die Gewebe Lunge, Herz, Niere, Leber und Zunge untersucht (Abb.

3.14). Entsprechend den Ergebnissen aus der mRNA-Analyse konnte *Lphn3* vor allem in Lungengewebe detektiert werden. Diese Erkenntnis deckt sich mit Ergebnissen aus früheren Arbeiten, die *Lphn3* in Verbindung mit pulmonalen Erkrankungen wie Asthma bronchiale gebracht hatten [34].

3.3.3 *Lphn3*-Expression unterschiedlicher Gewebe

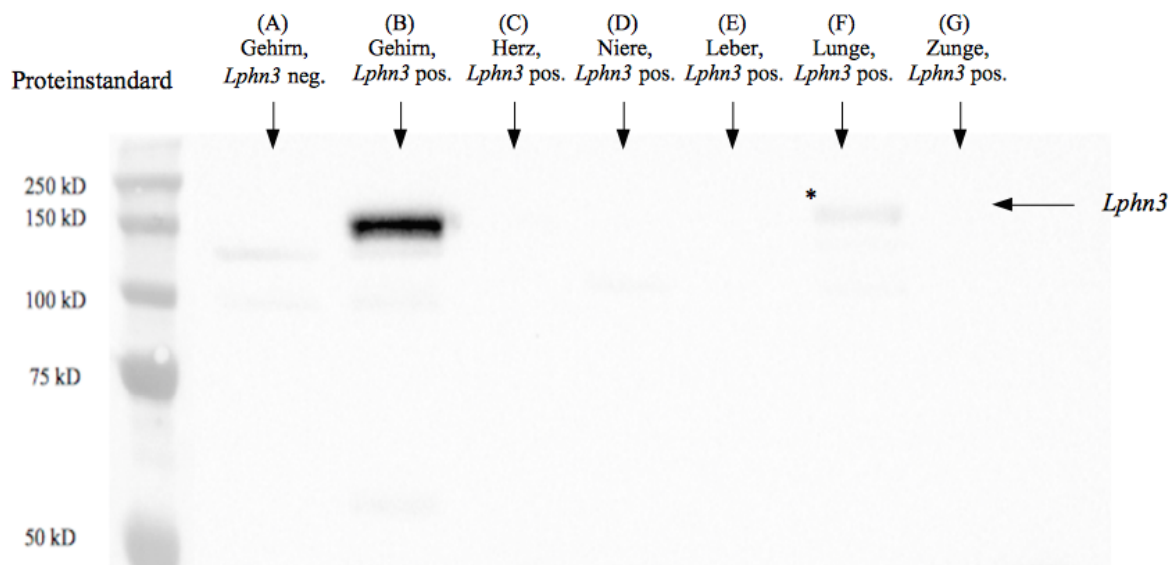


Abb. 3.14: Immunoblot: anti-HA-Ak (1:8000) bei 95°. *Lphn3*-Expression in unterschiedlichen Geweben. *Lphn3*-Expression in unterschiedlichen Geweben. Probe A: Hirngewebe des genetischen Wildtyps als Negativkontrolle. Gewebe B-G entstammen einer *Lphn3*-Reportermaus. Positive Bande bei 140 kDa in Hirngewebe (B) und Lunge* (F). Kein positives Signal in den restlichen untersuchten Geweben: Herz (C), Niere (D), Leber (E) und Zunge (G).

3.4 Histologischer Nachweis *Lphn2*

Wie unter 3.2.2 und 3.3.1 beschrieben, wird *Lphn2* in mehreren Organen sowohl transkribiert, als auch translatiert. In vorherigen Arbeiten wurden bisher Gewebe wie Herz, Hirn und Niere ausführlich untersucht. Neu jedoch ist das Vorkommen von *Lphn2* in der Zunge. Deshalb wurde an dieser Stelle die Zunge histologisch untersucht, um die Lokalisation und die Funktion des Proteins in diesem Gewebe beurteilen zu können. Abb. 3.15 zeigt einen histologischen Sagittalschnitt durch die Zunge einer *Lphn2-mVenus* positiven Maus (A, C und E) im Vergleich zu einer Wildtypmaus (B, D und F). Sowohl in 10-facher (A), als auch in 20-facher (C) und 40-facher Vergrößerung (E) erkennt man an der Basis der *Papillae filiformis* mittels IHC angefärbte *Lphn2-mVenus*-Fusionsprotein, die man in der Kontrollhistologie (B, D und F) nicht wiederfindet. Wie unter 2.2.4.1 beschrieben, wurde in dieser Arbeit mit spezifischen Antikörpern gegen die zu untersuchenden Proteine gearbeitet. In diesem Fall wurde ein Antikörper gegen GFP gewählt, da diese spezifisch an die GFP-Variante mVenus der *Lphn2*-positiven Maus bindet. Somit konnte gewährleistet werden, dass keine unspezifischen Signale detektiert werden und damit der Vergleich mit der Wildtypsituation den eindeutigen Nachweis von *Lphn2* im untersuchten Gewebe liefert.

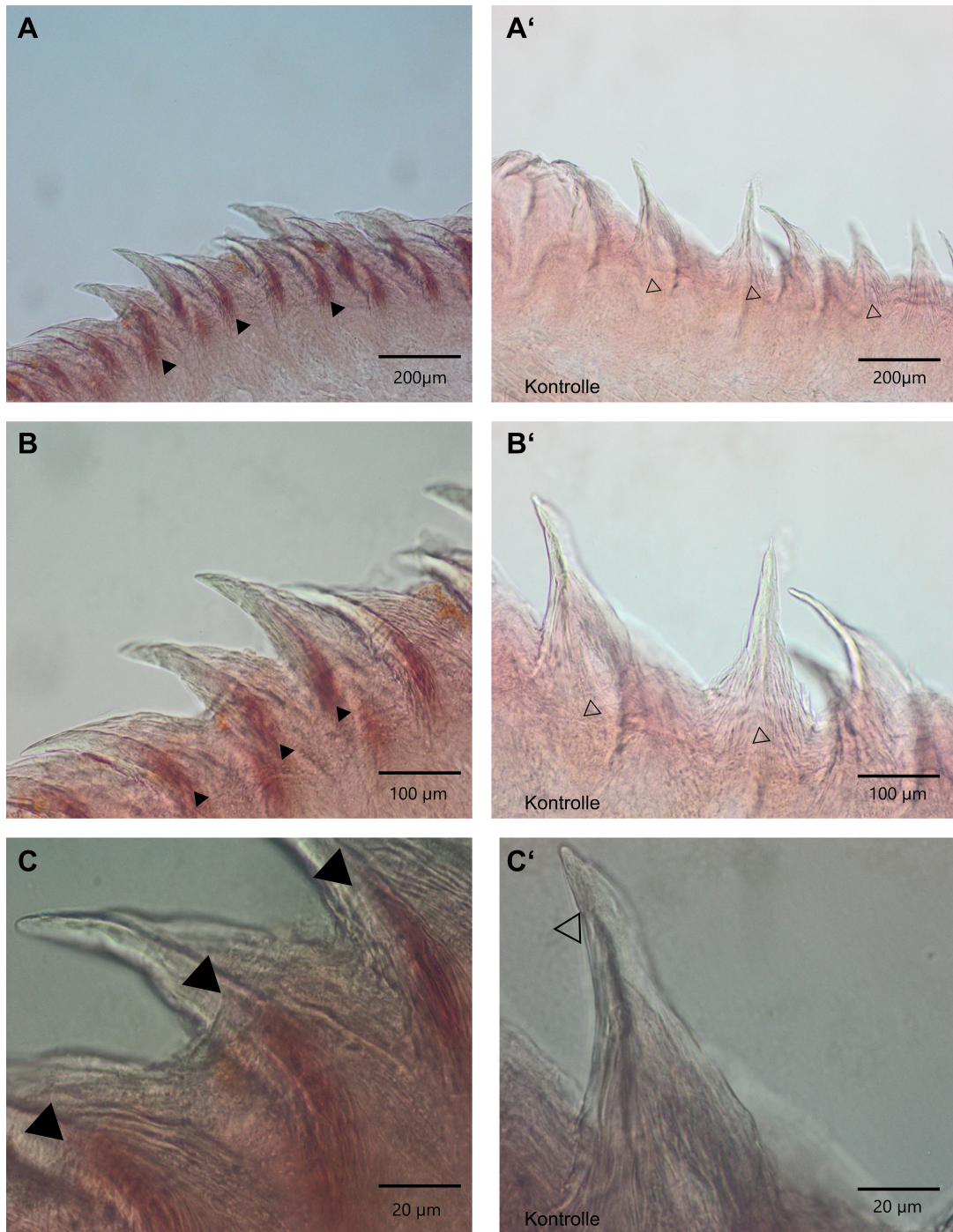


Abb. 3.15: Histologischer Nachweis von *Lphn2* an der Basis der *Papillae filiformis* der Zunge. Schwarze Pfeile zeigen in NovaRed angefärbte *Lphn2-mVenus*-Fusionsproteine. Weiße Pfeile weisen auf gleicher Position die ausbleibende Anfärbbarkeit der Wildtypproben. A: Histologie der Zunge einer *Lphn2-mVenus* positiven Maus in NovaRed (10-fach vergrößert). A': Histologie der Zunge einer Wildtypmaus in NovaRed (10-fach vergrößert). B: Histologie der Zunge einer *Lphn2-mVenus* positiven Maus in NovaRed (20-fach vergrößert). B': Histologie der Zunge einer Wildtypmaus in NovaRed (20-fach vergrößert). C: Histologie der Zunge einer *Lphn2-mVenus* positiven Maus in NovaRed (40-fach vergrößert). C': Histologie der Zunge einer Wildtypmaus in NovaRed (40-fach vergrößert).

4 Diskussion

4.1 Bedeutung der Auswahl geeigneter Primerpaare

Mithilfe der NCBI-Datenbank werden anhand eines Algorithmus alle putativen Spleißvarianten eines Gens vorhergesagt, die im Falle der *Lphn* noch in keinem konkreten Verfahren für alle *Lphn*-Varianten verifiziert wurden [5]. Beim Spleißen handelt es sich um einen Prozess, bei dem die Introns (nicht kodierende Abschnitte) der prä-mRNS herausgeschnitten und die Exons (kodierende Abschnitte) miteinander verknüpft werden. Somit entsteht die mRNS, die zur Herstellung von Proteinen weiterverarbeitet werden können. Jedoch sei an dieser Stelle betont, dass die Präsenz einer mRNS nicht zwangsläufig die Herstellung eines bestimmten Proteins bedeutet. Dies hat mehrere Gründe: Die mRNS muss nach ihrer Herstellung erst noch via Translation zu den fertigen Proteinen weiterverarbeitet werden. Dieser Prozess unterliegt eigenen Regulationsmechanismen und kann sich abhängig vom Gewebe und Umgebungsfaktoren, wie zum Beispiel pH-Wert oder Oxygenierung eines Gewebes, unterscheiden [33] [46]. Darüber hinaus steht nicht jede mRNS zwangsläufig für jeweils das gleiche Protein, da diese häufig posttranslational modifiziert werden und damit eine sowohl morphologische als auch funktionelle Varianz des Proteins entsteht [33]. Außerdem besteht die Möglichkeit, aus der prä-mRNA mittels alternativen Spleißens unterschiedliche mRNSs zu produzieren, die wiederum zur Herstellung unterschiedlicher Proteine weiterverarbeitet werden kann [33]. Aufgrund der veränderten Aminosäuresequenz nach Ablesen der alternativ gespleißten mRNS unterscheiden sich die Proteine in Konfiguration und/oder Länge. Die Proteine wiederum variieren in Abfolge ihrer Exone. In Vorarbeiten konnten für die *Lphn* bereits unterschiedliche Spleißvarianten mit sogar funktionellen Alterationen nachgewiesen werden [5] [25]. Da im Sinne eines Screeningverfahrens mehrere Organe mit unklarer Lokalisation, Funktion und

Struktur der *Lphn* untersucht wurden, wurde ein Abschnitt auf der DNA des *Lphn2*-Gens gewählt, welcher alle alternativen Spleißvarianten abdeckt. Würde man einen Genabschnitt wählen, bei dem nicht alle putativen Varianten abgedeckt würden, so hätten man ein unvollständiges Abbild beim Screening der Gewebe erstellt. Die aktuelle Kartierung erlaubt somit die Untersuchung der einzelnen Gewebe im Hinblick auf ganz bestimmte Spleißvarianten.

Mithilfe von individuellen Assays gegen bestimmte Varianten der *Lphn*-Gene ist es möglich, die Ausprägung bestimmter Spleißvarianten in den unterschiedlichen Organen zu untersuchen. Da sich die aus dem alternativen Spleißen resultierenden Proteine strukturell unterscheiden, wäre es via qRT-PCR und Proteinanalytik machbar, den verschiedenen Spleißvarianten eine bestimmte strukturelle Ausprägung und mögliche funktionelle Eigenschaft des konsekutiv entstehenden Proteins zuzuordnen. Dies wäre möglich aufgrund der veränderten elektrophoretischen Eigenschaften eines in Länge und/oder Konfiguration modifizierten Proteins. In der Agarose-Gelelektrophorese würden diese als positive Banden vor oder nach der in 3.10 und 3.11 dargestellten Position erscheinen. Somit könnte man die unterschiedlichen Spleißvarianten in den verschiedenen Organen in Korrelation mit dem daraus veränderten Protein untersuchen. Mithilfe dieser Ergebnisse wäre es möglich, den verschiedenen Organen bestimmte *Lphn2*-Varianten zuzuordnen, um der Funktion der unterschiedlichen Splicevarianten näher zu kommen. So zeigte sich beim *Screening* von *Lphn2* mittels qRT-PCR (vgl. Abb. 3.6) eine relativ ausgeprägte Präsenz von *Lphn2*-Transkripten sowohl in neuronalen Geweben als auch in den Geweben der Niere, Leber, Herz und Zunge. Der funktionelle Zusammenhang in diesen Geweben erscheint nicht ganz klar. Es liegt somit die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um mittels alternativen Spleißens modifizierte Proteine handeln könnte. Daraus resultierend erscheint es möglich, mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen bestimmte Splicevarianten von *Lphn2* die einzelnen Gewebe bezüglich der spezifischen Varianten zu untersuchen. Aus der Erkenntnis der Splicevarianten-Organ-Korrelation wäre eine Abschätzung der funktionellen Zusammenhänge der einzelnen Varianten denkbar. Somit könnte man die Funktion von *Lphn2* in den einzelnen Organen verständlicher machen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind im Fall von *Lphn2* gegen die *mVenus*-Modifikation gerichtet. *mVenus* wurde am intrazellulären C-terminus platziert, so-

dass diese wie in 1.4 ersichtlich nicht der Autoproteolyse von *Lphn* unterliegt. Somit erfassen die Antikörper gegen *Lphn2* alle putativen Varianten. Außerdem wurde *mVenus* so platziert, dass es sich bei den abgebildeten Proteinen weitestgehend um membranständige handeln muss. Dies wiederum ist von besonderer Bedeutung in Bezug auf die Entdeckung von *Lphn2* in der Zunge. Hier konnten wir, wie in 3.15 zu sehen, *Lphn2* als basales Protein an der Basis der *Papillae filiformis* identifizieren. Dies bekräftigt die Vermutung der Funktion von *Lphn2* als membranständiger Signaltransduktor der Zunge (vgl. Kap. 4.4).

4.2 Etablierung des HA-Antikörpers zum Nachweis von *Lphn3*

Zur Analyse von *Lphn3* wurde im Vorfeld dieser Arbeit mittels homologer Rekombination eine *Hämagglutinin* markierte Variante von *Lphn3* geschaffen. Somit war es möglich, Antikörper bei der Proteinanalyse zu verwenden, die spezifisch an den *Hämagglutinin*-Teil binden und *Lphn3* damit detektierbar machen. Anders als *mVenus* in *Lphn2* wurde bei *Lphn3* die *Hämagglutinin*-Modifikation am extrazellulären N-Terminus platziert, sodass dieser nach Autoproteolyse vom membranständigen Rest dissoziiert. Somit ist *Lphn3* via Nachweis mit *Hämagglutinin* nicht eindeutig als membranständiges Protein zu interpretieren. Im Gegensatz dazu ist der membranständige Anteil aufgrund des gegebenenfalls bereits dissoziierten *HA*-Epitop-markierten N-terminalen Rest nicht nachweisbar. Somit erscheint es notwendig, Antikörper gegen sowohl intra-, als auch extrazelluläre Epitope zu verwenden, um ein umfassenderes Bild der Lokalisation von *Lphn3* zu erhalten. Unter Zuhilfenahme zusätzlicher Epitope am intrazellulären C-Terminus, wie zum Beispiel bei der *mVenus*-Variante von *Lphn2*, wäre es möglich, den membranständigen Anteil von *Lphn3* näher zu untersuchen. In den konsekutiv durchgeführten Immunoblots würden sich Banden in Bereichen größerer Molekülmasse zeigen. Durch den Vergleich der Proben mit und ohne C-terminalem Epitop könnte man Aussagen über das Verhalten von *Lphn3* treffen. Beispielsweise ließe sich aufzeigen, in welchen Geweben *Lphn3* dazu neigt, den N-terminalen Rest abzuspalten und in welchen nicht.

Des Weiteren unterliegt der N-Terminus als Ligandenbindungsstelle der Signaltransduktion erwartungsgemäß vermehrter morphologischer Variation im Sinne des alternativen Spleißens und der posttranslationalen Modifikation. Dies bedeutet, dass eine gewisse Varianz der Ergebnisse innerhalb und zwischen den einzelnen Geweben zu erwarten ist. Aufgrund des wahrscheinlich veränderten Molekulargewichts der einzelnen Varianten würde diese im Immunoblot Signale auf unterschiedlicher Höhe zeigen. Somit wären diese modifizierten *Lphn3*-Varianten dem Nachweis entgangen. Mithilfe eines mittels homologer Rekombination veränderten C-Terminus zur Antikörpermarkierung wäre es möglich, die Gewebe unabhängig von den oben beschriebenen Variationen zu untersuchen. Dar-

aufhin könnte man ebenfalls mittels Immunoblot potenziell weitere Lokalisationspunkte von *Lphn3* identifizieren.

Außerdem gab es zum Zeitpunkt der Untersuchungen im Gegensatz zum *Lphn2-mVenus*-Fusionsprotein keine etablierten Antikörper gegen die *Hämagglutinin*-Variante von *Lphn3*. Darüber hinaus sind die kommerziell verfügbaren Antikörper zumeist *in vitro* oder an Zellkulturen getestete Produkte, deren Qualität unter *in vivo* Bedingungen unsicher vorhersagbar sind. Somit war es notwendig, Voraussetzungen zu schaffen, unter denen eine Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Gewebe durch Ausschaltung von Verzerrungseffekten möglich ist. Ein wichtiger Parameter bei der Arbeit mit Antikörpern ist die Spezifität. Diese ist nur gewährleistet, wenn der verwendete Antikörper nahezu ausschließlich an die Epitope der Proteine bindet, die zu untersuchen sind. Damit ein Antikörper optimal binden kann, ist es notwendig, das Epitop zugänglich für den Antikörper zu machen. Jedoch neigen Membranproteine wie die *Lphn* zur Aggregation und deren Epitope werden damit unzugänglich für die Antikörper. Eine Möglichkeit, die Epitope "freizulegen", ist die thermische Denaturierung zur Zerstörung der Tertiär- und Quartärstruktur des Proteins. Deshalb wurde in dieser Arbeit zunächst mittels explorativer Testung an unterschiedlich erhitzten Geweben für die *HA*-Antikörper ein Temperatur-optimum festgelegt. Außerdem war es notwendig, eine optimale Verdünnung zu wählen, damit möglichst wenig Hintergrundsignale bei ausreichender Signalstärke erreicht werden. Hierzu wurden konsekutiv explorative Untersuchungen durchgeführt, um die optimale Verdünnung in Bezug auf Spezifität und Sensitivität der Antikörper zu finden. Zur Verbesserung der internen und externen Validität der Nachweisverfahren sind weitere Untersuchungen unter Zuhilfenahme der verwendeten Antikörper notwendig.

4.3 Vergleich Immunhistochemie und Immunfluoreszenz als Nachweismethode der *Lphn2-mVenus-Fusionsproteine*

Zum Nachweis von *Lphn2* gab es bis dato wenig erprobte Verfahren. Vor allem solche, die *in-vivo* getestet wurden. Somit erschien es schwierig, Antikörper zu etablieren, die zuverlässig in Spezifität und Sensitivität den Nachweis der zu untersuchenden *Lphn*-Proteine erbringen. Außerdem wurden bis dato verwendete Antikörper nicht im Knock-Out getestet, da dieser sich im Falle von *Lphn2* embryonal letal auf die zu untersuchenden Mäuse auswirkt [1]. Deshalb wurde hierzu mittels homologer Rekombination dem *Lphn2*-Gen die GFP-Variante *mVenus* hinzugefügt. Mithilfe dieses *Lphn2-mVenus*-Fusionsproteins war es nun möglich, bereits etablierte Antikörper gegen *GFP* einzusetzen. Dies hat auch den Vorteil, dass man weniger Hintergrundsignale durch Kreuzreaktivitäten erwartet, da *GFP* in Wirbeltieren nicht vorkommt. Bei der histologischen Untersuchung war auffällig, dass Methoden der Immunfluoreszenz deutlich mehr unspezifische Signale erbrachten als mit der Immunhistochemie. Dies könnte an der Größe der zu untersuchenden Proteine bzw. Fusionsproteine liegen. Das mit 25 kDa relativ große *GFP* erbrachte zwar in der Immunhistochemie einen hintergrundsignalarmen Nachweis, konnte jedoch mittels Immunfluoreszenz nicht weiter aufgelöst werden. Hier zeigten sich viele Signale, die keine klare Lokalisation zulassen. Somit wurden alle histologischen Untersuchungen dieser Arbeit mittels Immunhistochemie durchgeführt. Zur Detektion von *Lphn2* im subzellulären Bereich wäre in Folgearbeiten weitere Nachweisverfahren zu etablieren, die eine genauere Auflösung von *Lphn2* erlauben.

4.4 Folgearbeit zur Beurteilung der Funktion von *Lphn2* als Mechanosensoren

Ein Problem bei der Beurteilung der Funktion von *Lphn2* an der Basis der *Papillae filiformis* ist der Umstand, dass ein kompletter *knock-out* embryonal letal verläuft [1]. Um dieses Problem zu umgehen müsste man einen gewebespezifischen *knock-out* durchführen. Dies wäre zum Beispiel mithilfe von Cre-Rekombinasen möglich. Darauffolgend könnten, wie bereits in Vorarbeiten an *Drosophila melanogaster* beschrieben wird, Verfahren zur Detektion der Mechanosensorik an *knock-out*- und Wildtypmäusen angewendet werden [44] [14]. Abgeleitete sensorisch evozierte Potentiale an Mäusen, die taktil an den *Papillae filiformis* stimuliert werden, könnten im Vergleich der *knock-out*- und Wildtypmaus die Funktion von *Lphn2* verständlicher machen. Hierbei wäre folgender Versuchsaufbau denkbar: Taktile Reizung der Zunge mittels mit zuckerhaltiger Flüssigkeit bestrichenen rauhen und glatten Oberflächen. Durch Platzierung von Elektroden auf der Schädelkalotte der Maus gelingt die Ableitung der evozierten Potentiale mittels Elektro-neurographie. Im Vergleich der Potentiale aus dem Versuchsaufbau mit und ohne rauere Oberfläche kann zwischen vermehrter taktiler- und gustatorischer Reizung differenziert werden. Der abschließende Vergleich dieser Potentiale der *Lphn2*-selektiven-*knock-out* Maus, mit denen der Wildtypmaus erbrächte den Nachweis, dass *Lphn2* eine Funktion bei der sensomechanischen Kopplung der Zunge übernimmt.

Darüber hinaus wären Untersuchungen an weiteren Organen interessant, die ebenfalls der Mechanosensorik bedürfen wie Niere, Gefäßsystem, Leber und Herz. Zumindest konnte bereits in dieser Arbeit in diesen Organen das Vorhandensein von *Lphn2* nachgewiesen beziehungsweise bestätigt werden.

4.5 Bewertung der Ergebnisse dieser Arbeit in Bezug auf ihre potentielle Bedeutung für die gegenwärtige Forschung

Insgesamt betrachtet können die *Lphn* als Vertreter der GPCR mit Hilfe dieser Arbeit besser verstanden werden. Für die GPCR im Allgemeinen wurden bereits vielfältige physiologische Funktionen (Tab.1.1), pathophysiologische Störungen (Tab.1.3) sowie pharmakologische Beeinflussbarkeit (Tab.1.2) nachgewiesen. Darüber hinaus konnte den *Lphn* als Subklasse der aGPCR ebenfalls eine Bedeutung als Korrelat physiologischer (Tab.1.4) und pathophysiologischer (Tab.1.5) Prozesse zugeordnet werden. Somit ergibt sich aus den Erkenntnissen dieser Arbeit, dass die *Lphn* in den neu identifizierten Geweben ebenfalls eine Rolle bei physiologischen sowie bei pathophysiologischen Abläufen einnehmen könnten. So konnte in Vorarbeiten von Scholz et al *Lphn2* als wichtiger Faktor der Mechanosensorik in *Drosophila melanogaster* identifiziert werden [44] [14]. In direktem Bezug hierauf wurde in dieser Arbeit *Lphn2* an der Basis der Papillae filiformis der Zunge, die als Tastorgan der mechanosensorischen Kopplung bedürfen, immunhistochemisch nachgewiesen. Daraus lässt sich schließen, dass *Lphn2* in der Zunge von *Mus musculus* als Element der mechanosensorischen Kopplung von haptischen Reizen fungieren könnte. Außerdem gelang in dieser Arbeit die Bestätigung der Präsenz von *Lphn2* in den Organen Herz, Niere und Leber [5] mittels molekularem Nachweises von *Lphn2* in diesen Geweben (Abb. 3.10). Auch hier scheint noch unklar, welche Funktion *Lphn2* in diesen Organsystemen im Detail erfüllt und damit ist ein Anlass für weitere Untersuchungen gegeben. Vergleicht man das pharmakologische Potential der GPCR mit den Erkenntnissen dieser Arbeit, so scheinen sich auch die *Lphn* als Ziel pharmakologischer Interaktion anzubieten. Zum Beispiel interagieren bereits einige kardial wirksame Medikamente wie β_1 -Rezeptoragonisten (Isoprenalin), β_2 -Rezeptorblocker (Bisoprolol, Metoprolol), Muskarinrezeptorantagonisten (Atropin) oder *alpha/beta*-Rezeptorenblocker (Adrenalin, Noradrenalin) mit GPCR. Diese finden bereits breite Anwendung in der Behandlung von Herzrhythmusstörungen und Bluthochdruck [24]. Des Weiteren sind die GPCR als Interaktionspartner mit vasoaktiven Substanzen wie Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten

(Candesartan, Olmesartan, Valsartan) bekannt, die ihre Wirkung unter anderem via Modulation der prä- und glomerulären Regulation, der Mesangiumzellen und verschiedenen tubulären Abschnitten entfalten [24] [53]. Somit wäre ein Einfluss von *Lphn* auf diese Prozesse ebenfalls denkbar. Außerdem existieren bereits zahlreiche etablierte Medikamente wie β_2 -Rezeptoragonisten (Fenitrol, Salbutamol) oder Muskarinrezeptorantagonisten (Ipratropium, Tiotropium) mit Wirksamkeit an der Lunge, die zur Behandlung von Asthma bronchiale und COPD zum Einsatz kommen [24]. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass die *Lphn* bereits mit Erkrankungen der Lunge in Verbindung gebracht wurden. Zum Beispiel konnte für *Lphn2* ein Zusammenhang mit COPD [36] und für *Lphn1* und *3* mit Asthma bronchiale [15] [34] hergestellt werden. Somit wären weitere Untersuchungen zum tiefergehenden Verständnis dieser Zusammenhänge durchaus interessant. So wurde *Lphn2* im Rahmen dieser Arbeit auf transkriptioneller Ebene in respiratorischem Gewebe nachgewiesen. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen aus Vorarbeiten [5] und bekräftigt die Theorien zum Zusammenhang von *Lphn2* mit Erkrankungen der Lunge wie COPD [36] und dem pulmonalen Plattenepithelkarzinom [56] sowie von *Lphn3* mit dem Adenokarzinom [23]. Aufgrund dessen wurde *Lphn3* bereits in Vorarbeiten als mögliches Ziel pharmakologischer Intervention bei der Behandlung von Asthma bronchiale diskutiert [15]. Außerdem wäre es denkbar, mittels Folgearbeiten eine klinisch relevante, therapeutische Option im Sinne einer zielgerichteten Therapie (engl.: *targeted therapy*) mittels Biologika aus den Erkenntnissen zu *Lphn3* zu gewinnen. Gleiches gilt einen möglichen neuen Therapieansatz für *Lphn3*-mutierte Adenokarziome der Lunge [23]. Des Weiteren wurde *Lphn2* in Vorarbeiten von Jeon et al in Verbindung mit cisplationsensitiven kolorektalen Karzinomen gebracht [22]. Hierzu liefert diese Arbeit den Nachweis von mRNA-Transkriptmengen in den Geweben des Gastrointestinaltraktes. Somit erscheint eine dysregulierte *Lphn2*-Expression denkbar als möglicher Therapieansatz zur Verbesserung der bisherigen Behandlung von cisplatinensitiven kolorektalen Karzinomen.

Literaturverzeichnis

- [1] G. R. Anderson, Maxeiner S., and T.C. Südhof. Postsynaptic adhesion gpcr latrophilin-2 mediates target recognition in entorhinal-hippocampal synapse assembly. *J. Cell Biol.* Vol. 216 No. 11 3831–3846 <https://doi.org/10.1083/jcb.201703042>, 28.Sep 2017.
- [2] M. Arcos-Burgos and M. Muenke. A common variant of the latrophilin 3 gene, lphn3, confers susceptibility to adhd and predicts effectiveness of stimulant medication. *Molecular Psychiatry* (2010) 15, 1053–1066; [doi:10.1038/mp.2010.6](https://doi.org/10.1038/mp.2010.6).
- [3] A.C. Ashton and Y.A. Ushkaryov. α -latrotoxin, acting via two ca^{2+} -dependent pathways, triggers exocytosis of two pools of synaptic vesicles. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 276, No. 48.
- [4] M.C. Bonaglia and O. Zuffardi. Genotype–phenotype relationship in three cases with overlapping 19p13.12 microdeletions. *European Journal of Human Genetics* (2010) 18, 1302–1309; [doi:10.1038/ejhg.2010.115](https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.115).
- [5] S. Boucard, Maxeiner S., and T.C. Südhof. Latrophilins function as heterophilic cell-adhesion molecules by binding to teneurins. *J Biol Chem.* 2014;289(1):387–402. [doi:10.1074/jbc.M113.504779](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.504779).
- [6] E. Burgis. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie*. Urban und Fischer, 2008.
- [7] F. Chen and G. Rudenko. The structure of neurexin 1 alpha reveals features promoting a role as synaptic organizer. *Structure.* 2011 Jun 8;19(6):779–89. [doi: 10.1016/j.str.2011.03.012](https://doi.org/10.1016/j.str.2011.03.012). Epub 2011 May 27. PMID: 21620716; PMCID: PMC3134934., 8.Jun 2011.

- [8] Z. Choudhry and R. Jooper. Lphn3 and attention-deficit/hyperactivity disorder: interaction with maternal stress during pregnancy. *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 53:8 (2012), pp 892–902 doi:10.1111/j.1469-7610.2012.02551.x.
- [9] S.E. Doyle and R.B. Runyan. Latrophilin-2 is a novel component of the epithelial-mesenchymal transition within the atrioventricular canal of the embryonic chicken heart. *Dev Dyn.* 2006 Dec;235(12):3213-21. doi: 10.1002/dvdy.20973. PMID: 17016846., 31.Aug. 2006.
- [10] Ensemble. Adgrl2. https://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Summary?db=core;g=ENSMUSG00000028184;r=3:148815714-148823121;t=ENSMUST00000198139, 29.Okt. 2020.
- [11] Davletov B.A. et al. Vesicle exocytosis stimulated by alpha-latrotoxin is mediated by latrophilin and requires both external and stored ca2. *The EMBO Journal Vol.17 No.14 pp.3909–3920.*
- [12] Kühnel et al. *Taschenatlas Histologie*. Thieme-Verlag, 2014.
- [13] Orsini C.A. et al. Behavioral and transcriptomic profiling of mice null for lphn3, a gene implicated in adhd and addiction. *Mol Genet Genomic Med.* 2016;4(3):322-343. Published 2016 Mar 4. doi:10.1002/mgg3.207/, 4.Mrz 2016.
- [14] Scholz N. et al. Mechano-dependent signaling by latrophilin/cirl quenches camp in proprioceptive neurons. *eLIFE research article*, DOI: 10.7554/eLife.28360.
- [15] A. Faiz and J.K. Burgess. Latrophilin receptors: novel bronchodilator targets in asthma. *Thorax* 2017;72:74–82, doi:10.1136/thoraxjnl-2015-207236.
- [16] A.J. Fallgatter and K.P. Lesch. Influence of a latrophilin 3 (lphn3) risk haplotype on event-related potential measures of cognitive response control in attention-deficit hyperactivity disorder (adhd). *European Neuropsychopharmacology* 23, 458-468.
- [17] Diana G. and Boucard. A. Latrophilins updated. *Biomol Concepts.* 2014 Dec;5(6):457-78. doi: 10.1515/bmc-2014-0032. PMID: 25429599., 27.Nov. 2014.

- [18] J. Hamann and H.B. Schiöth. International union of basic and clinical pharmacology. xciv. adhesion g protein-coupled receptors. *Pharmacol Rev* 67:338–367.
- [19] G. Holz and J. Habener. Black widow spider alpha-latrotoxin: a presynaptic neurotoxin that shares structural homology with the glucagon-like peptide-1 family of insulin secretagogic hormones. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 1998;121(2):177-184. doi:10.1016/s0305-0491(98)10088-3, 1.Okt 1998.
- [20] K. Ichtchenko and A.G. Petrenko. A novel ubiquitously expressed alpha-latrotoxin receptor is a member of the cirl family of g-protein-coupled receptors. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 274, No. 9.
- [21] V.A. Jackson and E. Seiradake. Structural basis of latrophilin-flrt interaction. *Structure*. 2015 Apr 7;23(4):774-81. doi: 10.1016/j.str.2015.01.013. Epub 2015 Feb 26. PMID: 25728924; PMCID: PMC4396693., 7.Apr 2015.
- [22] Jeon and Kim. Aberrant epigenetic modifications of lphn2 function as a potential cisplatin-specific biomarker for human gastrointestinal cancer. *Cancer Research and Treatment*, Vol. 48 N. 2, doi.org/10.4143/crt.2015.153.
- [23] Z. Kan and S. Seshagiri. Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *NATURE* Vol 466.
- [24] T. Karow. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Thomas Karow, 2018.
- [25] A. et al Kiess. Funktionelle relevanz intrazellulaerer splicevarianten des brain-specific angiogenesis inhibitor 2 (bai2). 2014.
- [26] A. Labbe and J. Ridha. Refining psychiatric phenotypes for response to treatment: Contribution of lphn3 in adhd. *Am J Med Genet Part B* 159B:776–785.
- [27] V. Lagou and A. Goris. Genetic architecture of adaptive immune system identifies key immune regulators. *Cell Reports* 25, 798–810, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.048>, 16.Okt 2018.

- [28] M. Lange and L. Bally-Cuif. The adhd-susceptibility gene *lphn3.1* modulates dopaminergic neuron formation and locomotor activity during zebrafish development. *Molecular Psychiatry* (2012) 17, 946–954; doi:10.1038/mp.2012.29.
- [29] T. Langenhan, Piao X., and Monk. Adhesion g protein-coupled receptors in nervous system development and disease. *Nature reviews*, Vol. 17.
- [30] Lee and Kim. Identification of latrophilin-2 as a novel cell-surface marker for the cardiomyogenic lineage and its functional significance in heart development. *Circulation*;139:2910–2912. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.040826.
- [31] Y.R. Li and H. Hakonarson. Meta-analysis of shared genetic architecture across ten pediatric autoimmune diseases. *Nature medicine*, Vol. 21, NO.9.
- [32] Y.C. Lu and D. Araç. Structural basis of latrophilin-flrt-unc5 interaction in cell adhesion. *Structure*. 2015 Sep 1;23(9):1678-1691. doi: 10.1016/j.str.2015.06.024. Epub 2015 Jul 30. PMID: 26235030; PMCID: PMC4851429., 1.Sep 2015.
- [33] Löffler, Petrides, and Heinrich. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Verlag, 2007.
- [34] L. MAOHUA and L. CHENGJUN. Clinical efficacy of recombinant human latrophilin 3 antibody in the treatment of pediatric asthma. *EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE* 15: 539-547, 2018, DOI: 10.3892/etm.2017.5376, 19.Mai 2017.
- [35] A.L. Moreno-Salinas and A.A. Boucard. Latrophilins: A neuro-centric view of an evolutionary conserved adhesion g protein-coupled receptor subfamily. *Frontiers in Neuroscience Volume 13, Article 700*, www.frontiersin.org.
- [36] M. Obeidat and P.D. Paré. Integrative genomics of emphysema-associated genes reveals potential disease biomarkers. *Am J Respir Cell Mol Biol Vol 57, Iss 4, pp 411–418*.
- [37] Ovando-Zambrano and A. Boucard. Alternative splicing event modifying *adgrl1/latrophilin-1* cytoplasmic tail promotes both opposing and dual camp si-

- gnaling pathways. *ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES*, doi: 10.1111/nyas.14198.
- [38] M. Ribasés and M. Casas. Contribution of lphn3 to the genetic susceptibility to adhd in adulthood: a replication study. *Genes, Brain and Behavior* (2011) 10: 149–157 doi: 10.1111/j.1601-183X.2010.00649.x.
- [39] Guillermo Romero. Pharmacology of g protein coupled receptors. *Editorial. Br J Pharmacol.* 2010 Mar;159(5):983-5. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00695.x. PMID: 20388130; PMCID: PMC2839257., 2011.
- [40] H. Ryan and R.A. Hall. Adhesion g protein-coupled receptors as drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2018 Jan 6;58:429-449. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010617-052933. Epub 2017 Oct 2. PMID: 28968187; PMCID: PMC7167285., 06.Jan. 2018.
- [41] Röthe and Prömel. Involvement of the adhesion gpcrs latrophilins in the regulation of insulin release. *Cell Reports Article*, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.040>.
- [42] Tobaben S., Südhof T.C., and B. Stahl. The g protein-coupled receptor cl1 interacts directly with proteins of the shank family. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 275, No. 46.
- [43] Sando and T.C. Südhof. Latrophilin gpcrs direct synapse specificity by coincident binding of flrts and teneurins. *Science* 363, 837 . DOI. [org/10.1126/science.aav7969](https://doi.org/10.1126/science.aav7969).
- [44] N. Scholz and T. Langenhan. The adhesion gpcr latrophilin/cirl shapes mechanosensation. *Cell Rep.* 2015 May 12;11(6):866-874. doi: 10.1016/j.celrep.2015.04.008. Epub 2015 Apr 30. PMID: 25937282., 12.Mai 2015.
- [45] Schünke, Schulte, and Schumacher. *Prometheus, Lernatlas der Anatomie*. Thieme-Verlag, 2015.
- [46] Silbernagel, Pape, and Kurtz. *Physiologie*. Thieme-Verlag, 2014.

- [47] J.P. Silva and Y. Ushkaryov. Functional cross-interaction of the fragments produced by the cleavage of distinct adhesion g-protein-coupled receptors. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL.284, NO.10.*
- [48] J.P. Silva and Y.A. Ushkaryov. Latrophilin 1 and its endogenous ligand lasso/ teneurin-2 form a high-affinity transsynaptic receptor pair with signaling capabilities. *Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jul 19;108(29):12113-8. doi: 10.1073/pnas.1019434108. Epub 2011 Jul 1. PMID: 21724987; PMCID: PMC3141932.*, 19.Jul 2011.
- [49] X.L. Tang and M.Y. Liu. Orphan g protein-coupled receptors (gpcrs): biological functions and potential drug targets. <https://www.nature.com/articles/aps2011210.pdf>, 27.Feb 2012.
- [50] D. Tischner and N. Wettschureck. Single-cell profiling reveals gpcr heterogeneity and functional patterning during neuroinflammation. *JCI Insight. 2017;2(15):e95063. Published 2017 Aug 3. doi:10.1172/jci.insight.95063*, 3.Aug. 2017.
- [51] S. Tobaben, Südhof T.C., and B. Stahl. Genetic analysis of α -latrotoxin receptors reveals functional interdependence of circ1/latrophilin 1 and neurexin 1. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 277, No. 8.*
- [52] M. Vezain and P. Saugier-veber. A de novo variant in adgrl2 suggests a novel mechanism underlying the previously undescribed association of extreme microcephaly with severely reduced sulcation and rhombencephalosynapsis. *Acta Neuropathologica Communications, doi.org/10.1186/s40478-018-0610-5.*
- [53] G. Wolf and K. Stahl. Angiotensin-ii-wirkungen an der niere: mehr als ein vasokonstriktor. 1996.
- [54] S. Zaffalon, A. Latz, G. Krasteva-Christ, and S. Maxeiner. Sex identification in horses (equus caballus) based on the gene pair nlgn4x/nlgn4y. *Animal genetics, doi: 10.1111/age.12823*, 2019.

- [55] Zhang and T.C. Südhof. Latrophilin-2 and latrophilin-3 are redundantly essential for parallel-fiber synapse function in cerebellum. *eLife* 2020;9:e54443. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.54443>.
- [56] C.X. Zheng and H.Y. Wan. Whole-exome sequencing to identify novel somatic mutations in squamous cell lung cancers. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY* 43: 755-764, DOI: 10.3892/ijo.2013.1991.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Aufbau eines typischen G-Protein gekoppelten Rezeptors.	2
1.2	Exemplarische Signalkaskaden nach Aktivierung eines GPCR. . .	4
1.3	Aktueller Stand der GPCR-Forschung im Überblick	9
1.4	Aufbau eines Latrophilinmoleküls.	11
1.5	Makroskopischer Aufbau der Zunge.	17
1.6	Schleimhautrelief der Zunge.	18
3.1	Genotypisierung der Mäuse #1-16.	43
3.2	Genotypisierung der Mäuse #17-43.	44
3.3	Übersicht der <i>Lphn1</i> -Transkriptmengen unterschiedlicher Gewebe relativ zu Aktin.	46
3.4	Ausschnitt der NCBI Datenbank bezüglich der putativen Splevarianten von <i>Lphn2</i> auf Chromosom 3 in <i>Mus musculus</i> . . .	47
3.5	Übersicht der <i>Lphn2</i> -Transkriptmengen unterschiedlicher Gewebe relativ zu Aktin.	48
3.6	Vergleich unterschiedlicher Gewebetypen bzgl. der <i>Lphn2</i> - Transkriptmengen relativ zu Aktin (<i>Actb</i>).	49
3.7	Übersicht der <i>Lphn3</i> -Transkriptmengen unterschiedlicher Gewebe relativ zu Aktin.	50
3.8	Übersicht der <i>Lphn3</i> -Transkriptmengen extraneuronaler Gewebe relativ zu Aktin.	51
3.9	Autoproteolyse von <i>Lphn2</i> und <i>Lphn3</i>	52
3.10	SDS-Gelelektrophorese: anti-GFP-Ak (1:2000), bei RT. <i>Lphn2</i> -Expression unterschiedlicher Gewebe.	53

3.11 Immunoblot: anti-GFP-AK (1:2000), bei RT. Lphn2-Expression in Hirngewebe.	54
3.12 Immunoblot: anti-HA-AK (1:1000). Lphn3-Expression in Hirngeweben zur Etablierung des Temperaturoptimums.	55
3.13 Immunoblot: Anti-HA-AK, bei RT. Lphn3-Expression in Hirngewebe bei unterschiedlicher Verdünnung des HA-Antiköpers. .	56
3.14 Immunoblot: anti-HA-Ak (1:8000) bei 95°. Lphn3-Expression in unterschiedlichen Geweben.	57
3.15 Histologischer Nachweis von <i>Lphn2</i> an der Basis der <i>Papillae filiformis</i> der Zunge.	59
A.1 Gelelektrophorese zur <i>NLGN4Y/NLGN4X</i> -Analyse im Vergleich zur <i>SRY</i> -Analyse.	IV
A.2 <i>NLGN4X/Y</i> - und <i>SRY</i> -Oligonukleotid- Startermoleküle zur PCR-Amplifikation	IV
A.3 Geschlechtsdifferenzierung von Pferden (<i>Equus caballus</i>) anhand des Genpaares <i>NLGN4X/NLGN4Y</i>	V
A.4 Anordnung der <i>NLGN4X/NLGN4Y</i> -Gene und deren Nachweis mittels PCR	VI
A.5 Poster zur Publikation: Sex identification in horses (<i>Equus caballus</i>) based on the gene pair <i>NLGN4X/NLGN4Y</i>	VII

A Publikation und Dank

A.1 Publikation

Im Rahmen eines Nebenprojekts bei den Arbeiten mit DNA wurden Analysen zur Geschlechtsdifferenzierung mittels *NLGN4*-Allel durchgeführt. Ähnlich wie *AMELX/Y* ist das *NLGN4*-Allel in direkter Nachbarschaft zur pseudoautosomalen Region des X-Chromosoms von Mensch und Pferd lokalisiert. Bisher wurden vor allem Verfahren eingesetzt, die auf der Analyse des Y-Chromosom-spezifischen SRY-Gens beruhen. Jedoch zeigt dieses Verfahren Unsicherheiten bei Personen, die in dieser Region Mutationen aufweisen, wie es zum Beispiel im Rahmen der 46,XY-Gonadendysgenese (Swyer-Syndroms) vorkommt. Deshalb benötigt dieses Verfahren weitere Methoden zur SRY-unabhängigen Geschlechtsbestimmung. Hierzu wurden Verfahren wie die *AMELX/Y*-Genanalyse entwickelt, welche die Ergebnisse der SRY-Analyse valide bestätigen können und die bereits weitläufig eingesetzt werden. So entstand analog zur *AMELX/Y*-Genanalyse die Idee, das *NLGN 4*-Allel zur Geschlechtsidentifikation mittels PCR zu nutzen. Hierzu wurden PCR-Analysen an equinen Proben durchgeführt und mit Ergebnissen der SRY-Analyse verglichen [54]. Abb. A.1 zeigt ein repräsentatives Ergebnis dieser Analysen. Somit konnte ein komplementäres Verfahren zur Geschlechtsdifferenzierung etabliert werden. Diese Ergebnisse wurden dann im Journal *Animal Genetics* publiziert (Abb. A.3).

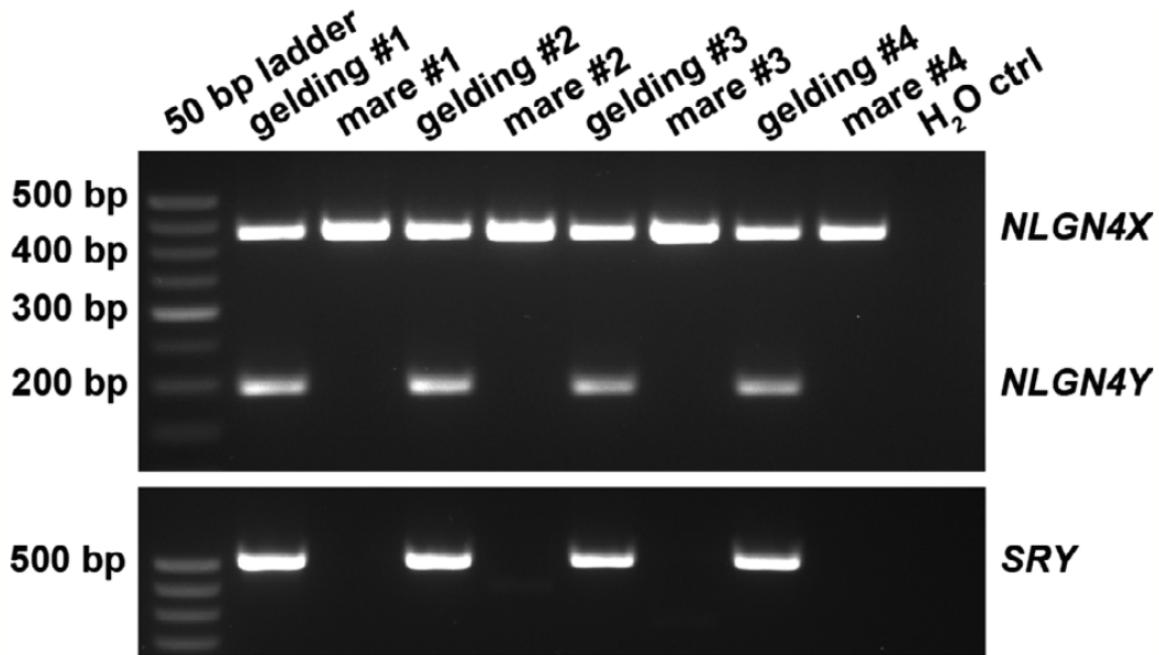


Abb. A.1: Gelelektrophorese zur *NLGN4Y/NLGN4X*-Analyse im Vergleich zur *SRY*-Analyse. In Wallachen (engl.: *gelding*) zeigen sich positive Banden für *NLGN4X* und *NLGN4Y*, im Gegensatz zu den Proben von Stuten (engl.: *mare*). Dies spiegelt sich in den *SRY*-Analysen wider, die lediglich in den Proben der Wallache positive Signale zeigen [54].

Name	Direction	Sequence
MX18778 [<i>SRY</i>]	sense	5'-ACCGTGTCAAACGACCCATGAATG-3'
MX18779 [<i>SRY</i>]	antisense	5'-TCTGCGTATGTCTGCGTAGCCAAC-3'
MX18785 [<i>NLGN4X/Y</i>]	sense	5'-CTAACTGCTAGTACCCATTCTYATTGCC-3'
MX18786 [<i>NLGN4X/Y</i>]	antisense	5'-CCATTMTAGCATGCATATAGCTCAAGTC-3'

Abb. A.2: *NLGN4X/Y*- und *SRY*-Oligonukleotid- Startermoleküle zur PCR-Amplifikation. Ausschnitt aus der Publikation: *Sex identification in horses (Equus caballus) based on the gene pair NLGN4X/NLGN4Y* [54].

**Sex identification in horses (*Equus caballus*) based on the gene pair *NLGN4X/NLGN4Y*****Simon Zaffalon***, **Ariane Latz**,
Gabriela Krasteva-Christ* and
Stephan Maxeiner* *Anatomy and Cell Biology, Saarland University Medical School, Kirrbergerstr. 100 Bldg. 61, 66424, Homburg, Germany;
†Tierarztpraxis für Pferde Eyendorf, Zur Horst 13, 21376, Eyendorf, Germany

Accepted for publication 23 May 2019

Description: ‘Sex-typing’ (i.e. sex identification by PCR) in mammals based solely on the detection of the Y-chromosome-specific *SRY* gene is lacking an internal positive control to judge PCR performance in presumptive female samples. More reliable, however, is the discrimination of sequence polymorphisms between two amelogenin gene variants (*AMELX* and *AMELY*) resulting in X- and Y-specific signals. *AMELX/Y* gene detection is widely accepted in a broad range of mammals, for example, dogs, horses, pigs, sheep and humans.^{1–5} For a few other mammals, additional gene pairs have been identified, for example, *ZFX/Y* (dog) and *Rbm31x/y* (mouse).^{6,7} In the horse genome, the *NLGN4X* gene is localized close to the pseudoautosomal boundary on the X-specific region,⁸ a situation similar to the human genome. We hypothesize that by sequence comparison of *NLGN4X* to its gametologue, *NLGN4Y*, on the male-specific region on the Y chromosome, indel variations should emerge allowing us to apply comparable strategies as have previously been reported for *AMELX/Y*.

Sex identification: Horse *NLGN4X* gene information (EquCab3.0, Gene ID 100050709; NCBI) was submitted to BLASTN to identify its Y-specific homologue, *NLGN4Y* (GenBank accession no. MH341179.1). Iterative sequence alignment was performed using MULTALIN to identify indel variations between both genes. Sex-typing was carried out using a combination of primers amplifying a 236-bp indel region present between the horse *NLGN4X* and *NLGN4Y* genes as well as primers to determine the presence of the male-specific *SRY* gene (502 bp) for complementation (Table S1, Fig. S1). DNA was isolated either from saliva samples by the phenol/chloroform extraction method or from blood using the Quick-DNA Miniprep Plus Kit (Zymo Research Europe GmbH). PCR reactions were carried out in a total volume of 25 µl using 10 ng of genomic DNA and Q5 High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs GmbH), according to the manufacturer’s protocol. PCR amplification parameters were set for both reactions initially at 98 °C for 30 s followed by 40 cycles at 98 °C for 10 s, 64 °C for 20 s and 72 °C for 30 s and final extension at 72 °C for 1 min. Samples were separated on a 2% agarose gel by electrophoresis (Fig. 1).

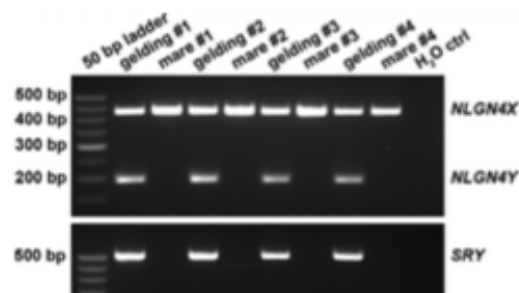


Figure 1 Representative agarose gel electrophoresis of PCR amplification products using MX19785/86 primer pairs hybridizing to *Equus caballus* *NLGN4X* and *NLGN4Y* genes (upper row) and MX19778/79 to *SRY* (bottom row). Indel variations in *NLGN4X* (435 bp) and *NLGN4Y* (199 bp) result in two amplicons, thus allowing inference of the respective sex by determining the presence or absence of the equine Y chromosome. *SRY* amplicons (502 bp) are present only in male horses.

Comments: All tested DNA samples ($n = 29$) showed the anticipated results—one band (*NLGN4X*) for female and two bands (*NLGN4X/Y*) for male horses—suggesting that the horse *NLGN4X/Y* gene pair provides a suitable alternative to hitherto reported *AMELX/Y* sex-typing protocols. This strategy might be useful in a variety of applications such as blood sample screening of mares to detect circulating cfDNA of male foetuses.⁹

Acknowledgements: SM is recipient of HOMFOR2017-2019 funding by the Medical School of Saarland University.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- 1 Yan S. *et al.* (2013) *Anim Genet* **44**, 606.
- 2 Hasegaw T. *et al.* (2000) *J Vet Med Sci* **62**, 1109–10.
- 3 Fontanesi L. *et al.* (2006) *Mol Reprod Dev* **75**, 1662–8.
- 4 Pfeiffer I. & Brenig B. (2005) *BMC Genet* **6**, 16.
- 5 Akane A. *et al.* (1991) *Forensic Sci Int* **49**, 81–8.
- 6 Murakami M. *et al.* (2001) *J Vet Med Sci* **63**, 679–81.
- 7 Tungster S.J. (2017) *Biol Sex Differ* **17**, 31.
- 8 Raudsepp T. & Chowdhary B.P. (2015) *Cytogenet Genome Res* **147**, 81–94.
- 9 de Leon P.M. *et al.* (2012) *Theriogenology* **77**, 694–8.

Correspondence: S. Maxeiner (stephan.maxeiner@uni-saarland.de)

Supporting information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.
Figure S1. Sequence alignment of horse *NLGN4X/NLGN4Y* genes.

Table S1. *NLGN4X/Y* and *SRY* primer sequences.

Abb. A.3: Geschlechtsdifferenzierung von Pferden (*Equus caballus*) anhand des Genpaares *NLGN4X/NLGN4Y*. Publikation in originärer Darstellung: *Sex identification in horses (Equus caballus) based on the gene pair NLGN4X/NLGN4Y* im *Journal of Animal Genetics* [54].

All coding exons are depicted and named according to Bolliger MF *et al.* (2008) *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 6421-6. Generally, the coding sequence of NLGN4 protein is distributed over six exons with the formal absence of exon 2, which is present in other genes of the neuroligin family. Horse *NLGN4Y* is further lacking exon 3, leaving only five coding exons. An indel region downstream of exon 4 was identified to design a genotyping assay (dashed line). PCR primer annealing sites are highlighted in yellow including ambiguous bases between both sequences highlighted in red. Below, representative sex-typing result of a male DNA sample is indicating reliable PCR performance down to 10 pg of absolute DNA input.

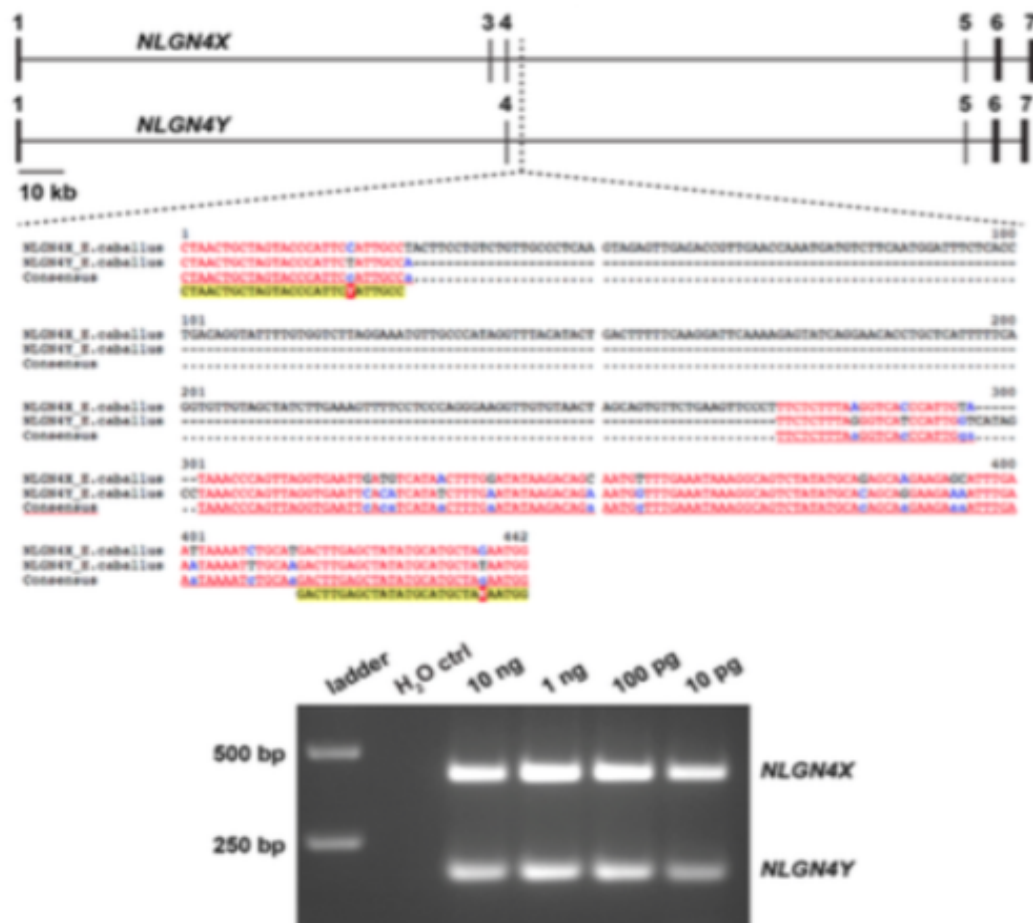


Abb. A.4: Anordnung der *NLGN4X/NLGN4Y*-Gene. Darstellung der für die Geschlechtsdifferenzierung von Pferden geeigneten und somit verwendeten Gensequenzen sowie darunter der Nachweis dieser Gensequenzen mittels PCR. Hier zu erkennen der Unterschied zwischen *NLGN4X* und *NLGN4Y* anhand des Vergleichs der 10pg-Verdünnung [54].

Der Übersichtlichkeit halber wurde der Publikation ein Poster (Abb. A.2) hinzugefügt.

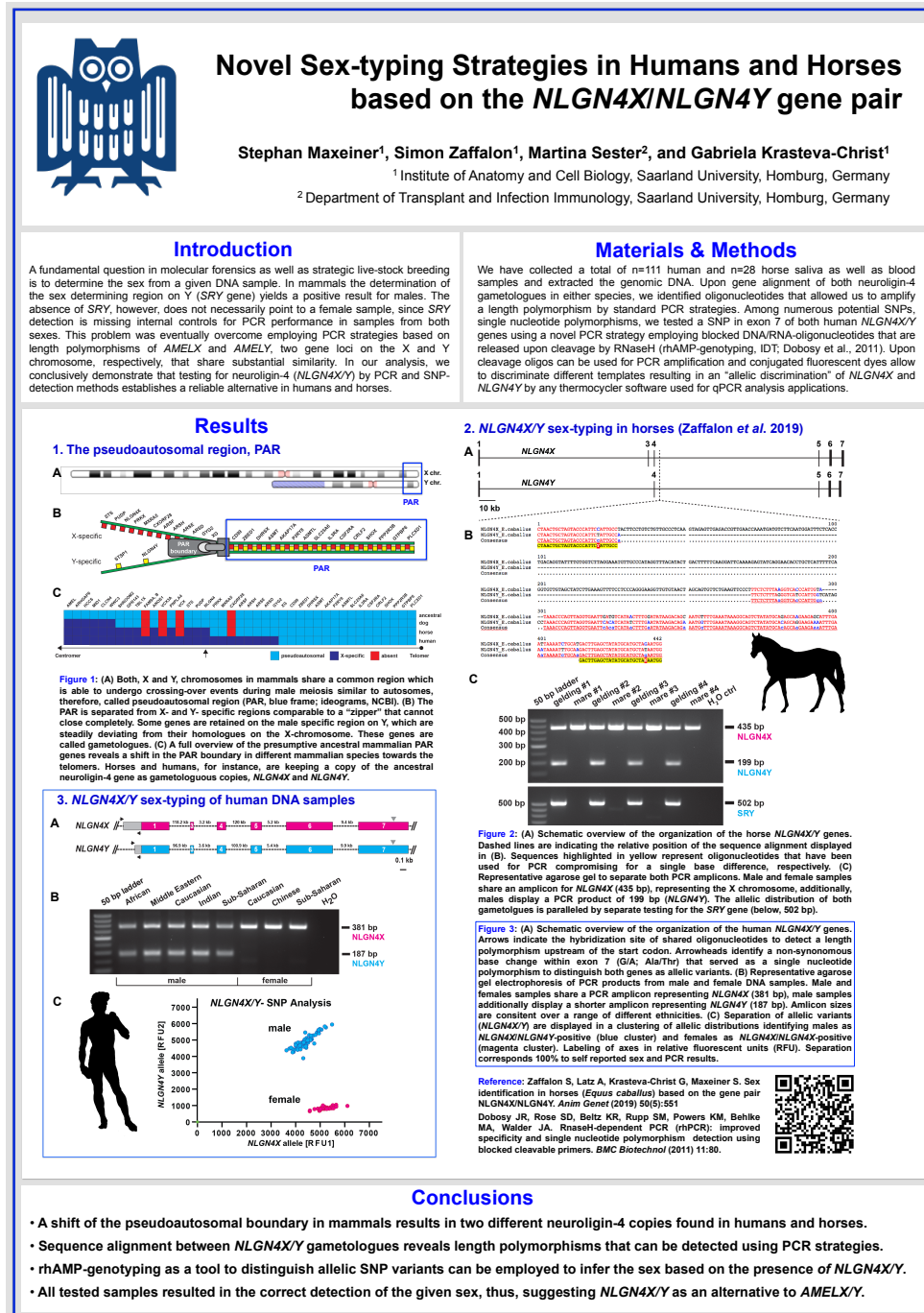


Abb. A.5: Poster zur Publikation: Sex identification in horses (*Equus caballus*) based on the gene pair *NLGN4X/NLGN4Y*. Beitrag zur Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, 2019. [54]

B Dank

Widmen möchte ich diese Arbeit meiner Familie, mein Heimathafen. An ruhigen Tagen einfach ein Zuhause, an stürmischen eine Rettung. Meiner Mutter, Christa Zaffalon, deren bedingungslose Hingabe und Fürsorge wie der Wind in den Segeln meine Reise ermöglichten. Meinem Vater, Harry Zaffalon, dessen Ratschläge mich wie ein Kompass durch mein gesamtes Leben navigierten. Ich widme diese Arbeit meinen Brüdern, Daniel und Thorsten, die stets zu meiner Seite standen, mit mir Seite an Seite ruderten und motivierten als Vorbilder in jeglicher Hinsicht.

Dank gebührt an dieser Stelle meiner Doktormutter Prof. Gabriela Krasteva-Christ, die mir diese Arbeit ermöglicht hat. Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Stephan Maxeiner, der mich all die Techniken gelehrt hat, die zur Analyse von Proteinen auf allen Ebenen der Proteinexpression notwendig sind und mir stets als Mentor zur Seite stand. Außerdem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe "Krasteva-Christ", die mir ein angenehmes Arbeiten ermöglicht haben und mir zusätzlich jederzeit behilflich waren. Des Weiteren bedanke ich mich bei meinem Lektor Christian Hoffmann für die Korrekturen in deutscher Sprache. Ich bedanke mich bei Joannes Mischo und Sophia Voigtmann für die Korrektur in englischer Sprache sowie für die Fehlerbereinigung in der Kodierung. Abschließend bedanke ich mich bei Lisa Scherer für die Unterstützung bei der Latex-Formatierung dieser Arbeit.

C Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

D Kolloquiumsvermerk

Tag der Promotion: 15.11.2023

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Michael D. Menger

Berichterstatter:

Univ.-Prof. Dr. Gabriela Krasteva-Christ

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Robert Bals