

Dissertation

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

Extraneuronale Lokalisation und subzelluläre Analyse von
Latrophilin 2 in Niere und Leber in genetisch veränderten
Reporterermäusen.

vorgelegt von

Pascal Henrich

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

Homburg, 20.10.2023

„Das Geld ist der allgemeine, für sich selbst konstruierte Wert aller Dinge. Es hat daher die ganze Welt, die Menschheit wie die Natur, ihres eigentümlichen Wertes beraubt. Das Geld ist das den Menschen entfremdete Wesen seiner Arbeit und seines Daseins, und dieses fremde Wesen beherrscht ihn, und er betet es an.“

Karl Marx

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	4
	Einleitung.....	8
1.1	G Protein gekoppelte Rezeptoren.....	8
1.1.1	Aufbau G-Protein gekoppelter Rezeptoren.....	8
1.1.2	Funktionsweise G-Protein gekoppelter Rezeptoren	9
1.1.3	Bedeutung G-Protein gekoppelter Rezeptoren.....	11
1.2	Latrophiline	14
1.2.1	Nomenklatur in Vergangenheit und Zukunft	15
1.2.2	Aufbau und Strukturelle Domänen der Latrophiline	15
1.2.3	Wirkmechanismus der Latrophiline.....	18
1.3	Anatomie und Physiologie der Mausgewebe	20
1.3.1	Mikroskopische Anatomie der Leber	20
1.3.2	Mikroskopische Anatomie des Nephrons im Nierenparenchym	26
1.3.3	Cerebrale Expression von Lphn2	25
1.4	Antikörper und ihr Stellenwert in der Immundiagnostik.....	26
1.4.1	Nanobodies.....	29
1.5	Fluoreszenzmikroskopie	30
1.5.1	Definition Fluoreszenz:	30
1.5.2	Prinzipien der Fluoreszenz:	31
1.5.2.1	Das Fluoreszenzmikroskop	34
1.6	Fragestellung	37
2	Material und Methoden	38
2.1	Geräte, Material und Reagenzien	38
2.1.1	Geräte.....	38
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	39
2.1.3	Chemikalien	40
2.1.4	Medien und Puffer	42

2.1.5	Enzyme.....	47
2.1.6	Oligonukleotid-Startermoleküle aus 2.2.2 und 3.1.....	47
2.1.7	Software.....	47
2.1.8	Antikörper	48
2.1.9	Mausstämme und Mäuse	49
2.2	Methoden.....	50
2.2.1	Generation von Mäusen mit Lphn2-Mutation.....	50
2.2.2	Genotypisierung von Mäusen anhand PCR	51
2.2.3	Gewebebiopsien / Isolierung genomischer DNS	51
2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	53
2.2.5	Isolierung von RNS.....	53
2.2.6	Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR).....	54
2.2.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	56
2.2.7.1	Visualisierung der aufgetrennten Proteine im Gel	58
2.2.7.2	Transfer der Proteine auf Nitrocellulosemembran.....	58
2.2.7.3	Visualisierung spezifischer Proteine auf der Nitrocellulosemembran.....	58
2.2.8	Fixierung und Organentnahme	59
2.2.9	Gewebeschnitte am Kryostaten.....	60
2.2.10	Autofluoreszenzblockierung mit Sudan Black B (Sudanschwarz, SBB).....	60
2.2.11	Immunhistochemie.....	61
2.2.12	(Strept-)Avidin-Biotin-Methoden	62
3	Ergebnisse	64
3.1	PCR-Analyse der Mauslinie	64
3.2	Transkriptionsmengen der Lphn1 und Lphn2 Messenger RNS.....	65
3.3	Proteinanalytik von Lphn2.....	68
3.4	Expression von Lphn2 in Gehirnarealen der Maus.....	70
3.5	Mikroskopie der Immunfluoreszenz	71
3.5.1	Immunlokalisation im flottierenden Schnitt	76
3.5.2	Reduktion der Autofluoreszenz durch Sudanschwarz B.....	78

3.5.3	Reduktion der Autofluoreszenz durch TrueBlack® und TrueView®	80
3.5.4	Signaldistribution auf Organebene	82
3.5.5	Reevaluation der vorherigen Ergebnisse und Kontrolle der Methoden	83
3.5.6	Subzelluläre Analyse der Gewebe	85
4	Diskussion	86
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	86
4.2	Kontrollen und Genauigkeit der diagnostischen Methoden	88
4.2.1	Signal-Rausch-Verhältnis	90
4.3	Grenzen der Forschung	91
4.4	Vorschläge für zukünftige Forschung / Ausblick	93
5	Literaturverzeichnis	97
	Danksagung	104

1 Zusammenfassung

Die Superfamilie der G Protein-gekoppelten Rezeptoren (G protein-coupled receptors; GPCR) ist eine der größten und am besten untersuchten Proteinfamilien. Ihre Mitglieder reagieren auf ein umfangreiches Panel verschiedener Liganden und beteiligen sich an außerordentlich vielen physiologischen Funktionen. Sie sind biologische Rezeptoren in der Zellmembran, die Signale über Guanosintriphosphat bindende Proteine (kurz G Proteine) in das Zellinnere im Sinne einer Signaltransduktion weiterleiten. Sie sind essenziell für die intra- und interzelluläre Kommunikation und somit fundamental für die Funktion eines Organismus mitverantwortlich. Während dieser Bereich der Forschung rasant zunimmt, wächst auch das Interesse an speziellen Unterfamilien wie den Adhäsions G protein-gekoppelter Rezeptoren (aGPCRs), da solche sich ebenfalls an verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Ereignissen beteiligen, welche für die menschliche Gesundheit relevant sein könnten. Von Säugetieren werden solche Rezeptoren, die Latrophiline, z.B. im Zentralnervensystem, Nieren, Leber und Herz exprimiert (Boucard et al., 2014). In einer Pilotarbeit von Simon Zaffalon (Doktorand AG Prof. Dr. Krasteva-Christ) wurden die Latrophiline auf mehreren Ebenen der Molekülexpression untersucht. Hier zeigte sich in einem initialen Screening verschiedener Mausgewebe eine vermehrte Expression von Latrophilin 2 vor allem in Niere, Leber und Zunge. Aufbauend auf dieser Erkenntnis soll nun im Folgenden mit Hilfe klassischer Proteinanalytik, Immunhistochemie und Fluoreszenzmikroskopie der Latrophilin2 Rezeptor und seine Expression weiter untersucht werden. Im Hinblick auf die extraneuronale Relevanz und die genaue Identifizierung auf zellulärer und subzellulärer Ebene sollten genannte Verfahren etabliert und verbessert werden, um sie für die Weitererforschung effizient nutzen zu können. In Nieren- und Lebergewebe einer speziellen Reportermaus konnte das Lphn2-mVenus Fusionsprotein auf allen Ebenen der Proteinanalytik nachvollzogen werden, wobei die Ergebnisse mit den Vorarbeiten weitgehend übereinstimmen. Aufgrund geringer Expression des Fusionsproteins und der Untersuchung in Geweben mit sehr hoher Autofluoreszenz, mussten Verfahren entwickelt werden, um das Signal zu verstärken oder die Autofluoreszenz zu reduzieren. Es gelang, Verfahren zur Verbesserung der Sichtbarmachung relevanter Aspekte in der Histologie zu entwickeln, wodurch das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert, sowie zeitliche und methodische Limitationen im Umgang mit den Materialien herausgestellt wurden. Die subzelluläre Analyse zeigt das Vorhandensein des Signals an dem Lumen zugewandter Grenzflächen/Membranen im Tubulussystem der Niere als auch entlang der Gallenkanälchen der Leber. Mehrere Funktionsmuster des Rezeptors sind aufgrund dieser Verteilung denkbar und wurden in der Zusammenschau mit bestehenden Arbeiten diskutiert, sowie weitere Forschungsansätze angeregt.

Summary

The G protein-coupled receptor (GPCR) superfamily is one of the largest and best-studied protein families. Its members respond to an extensive panel of different ligands and participate in an extraordinary range of physiological functions. They are biological receptors in the cell membrane that transmit signals via guanosine triphosphate binding proteins (G proteins for short) into the cell interior in the sense of signal transduction. They are essential for intra- and intercellular communication and are therefore fundamentally responsible for the function of an organism. While this area of research is expanding rapidly, interest is also growing in specific subfamilies such as the adhesion G protein-coupled receptors (aGPCRs), as they also participate in various physiological and pathophysiological events that may be relevant to human health. In mammals, such receptors, the latrophilins, are expressed, for example, in the central nervous system, kidneys, liver and heart (Boucard et al., 2014). In a pilot work by Simon Zaffalon (PhD student AG Prof. Dr. Krasteva-Christ), the latrophilins were examined at several levels of molecular expression. An initial screening of various mouse tissues showed increased expression of latrophilin 2, especially in the kidney, liver and tongue. Building on this knowledge, the latrophilin2 receptor and its expression will now be further investigated using classical protein analysis, immunohistochemistry and fluorescence microscopy. With regard to the extraneuronal relevance and precise identification at the cellular and subcellular level, the methods mentioned should be established and improved in order to be able to use them efficiently for further research. In the kidney and liver tissue of a special reporter mouse, the Lphn2-mVenus fusion protein could be traced at all levels of protein analysis, with the results largely in agreement with the previous work. Due to low expression of the fusion protein and the study in tissues with very high autofluorescence, methods had to be developed to enhance the signal or reduce autofluorescence. It was possible to develop procedures to improve the visualization of relevant aspects in histology, which improved the signal-to-noise ratio and highlighted time and methodological limitations in handling the materials. Subcellular analysis shows the presence of the signal at lumen-facing interfaces/membranes in the tubular system of the kidney as well as along the bile canaliculi of the liver. Several functional patterns of the receptor are conceivable based on this distribution and were discussed in conjunction with existing work and further research approaches were suggested

Abkürzungsverzeichnis

ADGRL 1-3	Adhesion G protein-coupled receptor Latrophilin 1-3
aGPCR	Adhesion G protein-coupled receptor
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
avGFP	<i>Aequorea victoria</i> green fluorescent protein
CA	Cornu ammonis (hippocampi)
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CIRL	Calcium independent receptor of alpha-Latrotoxin
CTF	C-terminales Fragment
DAG	Diacylglycerol
DAPI	IUPAC-Bezeichnung: 4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl.: desoxyribonucleic acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ECFP	enhanced cyan fluorescent protein
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EYFP	enhanced yellow fluorescent protein
Fab	engl. antigen-binding fragment
GAIN	engl. GPCR autoproteolysis-inducing domain
GD	Gyrus dentatus
GFP	Green fluorescent protein
GL	Glomerularschicht
GPCR	Guaninnucleotid-bindendes Protein-gekoppelter Rezeptor
H2O	doppelt destilliertes Wasser

IP3	Inositoltrisphosphat
loxP	locus of crossing over in phage P1
Lphn	Latrophilin
LTX	engl.: latrotoxin
MCL	Mitralzellschicht
mRNA	engl.: messenger RNA
mRNS	messenger oder auch Boten-RNS
NRXN	Neurexin
NTF	N-terminales Fragment
OT	Objektträger
PLC	Phospholipase C
qRT-PCR	quantitative Reverse-Transcriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RBC	engl. red blood cells
SBB	Sudan schwarz B
sdAbs	engl. single-domain-Antibodys
SLM	Stratum lacunosum moleculae

Einleitung

1.1 G Protein gekoppelte Rezeptoren

G Protein-gekoppelte Rezeptoren (engl.: G protein-coupled-receptor; Abk.: GPCR) stellen die größte Superfamilie von Rezeptoren im menschlichen Genom dar (Pierce et al., 2002). Basierend auf einem phylogenetischen Vergleich ihrer sieben Transmembran-überspannenden (7TM) Domäne wurden GPCRs in fünf Familien eingeteilt: Glutamat, Rhodopsin, Adhäsion, Frizzled/Geschmack und Sekretin (Schiöth & Lagerström, 2008). Mitglieder dieser Familie umfassen Rezeptoren für viele Hormone, Neurotransmitter, Chemokine und Calciumionen sowie sensorische Rezeptoren für verschiedene Geruchsstoffe, bitteren und süßen Geschmack und sogar Lichtphotonen. Sie regulieren nicht nur viele physiologische Prozesse, sondern sind auch als pharmakologische Zielstrukturen von großem Interesse. Bei über 140 der ca. 800 G Protein-gekoppelten Rezeptoren ist der endogene Ligand nicht bekannt und sie werden deshalb als Orphan-GPCRs bezeichnet. (Levoye et al., 2006).

1.1.1 Aufbau G-Protein gekoppelter Rezeptoren

GPCRs sind Proteine, die in der Regel als Membranrezeptoren fungieren. Sie sind zur Bindung und Aktivierung von G-Proteinen befähigt. Zur Zellverankerung besitzen sie sieben helikale Transmembrandomänen, die die Zellmembran von extra- nach intrazellulär durchspannen und durch drei intrazelluläre sowie drei extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Insbesondere die Transmembrandomänen III–VI beherbergen Bindungsstellen für einen Liganden. Extrazellulär befindet sich ein N-terminaler und intrazellulär ein C-terminaler Rest. Je nach Funktion unterscheiden sich die unterschiedlichen GPCRs bezüglich ihrer Größe und des Aufbaus des extrazellulären Aminosäurerestes, um durch Konformationsänderung als Ziel unterschiedlicher Liganden zu fungieren. In der Neurobiologie wird für G Protein-gekoppelte Rezeptoren häufig der Begriff metabotrope Rezeptoren verwendet, um sie von einem anderen Rezeptortyp, den ligandengesteuerten Ionenkanälen (ionotroper Rezeptor), zu unterscheiden. G-Protein gekoppelten Rezeptoren haben die Hauptfunktion, Signalen in das Zellinnere weiterzuleiten. Diese Signaltransduktion geschieht insbesondere über die Aktivierung von G Proteinen. Das eigentliche G Protein bindet an der intrazellulären Seite des Rezeptors.

1.1.2 Funktionsweise G-Protein gekoppelter Rezeptoren

Nahezu alle G Protein-gekoppelten Rezeptoren sind zu einer direkten Aktivierung eines aus drei Untereinheiten (α , β und γ) bestehenden heterotrimeren G Proteins befähigt. Die Aktivierung eines G Proteins ist ein mehrstufiger Prozess, der die Bindung eines Liganden an den Rezeptor, die Konformationsänderung des Rezeptors sowie die Bindung und Aktivierung eines G-Proteins einschließt.

Heterotrimere G Proteine können GTP (Guanosintriphosphat) und GDP (Guanosindiphosphat) binden, die GDP-gebundene Form ist inaktiv. Die Aktivierung des Rezeptors sorgt für den Austausch von GDP gegen GTP an der α -Untereinheit des G Proteins. Der G Protein-Komplex wird durch die Bindung des GTP instabil. Als Folge ändert sich die Konformation des heterotrimeren G Proteins und es kann in die α - und die $\beta\gamma$ -Untereinheit dissoziieren. Die aktivierte $G\alpha$ -Untereinheit (mit gebundenem GTP) und die $G\beta\gamma$ -Untereinheit beeinflussen verschiedene Zielmoleküle, wie Enzyme oder Kanäle. $G\alpha$ -Untereinheiten können Adenylatcyclase aktivieren (bei G_s) oder Phospholipase C (bei G_q), wodurch sekundäre Botenstoffe wie cAMP, IP3 und DAG erzeugt werden. Die Buchstaben "s", "i" und "q" beziehen sich auf die Art der Signale, die sie vermitteln: G_s -Proteine stimulieren die Adenylatcyclase, was zu einem Anstieg des sekundären Botenstoffs cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) führt. G_i -Proteine hemmen die Adenylatcyclase und reduzieren den cAMP-Spiegel. G_q -Proteine aktivieren die Phospholipase C (PLC), was zur Bildung der sekundären Botenstoffe Inositoltrisphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) führt. So können durch exogene Liganden übertragene Signale in das Zellinnere im Sinne einer Signaltransduktion weitergeleitet werden.

(Lexikon Chemie.de)

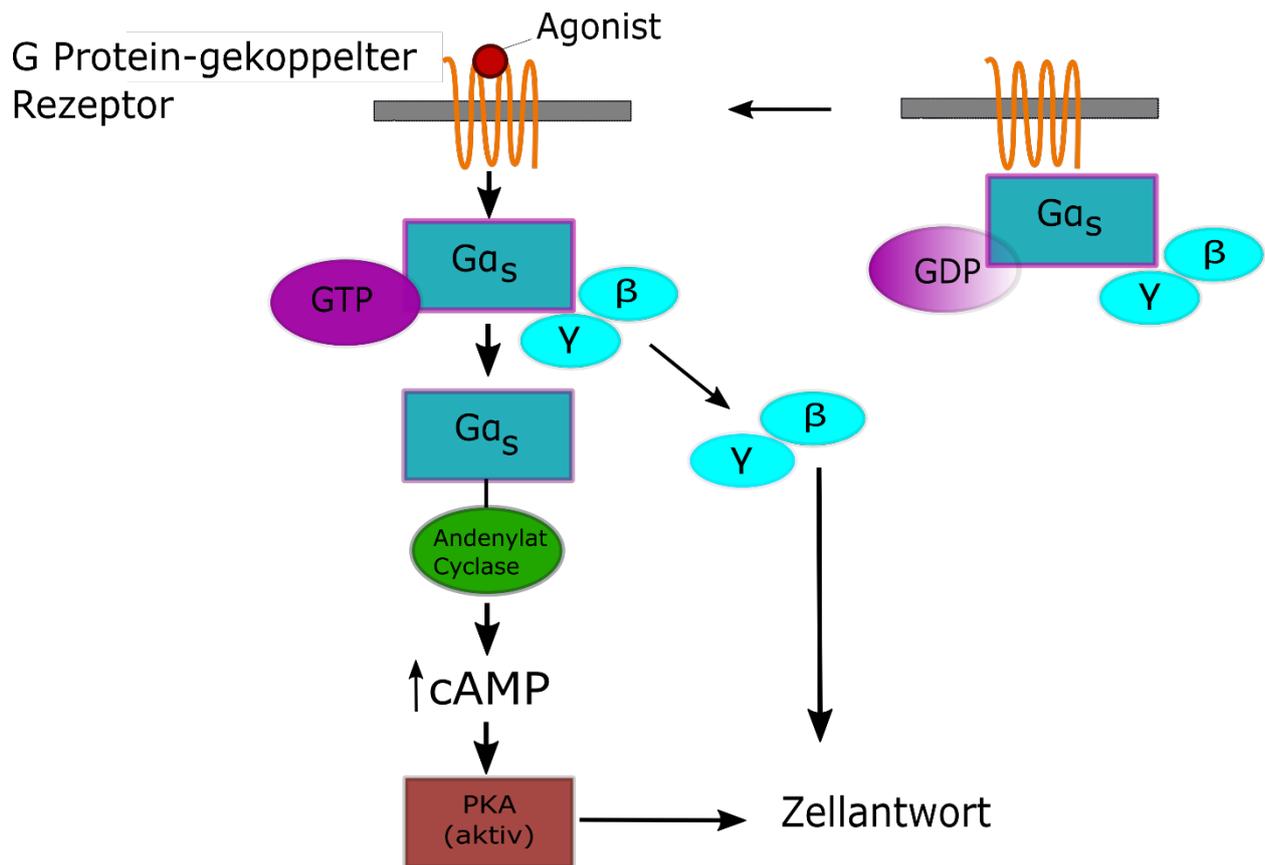


Abbildung 1: Sieben-Transmembran (7TM)-Rezeptor-Signalübertragung am Beispiel des β_2 -adrenergen Rezeptors. In Abwesenheit eines Agonisten befinden sich 7TM-Rezeptoren wie z.B. der β_2 -adrenerge Rezeptor im Zustand niedriger Affinität. Nach der Agonistenbindung wird ein transients hochaffiner Komplex aus Agonist, aktiviertem Rezeptor und G Protein gebildet. GDP wird aus dem G Protein freigesetzt und durch GTP ersetzt. Dies führt zur Dissoziation der G Protein-Komplexe in α -Untereinheiten und $\beta\gamma$ -Dimere, die beide mehrere Effektoren aktivieren. $G\alpha_s$ aktiviert beispielsweise die Adenylatcyclase, was zu einem Anstieg von zyklischem AMP (cAMP) führt. Dieser Anstieg von cAMP wiederum aktiviert die Proteinkinase A (PKA), bei der es sich um eine Serin/Threonin-Kinase handelt, die viele verschiedene Substrate phosphoryliert, darunter 7TM-Rezeptoren, andere Kinasen und Transkriptionsfaktoren. (Eigene Abbildung nach Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie 2014, Seite 773 ff)

1.1.3 Bedeutung G-Protein gekoppelter Rezeptoren

Mit etwa 950 identifizierten Genen stellen die G Proteingekoppelten Rezeptoren (G protein-coupled receptors; GPCR) die größte Rezeptorklasse dar (Löffler/Petrides 2014). Adhäsions-GPCRs haben einen uralten Ursprung, und sie sind wahrscheinlich eine der evolutionären Innovationen, die es Zellen während früher Entwicklungsstadien ermöglichten, aneinander zu haften und miteinander zu kommunizieren (Hamann et al., 2015). Nach aktuellem Wissen vermitteln sie die Effekte vieler unterschiedlicher Liganden (von Aminosäurederivaten wie Adrenalin bis zu den Chemokinen wie Interleukin-8 (Löffler/Petrides 2014, Seite 779 ff). Das Wissen über Liganden und die Funktionsweise der GPCRs ist für die heutige Medizin von fundamentaler Bedeutung. Eine Vielzahl essenzieller medikamentöser Therapien und Forschungsansätze wird über sie realisiert. Grundlegende Prinzipien der Ligandenspezifität sind eine Kombination mehrerer struktureller, konformationeller und molekularer Mechanismen wie z.B.:

Eine Bindungstasche oder einen Ligandenbindungsraum, der spezifisch für bestimmte Liganden (Neurotransmitter, Hormone, Arzneimittel usw.) ist. Diese Tasche hat eine einzigartige Form und chemische Zusammensetzung, die nur bestimmte Moleküle erkennen und binden kann.

Aminosäuresequenz: Die Aminosäuresequenz des Rezeptors ist entscheidend für ihre Ligandenspezifität. Unterschiedliche GPCRs haben unterschiedliche Aminosäuresequenzen in der Nähe ihrer Bindungstaschen, was dazu führt, dass sie spezifische Liganden binden können.

Konformationsänderungen: Die Bindung eines Liganden an einen GPCR löst Konformationsänderungen in der Rezeptorstruktur aus. Diese Änderungen sind spezifisch für den gebundenen Liganden und können die Aktivierung des GPCRs und die nachfolgende Signalübertragung beeinflussen.

Sterische Anpassung: Die dreidimensionale Struktur des Liganden muss zu der Bindungstasche des GPCRs passen. Dies erfordert eine sterische Anpassung, bei der die Form des Liganden und die Form der Bindungstasche komplementär zueinander sind.

Chemische Wechselwirkungen: Die Bindung zwischen einem Liganden und einem GPCR beruht auf chemischen Wechselwirkungen wie Van-der-Waals-Kräften, Wasserstoffbrückenbindung, ionischen Wechselwirkungen und hydrophoben Wechselwirkungen. Diese Wechselwirkungen sind spezifisch für die chemische Natur des Liganden und der Aminosäuren in der Bindungstasche.

Posttranslationale Modifikationen: Einige GPCRs unterliegen posttranslationalen Modifikationen, die ihre Ligandenspezifität beeinflussen können. Zum Beispiel können Glykosylierungen oder Phosphorylierungen die Bindungseigenschaften eines GPCRs verändern.

Dimerisierung und Oligomerisierung: GPCRs können in Dimere oder Oligomere mit anderen GPCRs oder Proteinen eingehen. Dies kann die Ligandenspezifität und die Art der Signalübertragung beeinflussen.

Insgesamt ermöglicht die Kombination dieser Mechanismen GPCRs, eine hohe Ligandenspezifität aufrechtzuerhalten, was bedeutet, dass sie nur auf bestimmte Signalmoleküle reagieren, selbst wenn es viele verschiedene Moleküle in ihrer räumlichen Umgebung gibt. Diese Spezifität ist entscheidend für die präzise Regulation verschiedener physiologischer Prozesse. Obwohl mehrere neue Liganden jüngst identifiziert wurden, ist das Wissen über Moleküle, die mit GPCRs interagieren noch lange nicht vollständig. Abbildung 2 gibt einen Überblick über einige der bisher genutzten Therapieoptionen in der heutigen Medizin.

Arzneimittel	Beispiele	Indikation	Rezeptor(en)
α (2) -Agonisten	Clonidin	Arterielle Hypertonie	α_2 -Adrenozeptoren
Alphablocker	Prazosin, Tamsulosin	Arterielle Hypertonie, Prostatahyperplasie	α_1 -Adrenozeptoren
Anticholinergika	Atropin	Harninkontinenz, Asthma bronchiale, bradykarde Herzrhythmusstörungen	Muscarinische Acetylcholinrezeptoren
Betablocker	Atenolol, Metoprolol	Arterielle Hypertonie, Herzinsuffizienz, koronare Herzkrankheit, Migräne	β_1 -Adrenozeptoren
Dopamin-Agonisten	Pergolid, Cabergolin, Pramipexol, Ropinirol	Parkinson-Krankheit, Restless-Legs-Syndrom	Dopamin-Rezeptoren
H ₁ -Antihistaminika	Diphenhydramin, Loratadin, Cetirizin	Allergische Reaktionen	H ₁ -Rezeptoren
H ₂ -Antihistaminika	Ranitidin, Famotidin, Cimetidin	Kontrolle der Magensäureproduktion (Refluxkrankheiten, Magengeschwür)	H ₂ -Rezeptoren
Neuroleptika	Haloperidol, Risperidon, Clozapin, Olanzapin	Schizophrenie	D ₂ -Rezeptoren, 5-HT _{2A} -Rezeptoren
Opioide	Morphin, Codein, Fentanyl, Loperamid	Schmerzen, Anästhesie, Husten, Durchfall	Opioidrezeptoren
AT ₁ -Antagonisten	Losartan, Candesartan, Irbesartan, Valsartan, Telmisartan	Hypertonie, Herzinsuffizienz, koronare Herzkrankheit	AT ₁ -Rezeptoren

Abbildung 2: Beispiele für den therapeutischen Einsatz von Arzneimitteln, die an G-Proteingekoppelten Rezeptoren wirken. (Auswahl aus Lexikon Chemie.de)

1.2 Latrophiline

Latrophiline (engl.: Latrophilins) sind eine Gruppe G Protein-gekoppelter Rezeptoren aus der Adhäsions-G-Protein-gekoppelten Rezeptorfamilie (aGPCR). Der aGPCR-Zweig der 7TM-Rezeptoren zählt 33 Homologe im menschlichen Genom (Bjarnadóttir et al., 2004). Latrophiline gelten als Prototyp Modelle für die Untersuchung von aGPCR, da sie eines der evolutionär am stärksten konservierten Mitglieder sind (Meza-Aguilar & Boucard, 2014).

Ursprünglich wurden Latrophiline aufgrund ihrer Fähigkeit identifiziert, das Spinnengift alpha-Latrotoxin (α -LTX) zu binden. α -LTX ist ein Nervengift und Hauptbestandteil des Gifts von Spinnen, der Gattung Echte Witwen (*Latrodectus*) (Davletov et al., 1998); (Krasnoperov et al., 1996). Es wirkt als Toxin, indem es in der präsynaptischen Nervenzelle zusätzliche Kalzium-Kanäle öffnet, was zu einem vermehrten Kalzium-Einstrom und so zur ständigen Neurotransmitterexozytose führt (Hamann et al., 2015). Die Giftwirkung am peripheren Nervensystem manifestiert sich innerhalb kurzer Zeit in Form von Krämpfen, Muskelschmerzen und kann für kleine Beutetiere der Spinne letal enden. Experimentelle Studien, die mit dieser Verbindung durchgeführt wurden, erwiesen sich als sehr nützlich bei der Aufklärung der Neurotransmitter-Freisetzungsmechanismen, da α -LTX an jeder Art von Wirbeltier-Synapse aktiv sein kann, egal welcher Neurotransmitter beteiligt ist: Acetylcholin, Noradrenalin, Dopamin, Glutamat und Enkephalin (Gorio et al., 1978; Grasso & Senni, 1979; Janicki & Habermann, 1983; Longenecker et al., 1970; Nicholls et al., 1982; Tzeng & Siekevitz, 1978). Die spezifische Wirkung von α -LTX auf die Freisetzung von Neurotransmittern deutete schon früh darauf hin, dass spezifische Rezeptoren für die Wirkung des Toxins verantwortlich sein könnten.

Heute werden Latrophiline mit zahlreichen verschiedenen Funktionen wie synaptischer Exozytose, Gewebepolarität, Fertilität sowie pathophysiologischer Vorgänge in Form von Asthma und ADHS assoziiert. (Tobaben et al., 2002); (Langenhan, Prömel, Mestek, Esmaeili, Waller-, et al., 2009); (Prömel et al., 2012); (Liu et al., 2018). Darüber hinaus erwiesen sich homozygote *Lphn2* knockout Mäuse als embryonal letal (Anderson et al., 2017), was auch auf eine entwicklungsbiologische Bedeutung des Rezeptors hindeutet. Röthe et al., 2019, konnten zeigen, dass Spleißvarianten des *Lphn3* Rezeptors in pankreatischen Inselzellen von Maus und Mensch an der Regulierung der Insulinsekretion teilnehmen.

1.2.1 Nomenklatur in Vergangenheit und Zukunft

Da die Bezeichnungen historisch gewachsen sind, finden sich in älteren Arbeiten für Latrophilin (Lphn/LPHN) verschiedene Bezeichnungen. Zum Zeitpunkt der Entdeckung als Toxinrezeptoren arbeiteten unterschiedliche Gruppen an der Erforschung. Latrophilin wurde von der Gruppe von Ushkaryov et al. vorgeschlagen, während das Akronym CIRL (Calcium Independent Receptor for α -Latrotoxin) von der Gruppe von Petrenko vorgeschlagen wurde. Dieser Name ergab sich durch die unterschiedliche Wirkungsweise der Latrophiline im Vergleich zu den calcium-abhängigen α -LTX sensiblen Neurexinen (NRXN, engl.: neurexin). Andererseits hat die Gruppe von Südhof et al. sowohl CIRL als auch Latrophilin kombiniert, um die Abkürzung CL zu etablieren. In dem Bestreben, die wachsende Nomenklatur von LPHN und anderen Rezeptoren der Adhäsions-GPCR-Familie zu vereinfachen, wurde von der IUPHAR (International Union of Basic and Clinical Pharmacology) vorläufig ein Benennungssystem diskutiert. Dieses System verwendet eine Kombination aus vier gebräuchlichen Buchstaben (ADGR), die die Zugehörigkeit zur Adhäsionsrezeptorklasse zuschreiben, gefolgt vom ersten Buchstaben des am häufigsten verwendeten Namens und endend mit der Nummer, die der Gen-Isoform gegeben wurde. Da „Latrophilin“ der am weitesten verbreitete Name ist, weist die neue Nomenklatur daher Lphn den Begriff „ADGRL“ zu, somit entspricht ADGRL1-3 also LPHN1-3. Genbezeichnung Lphn1-3 wird allerdings historisch nur für das Mausgenom verwendet.

1.2.2 Aufbau und Strukturelle Domänen der Latrophiline

Adhäsions-GPCRs sind eine Familie großer Transmembranproteine von komplexer Struktur. Der genaue Aufbau kann je nach Unterfamilie variieren. Die Latrophilin-mRNS kann durch alternatives Spleißen beispielsweise Rezeptorvarianten hervorbringen, welche sich in ihrer extrazellulären und/oder intrazellulären Sequenz unterscheiden (Matsushita et al., 1999; Sugita et al., 1998). Sie zeichnen sich innerhalb der Gruppe der Adhäsions-G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (aGPCRs) durch eine einzigartige Topologie aus, z.B. durch das Vorhandensein einer GPCR-Proteolysestelle (GPS), die bei der Autoproteolyse zwei funktionell unterschiedliche Fragmente erzeugt, die nichtkovalent an der Plasmamembran verbunden bleiben.

Im Gegensatz zu anderen GPCRs wie z.B. den Geschmacksrezeptoren, welche nur wenige Aminosäuren im ihrem N-Terminus besitzen und die Ligandenbindungsstelle als Tasche zwischen den Transmembrandomänen im Vordergrund steht, ist bei den Latrophilinen mit ihrem sehr großen N-terminalen Rest mehr über heterophile Interaktion mit anderen Proteinen auf der Zelloberfläche bekannt (Meza-Aguilar & Boucard, 2014)

Allgemein besteht der strukturelle Aufbau aus einer langen, extrazellulären Domäne, einer Transmembranregion mit Heptahelixstruktur, einer intrazellulären Domäne und einer GPS-Domäne. Die klassische Lphn-Domänenstruktur ist in Abbildung 3 abgebildet. Hervorzuheben ist der besonders große extrazelluläre N-Terminus, welcher sich durch das Vorhandensein einer Reihe von Adhäsionsmotiven auszeichnet. Dieser N-Terminus enthält:

1. die Lektin-ähnliche Domäne. Diese Domäne wurde erstmals strukturell nach kristallographischen Studien beschrieben, die an der Maus und *C. elegans* durchgeführt wurden. Diese ursprünglich in Seeigeleiern identifizierte Domäne ist relativ selten und besitzt keine Aminosäuresequenzähnlichkeit zu bekannten Lektinklassen. Klassische Lektin-ähnliche Domänenproteine funktionieren, indem sie Rhamnose binden, einen Zucker, der keinen bekannten Biosyntheseweg in Tieren hat und daher nur selten gefunden wird (Tymiak et al., 1993). Aus evolutionärer Sicht ist die Lektin-ähnliche Domäne in allen Lphn von Wirbeltieren und Wirbellosen vorhanden und scheint somit eine konservierte Funktion in diesen Organismen zu haben (Langenhan et al., 2009).

Alle drei Lphn-Gene enthalten ein Mini-Exon zwischen den Lektin- und Olfactomedin-Domänen, welches für alternatives Spleißen empfänglich ist. Der Prozess scheint einer strengen gewebespezifischen Regulierung zu unterliegen und ist für die Erzeugung verschiedener Lphn-Liganden-Komplexe verantwortlich. (Boucard et al., 2014).

2. der Olfactomedin-ähnlichen Domäne. Ihre Anwesenheit wurde nur bei Säugetieren und nicht bei Insekten nachgewiesen (Langenhan et al., 2009). Sie konnte als Interaktionspartner in Lphn1 für NRXN (engl.: neurexin), eine Klasse präsynaptischer Zelladhäsionsproteine identifiziert werden, welche Synapsenbildung und -funktion beeinflussen (Chen et al., 2011; Meza-Aguilar & Boucard, 2014). 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 (engl.: teneurin) (Jackson et al., 2015; Lu et al., 2015).

3. der Serin/Threonin-reichen Sequenz. Die molekulare Struktur sowie die Funktion dieser Domäne sind bis heute unbekannt und Gegenstand aktueller Forschung.

4. die hormonbindende Domäne. Diese Domäne wurde aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit einer Region des Corticotropin-Releasing-Factor-Rezeptors (CRF-Rezeptor) so benannt, der eine hormonbindende Aktivität besitzt (Holz & Habener, 1998). Diese Domäne könnte in der Lage sein, ein Polypeptid oder ein kleines Molekül zu binden, um Lphn für eine intrazellulären Signaltransduktion zu aktivieren

5. die charakteristische GAIN-Domäne (GPCR autoproteolysis-inducing domain), die die GPS-Stelle umfasst. Sie besteht aus einer C- sowie N-terminalen Untereinheit und wird als autoproteolytisches Zentrum zur funktionellen Modifikation der Lphn beschrieben. Die Spaltung am extrazellulären GPS-Motiv (G protein-coupled receptor proteolytic site), dem Markenzeichen aller Adhäsions-GPCRs (Bjarnadottir et al., 2004), erzeugt Heterodimere, die aus einer extrazellulären Adhäsionsuntereinheit (ca. 120 kDa) und einer GPCR-ähnlichen Domäne mit 7TM-Helices (ca. 85 kDa) bestehen (Krasnoperov et al., 1997).

Der C-terminale Abschnitt umfasst:

1. die Region mit sieben Transmembrandomänen welche durch intra- sowie extrazelluläre Schleifen verbunden sind. Die Sieben-Transmembran-Domänen von Lphn weisen eine hohe Sequenzhomologie zwischen den verschiedenen Isoformen auf. Dieses hohe Maß an Homologie deutet auf eine gemeinsame Funktion zwischen den Transmembrandomänen von Lphn1, 2 und 3 hin, die nicht nur dazu dienen könnte, sie an die Membran zu binden, sondern auch ein ähnliches Umlagerungsmuster zeigen könnte, das zur Aktivierung intrazellulärer Kaskaden führt. Es wurde jedoch gezeigt, dass die Transmembrandomänen für die Vermittlung bestimmter Lphn-abhängiger Funktionen unnötig sind, was darauf hindeutet, dass Lphn als bimodulare Proteine wirken, bei denen NTF und CTF an unterschiedlichen Funktionen beteiligt sind (Prömel et al., 2012).

2. den zytoplasmatischen Schwanz, der ein PDZ-Bindungsmotiv trägt (benannt nach den ersten Buchstaben der Aminosäureketten, die alle PDZ-Domänen aufweisen: *postsynaptic density protein* (PSD95), *Drosophila disc large tumor suppressor* (DlgA) und *zonula occludens-1 protein* (Nourry et al., 2015).

1.2.3 Wirkmechanismus der Latrophiline

Wie in 1.2 erwähnt werden Latrophiline mit unterschiedlichen Funktionsweisen, physiologisch und pathophysiologisch in Zusammenhang gebracht, wobei die Rezeptoruntereinheiten wie in 1.2.2 jeweils entscheidende Beiträge liefern. Im Folgenden sollen exemplarisch bisher untersuchte Funktionsschritte des Rezeptors erläutert werden.

Der Wirkmechanismus umfasst mehrere Schritte:

1. Ligandenbindung: Der Prozess beginnt mit der Bindung eines spezifischen Liganden (meistens eines Proteins oder einer Peptidsequenz) an die extrazelluläre Domäne des Latrophilin-Rezeptors. Diese Liganden können sowohl in der Umgebung der Zelle, in der der Latrophilin-Rezeptor exprimiert wird, als auch in benachbarten Zellen vorkommen.

2. Rezeptoraktivierung: Die Bindung des Liganden führt zu einer Konformationsänderung im Latrophilin-Rezeptor. Dies führt zur Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade durch den G-Protein-gekoppelten Mechanismus. In der Arbeit von Yasinska et al., 2019 wird ein klassischer Signalweg durch die Aktivierung der Phospholipase C und in der Folge der Proteinkinase C alpha durch zytosolisches Calcium und Diacylglycerol in Brustkrebszellen beschrieben.

3. Interaktion mit anderen Proteinen: Aktivierte Latrophiline interagieren nun mit anderen Proteinen innerhalb der Zelle. Es gibt Hinweise darauf, dass Latrophiline mit Proteinen interagieren, die an der Zelladhäsion beteiligt sind, wie z. B. Neurexine, FLRTs (fibronectin-like repeat transmembrane proteins, Jackson et al., 2015; Lu et al., 2015) und teneurins (Boucard et al., 2014). Diese Wechselwirkungen beeinflussen die Verbindung zwischen den Zellen und können sich auf verschiedene zelluläre Prozesse auswirken, einschließlich der neuronalen Entwicklung und Synapsenbildung.

4. Modulation der Zelladhäsion: Die Wechselwirkungen zwischen aktivierten Latrophiline und anderen Proteinen können die Zelladhäsion beeinflussen, indem sie die Anhaftungsfähigkeit von Zellen ändern oder die Bildung von Zell-Zell-Verbindungen fördern oder hemmen. Diese Effekte können sich auf verschiedene Aspekte der Zellfunktion auswirken und sind in der Entwicklung des Nervensystems von besonderer Bedeutung (Sando & Südhof, 2021).

Zwischenzeitlich konnten bereits verschiedene Erkenntnisse über die physiologischen und pathophysiologischen Auswirkungen des Lphn2-Rezeptors gewonnen werden (siehe auch 1.2). Jüngere Forschung zeigt die Rolle von Lphn2 bei der Modulation von Endothelzellkontakten und Kontakten zur extrazellulären Matrix in Blutgefäßen (Camillo et al., 2021), was Auswirkungen auf die Tumorausbreitung aus Blutgefäßen haben kann. Weiter konnte gezeigt werden, dass Lphn2 ein Transforming Growth Factor β (TGF- β) unabhängiger Rezeptor von leucine-rich α -2-glycoprotein 1 (LRG1) ist. Durch die Interaktion mit Lphn2 fördert LRG1 sowohl die Angiogenese als auch positive neurotrophe Prozesse in Mausgewebeexplantaten unter hyperglykämischen Bedingungen. Präklinisch konnte in der Folge an einem Mausmodell mit Diabetes mellitus und erektiler Dysfunktion durch die Verabreichung von LRG1 in das Penisgewebe, welches eine deutlich erhöhte Lphn2 Expression aufweist, die erektile Funktion vollständig wieder hergestellt werden (Yin et al., 2022).

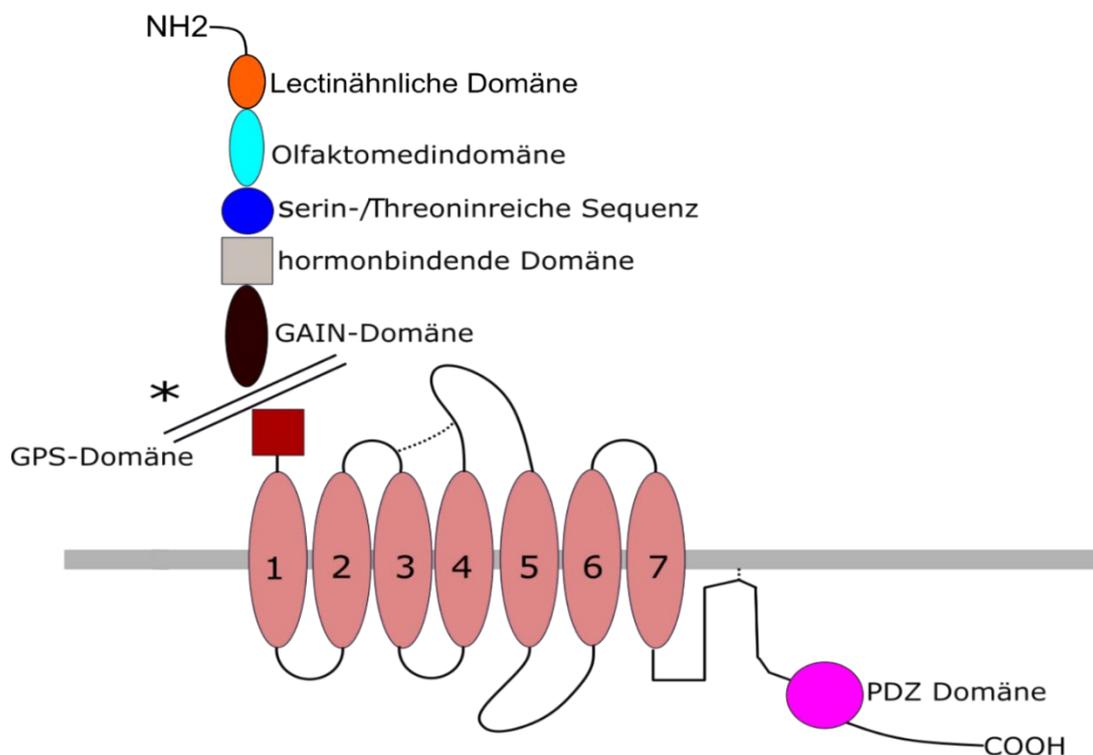


Abbildung 3: Molekulare Architektur des Latrophilinrezeptors mit strukturellen Domänen v.l.n.r.: extrazellulärer N-Terminus, lectinähnlich Domäne, olfactomedinähnliche Domäne, Serin-/Threonin-reiche Region, hormonbindende Domäne, GAIN Domäne (GPCR-autoproteolyseinduzierende Domäne) + GPS (G Protein-gekoppelte proteolytische Seite), sieben Transmembrandomänen und Intertransmembranschleifen, intrazelluläres PDZ Bindungsmotiv (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), C-Schwanz. Eigene Abbildung

1.3 Anatomie und Physiologie der Mausgewebe

Zur didaktischen Aufarbeitung werden Histologie von Gehirn, Niere und Leber der Maus in Masson Goldner Trichrom Färbung am Hellfeldmikroskop dargestellt. Im Folgenden wurden Schemazeichnungen sowie Gewebsschnitte von Mausorganen in entsprechender Vergrößerung aufgearbeitet, um die Orientierung zu erleichtern und grundlegende Prinzipien des mikroskopischen Aufbaus sowie physiologischer Funktionen der Organe zu erläutern. Die Vergleichbarkeit zum Menschen besteht weitgehend. Rote Kästen entsprechen dem Bild der Aufnahmen.

1.3.1 Mikroskopische Anatomie der Leber

Die Leber ist die größte Drüse und das zentrale Stoffwechselorgan der Maus und des Menschen. Histologisch ist die Leber aus kleinen Strukturelementen, den Leberläppchen aufgebaut. Im Bild erkennbar sind Hepatozyten, Sinusoide, Zentralvene und angedeutet die Glisson-Trias (Abbildung 4 und 5).

Das Leberläppchen stellt vereinfacht dargestellt eine 6-eckige Säule dar, an deren Kanten die Glisson-Trias liegen, welche bei der Maus kaum zu identifizieren sind. Über die Pfortader (Vena portae) und die Arteria hepatica propria fließt Blut gemeinsam in den intralobulär gelegenen Sinusoiden als Mischblut speichenförmig Richtung Zentralvene, die jeweils im Zentrum eines Läppchens liegt. Die Läppchen werden daher auch als Zentralvenenläppchen bezeichnet.

Zwischen den Sinusoiden befinden sich Hepatozytenbalkchen. Liegen die Hepatozyten Rücken an Rücken, bilden sich Canaliculi biliferi, in denen die Galle in entgegengesetzter Richtung fließt. Die Sinusendothelzellen begrenzen den Disse-Raum (Perisinusoidaler Raum) und weisen gefenstertes Endothel mit diskontinuierlicher Basalmembran auf. Neben den Hepatozyten, die den größten Anteil der Leberzellen ausmachen, befinden sich im Disse-Raum vereinzelt Ito-Zellen, welche große Lipidtropfen enthalten, worin Vitamin A gespeichert wird. Außerdem produzieren sie das interlobäre Bindegewebe. Dieses besteht aus retikulären Fasern, die das Bindegewebe der Portalfelder mit den Bindegewebsfasern der Zentralvene verbinden. Für die gesteigerte Bindegewebsbildung, die im Rahmen einer Leberzirrhose zum knotig-narbigen Umbau der Leber führt, sind die Ito-Zellen maßgeblich mitverantwortlich.

Folgen dieser Fibrosierung sind eine deutlich gestörte Leberfunktion und Durchblutung, was zu einer portalen Hypertension führen kann. Des Weiteren kommt es zum Verschluss der Poren im diskontinuierlichen Endothel, was den Stoffaustausch erschwert und als "Kapillarisierung des Sinus-Endothels" bezeichnet wird. Weiter finden sich Kupffer-Zellen im Sinne von leberspezifischen Makrophagen, die den Endothelzellen anliegen und durch Phagozytose Fremdpartikel, Bakterien und alte Blutzellen abbauen. (Adaptiert nach Wennemuth: Taschenatlas der Histologie 2012)

Quantitative Messungen der mRNA isoliert aus Lebergewebe erwachsener Mäuse zeigte eine starke Ausprägung von Lphn2, welches den größten Anteil der Isoformen ausmacht, Lphn1 und Lphn3 sind praktisch kaum vertreten sind (Boucard et al., 2014).

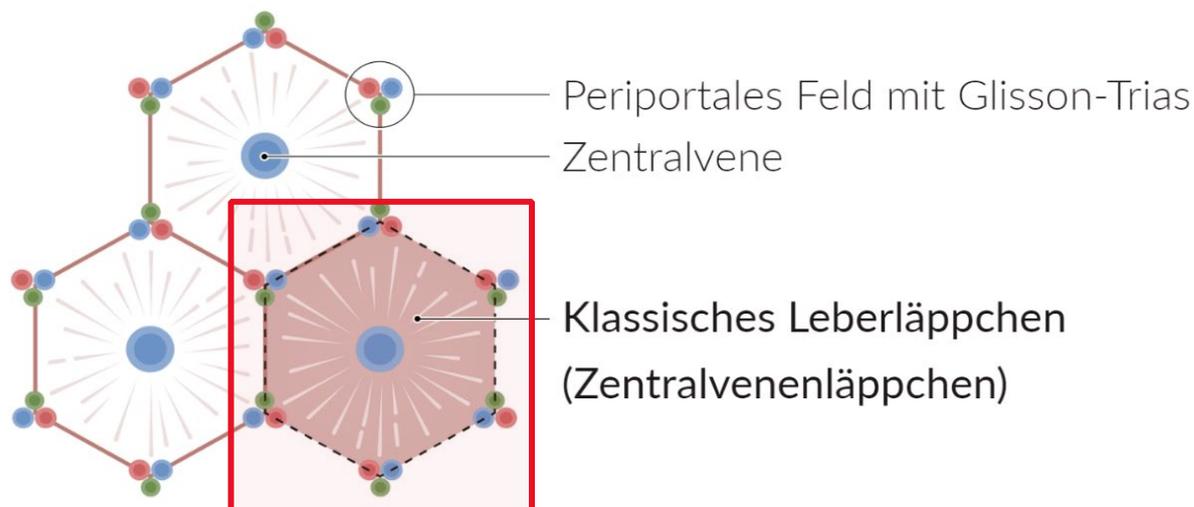


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Lebereinheiten Beschriftung relevanter Strukturen. Im Periportalfeld: rot = Arteria interlobularis, blau = Vena interlobularis, grün = Ductus interlobularis Roter Kasten = Abbildung 5. Selbst modifiziert nach © AMBOSS GmbH, Berlin und Köln, Germany

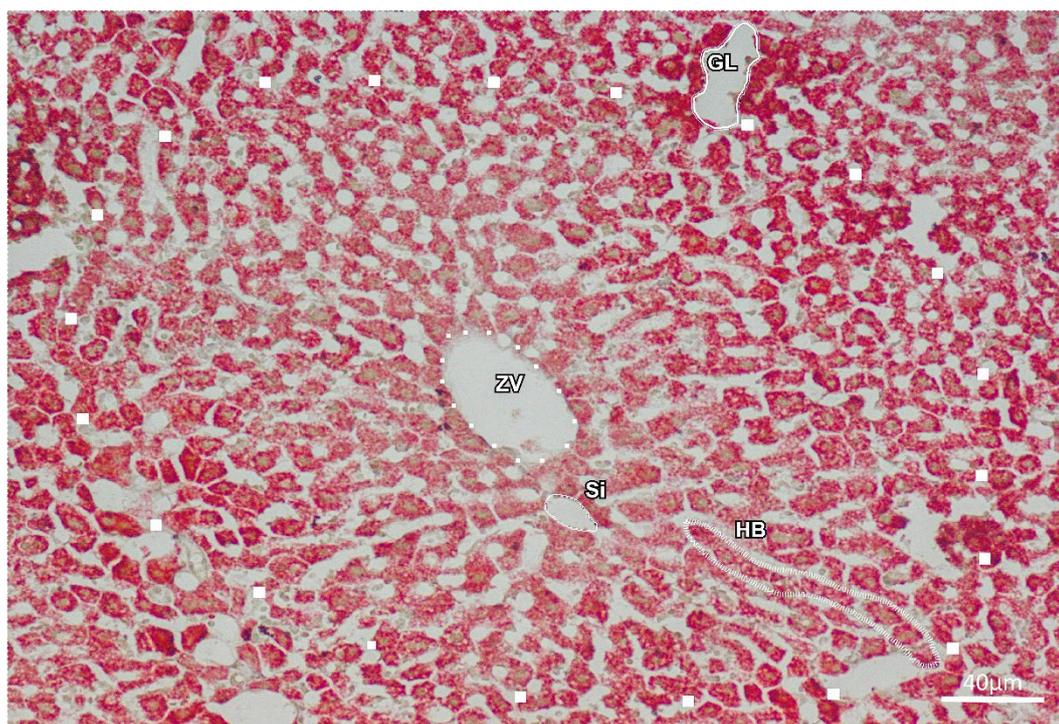


Abbildung 5: Leber der Maus, Masson Goldner Trichrom Färbung, Hellfeldmikroskop 100 μm Schichtdicke, ZV = Zentralvene, GL = Glisson-Trias (unmittelbare anatomische Nachbarschaft der Arteria interlobularis, Vena interlobularis und Ductus biliferi interlobulares in den Periportalfeldern des Lebergewebes), Si = Sinusoide, HB = Hepatozytenbälkchen. Eigene Abbildung

1.3.2 Mikroskopische Anatomie des Nephrons im Nierenparenchym

Die Niere (Ren, Nephros) ist ein bohnenförmiges, paariges Organ in der Abdominalregion von Maus und Mensch. An der konkaven Seite (Nierenhilus) treten die Nierengefäße und der Harnleiter ein- bzw. aus. Bereits makroskopisch erkennt man am Präparat eine äußere Rinde und ein inneres Mark. In der Rinde befinden sich die Nierenkörperchen, die Glomeruli. Sie bestehen letztendlich aus einem Gefäßknäuel mit zu- und abführendem Gefäß, einer Kapsel (Bowman-Kapsel) und dem juxtaglomerulären Apparat, einer Zellgruppe, die dem Glomerulus anliegt und regulatorische Funktionen übernimmt. Das Nephron, die funktionelle Einheit der Niere, setzt sich aus dem Nierenkörperchen und dem Tubulussystem zusammen. Das Nierentubulussystem hat über den Harnpol einen direkten Anschluss an das Nierenkörperchen und ist für die Konzentrierung des filtrierten Primärharns zuständig. Aus den Kapillaren innerhalb des Glomerulus wird der Primärharn aus dem Blut in das Tubulussystem durch Druckregulation filtriert, welches schließlich in ein Sammelrohr mündet. Durch komplexe Resorptions-, Transport- und Ausscheidungsprozesse wird die meiste Flüssigkeit wieder ins Gefäßsystem rückresorbiert. Hierbei entsteht der von den Sammelrohren abgegebene Endharn.

Das Nierenparenchym gliedert sich von außen nach innen in Nierenrinde, äußeres Mark (mit dem Außen- und dem Innenstreifen) und inneres Mark. Die Tubulusabschnitte lassen sich den einzelnen Parenchymbereichen zuordnen wie in Abbildung 6 dargestellt. (Adaptiert nach Wennemuth: Taschenatlas der Histologie 2012)

Quantitative Messungen der mRNA im Nierengewebe von erwachsenen Mäusen zeigte vor allem das Vorhandensein von *Lphn2* und etwa eine halb so große Menge an *Lphn1*. *Lphn3*-mRNA war kaum vertreten (Boucard et al., 2014). Basierend auf Northern-Blot-Analysen wurde vermutet, dass *ADGRL1* (*LPHN1*) (Sugita et al., 1998) und *ADGRL2* (*LPHN2*) (Sugita et al., 1998; Ichtchenko et al., 1999) in humanen Nieren von Erwachsenen exprimiert werden. Eine Analyse der mRNA aus den Nieren erwachsener Ratten deutet bestenfalls auf ein sehr niedriges Expressionsniveau von Maus-*Adgrl1* (im Vergleich zum Gehirn) und Maus-*Adgrl2* (im Vergleich zu Gehirn, Lunge und Leber) hin (Matsushita et al., 1999).

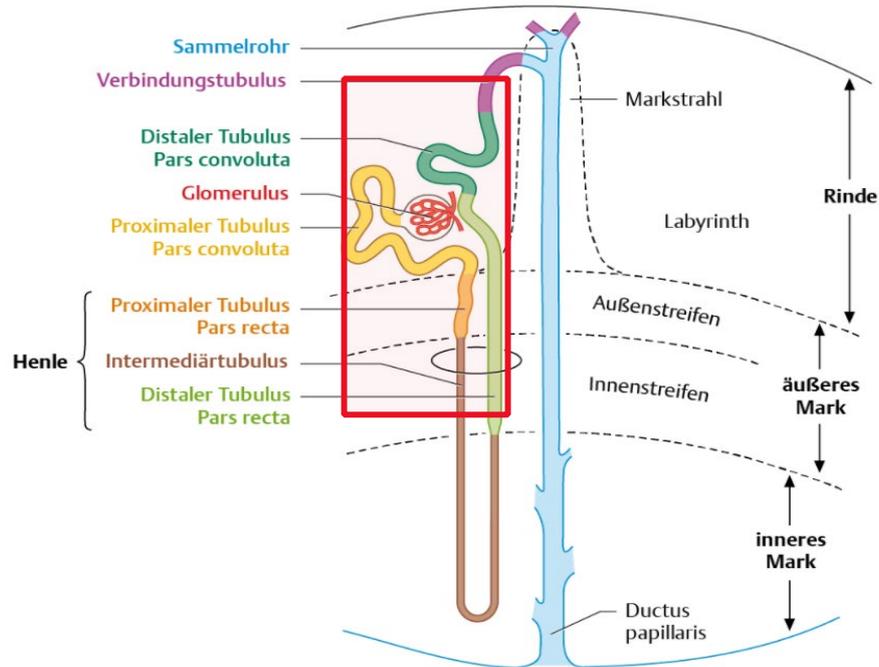


Abbildung 6: Organisation des Nephrons Synopsis der Nierenarchitektur. Links: Aufbau des Tubulussystems, rechts: anatomische Areale, Roter Kasten = Abbildung 7. Selbst modifiziert nach Lüllmann-Rauch, Taschenlehrbuch Histologie, Thieme, 2012.

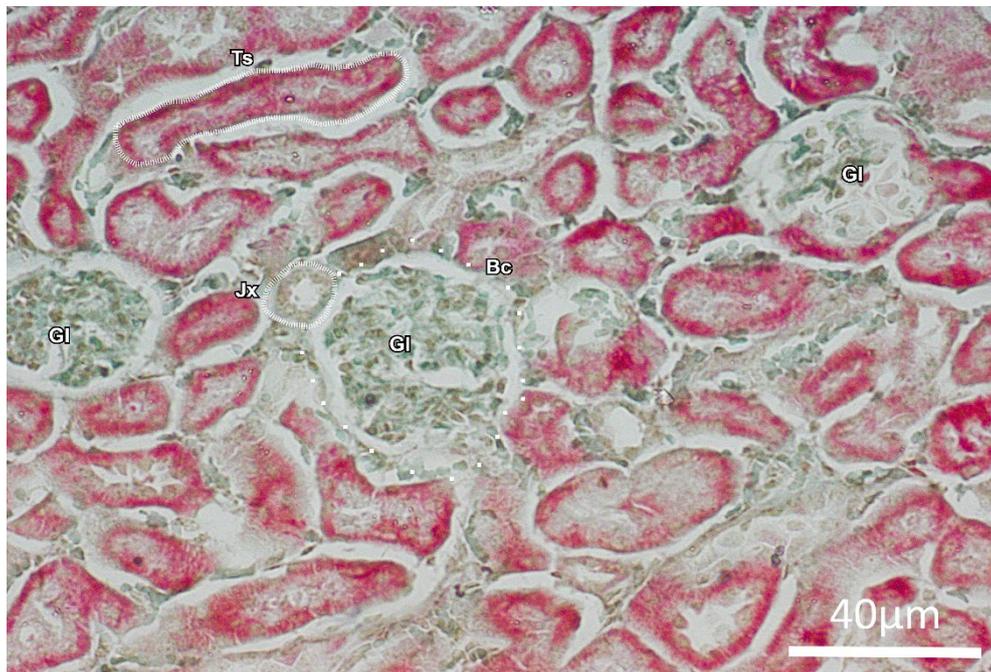


Abbildung 7: Niere der Maus, Masson Goldner Trichrom Färbung am Hellfeldmikroskop. 100 µm, 20-fach, GL = Glomerulus, Bc = Bowman Kapsel, Jx = juxtaglomerulären Apparat mit Macula densa, Ts = Tubulussystem. Eigene Abbildung

1.3.3 Cerebrale Expression von Lphn2

Als "Proof of Principle" wurden Gehirnareale der Maus in denen Lphn2 mit mVenus-Tag bereits detektiert werden konnte (Anderson et al., 2017) für die hier verwendeten Antikörper im eigenen Mausmodell erneut verglichen. So konnten verlässliche Aussagen über das Binde- und Signalverhalten von 3 verschiedenen Antikörper-Kombinationen getroffen werden.

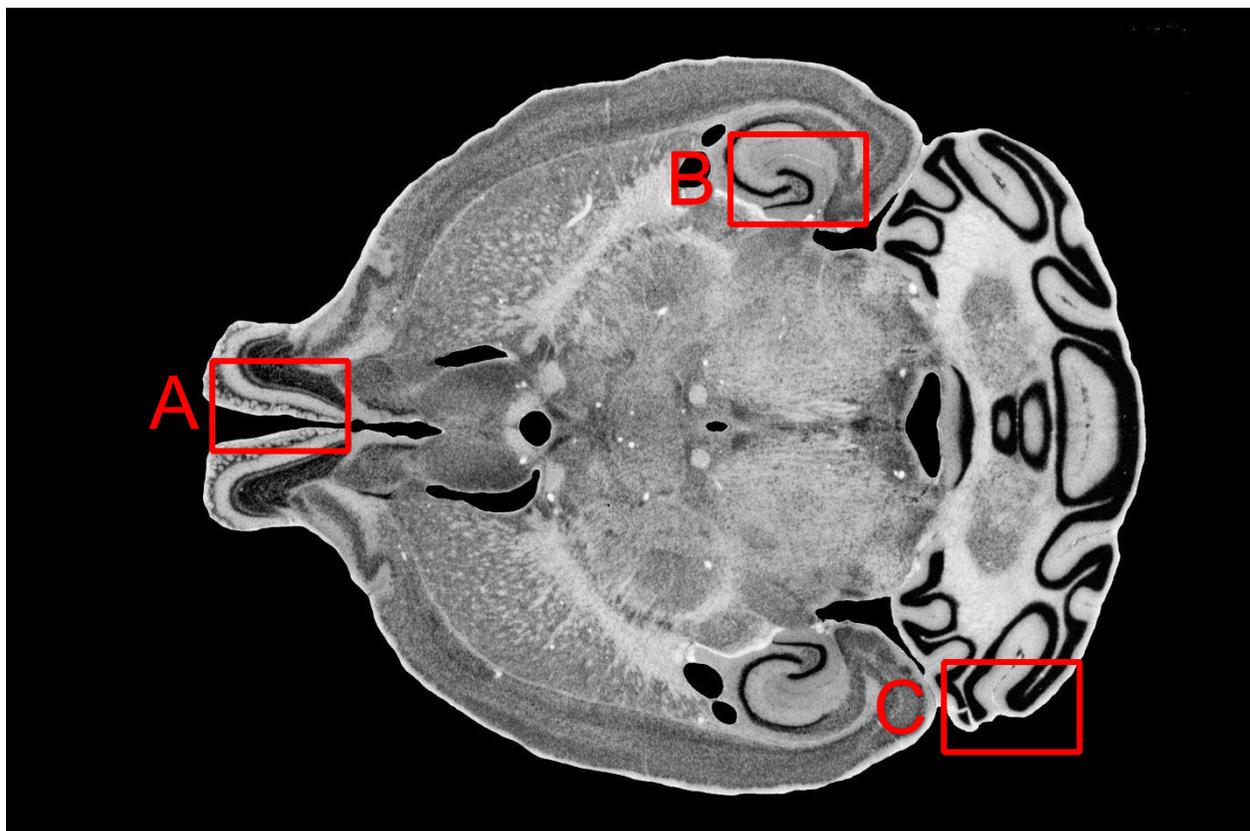


Abbildung 8: Horizontale Topografie des Mausgehirns auf Höhe der hier relevanten Strukturen: Rote Rahmen stellen die folgenden drei Gehirnregionen dar: A Bulbus olfactorius, B Hippocampus, C Cerebellum). Entnommen aus <http://www.nervenet.org/Neurogenetics> at University of Tennessee Health Science Center.

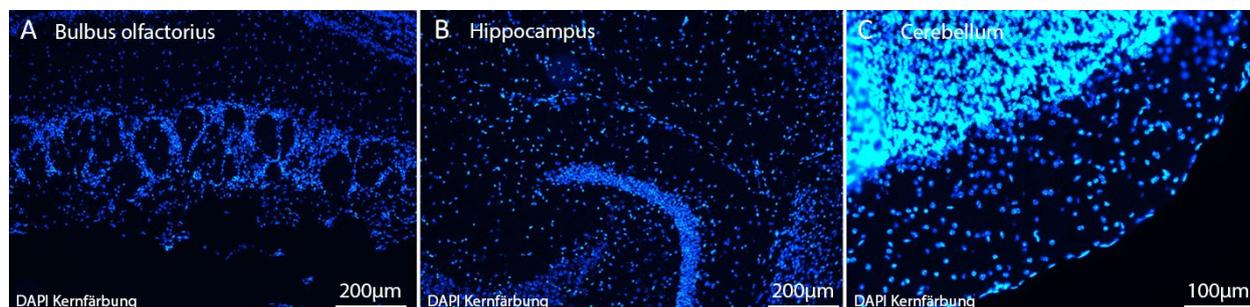


Abbildung 9: Bekannte Lphn2-Expressionsareale im Mausgehirn dargestellt mit fluoreszierender Kernfärbung (Nuklei mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol, DAPI, gefärbt) A: Bulbus olfactorius, B: Hippocampus, C: Cerebellum, wie sie in 3.5 aufgearbeitet sind. Eigene Abbildung

1.4 Antikörper und ihr Stellenwert in der Immundiagnostik

Antikörper (Immunglobuline) sind globuläre Proteine, die von Plasmazellen (differenzierte B-Lymphozyten) als Reaktionsprodukt auf bestimmte Stoffe, sogenannte Antigene, gebildet werden. Sie sind i.d.R. aus 4 Ketten aufgebaut, 2 identische schwere (heavy chains) und 2 identische leichte Ketten (light chains), welche durch Disulfidbrücken zu einer Ypsilon-förmigen Struktur miteinander verknüpft sind. Jeder Antikörper besitzt eine für ihn charakteristische Antigenbindungsstelle, das sogenannte Paratop, welches eine hohe Spezifität besitzt. Dieses Phänomen beruht auf den variablen Teilen der Aminosäuresequenz einzelner Ketten des jeweiligen Antikörperproteins, dem sogenannten antigenbindenden Fragment Fab (engl. antigen-binding fragment). Die Eigenschaft wird in der Forschung genutzt, um spezifische Oberflächenstrukturen/-marker zum Beispiel von Proteinen, gegen welche der Antikörper gerichtet ist, genau zu erkennen und zu binden. Die Antikörper „erkennen“ meist nicht die gesamte Struktur des Antigens, sondern nur einen Teil desselben, die sogenannte antigene Determinante (das Epitop). Während im menschlichen Körper hierdurch eine Immunreaktion ausgelöst wird, können *in vitro* Folgeschritte durchgeführt werden, die mit dem hergestellten Immunkomplex interagieren. Problemsituationen entstehen bei unbekanntem Epitopen also Strukturen, bei denen kein Antikörper bekannt/etabliert ist. Um dies zu umgehen, werden im Rahmen der Forschung Zielstrukturen in Organismen genetisch so verändert bzw. erweitert, dass die Erweiterung z.B. eine zusätzliche Aminosäuresequenz dann durch einen hierfür bekannten Antikörper erkannt werden kann. Antikörper die in der Labordiagnostik, medizinischen Forschung und Biotechnologie Anwendung finden, sind in der Regel künstlich hergestellte monoklonale Antikörper. Im Gegensatz zu polyklonalen Antikörpern gehen alle monoklonalen Antikörper einer Art auf nur eine Ursprungszelle zurück. Sie sind daher völlig identisch. Um künstliche monoklonale Antikörper herzustellen, wird ein B-Lymphozyt, welcher den gewünschten Antikörper produziert, durch Verschmelzung mit einer Tumorzelle zu einer unsterblichen Hybridomzelle fusioniert. Diese Zelllinie kann nun beliebig lange kultiviert werden, um so den gewünschten und immer gleichen Antikörper zu produzieren. Die Antigen-Antikörper-Reaktion bildet die Grundlage für zahlreiche experimentelle und diagnostische Verfahren (z. B. Immunfluoreszenz, Immunhistochemie, ELISA und Western Blot). Durch die hohe Spezifität der Antikörper können bei entsprechender Auslegung des Testsystems sehr kleine Konzentrationen verschiedenster Substanzen gemessen werden. (Modifiziert nach R. Klinke, H-C. Pape, St. Silbernagl: Physiologie)

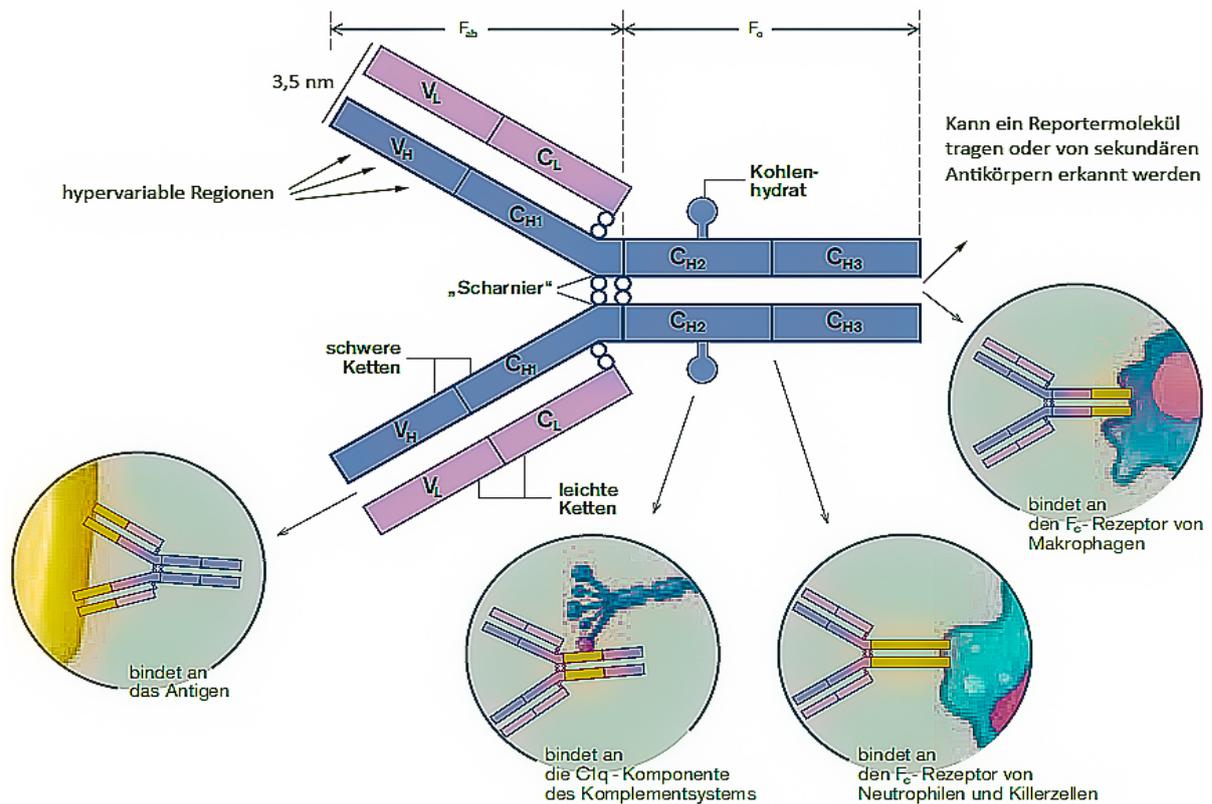


Abbildung 10: Grundstruktur des Immunglobulins G und funktionelle Zuordnung der molekularen Abschnitte.

Die leichten Ketten (VL+CL) und die schweren Ketten (VH + CH1, 2,3) sind miteinander durch nichtkovalente Bindungen und Disulfidbrücken verbunden. Wenn das Molekül durch proteolytische Spaltung mit Papain behandelt wird, entstehen ein Fragment, das sich an Antigene bindet (Fab), und ein Fragment, das leicht kristallisiert (Fc). Diese proteolytische Spaltung des IgG-Moleküls durch Papain wird ausschließlich zu strukturellen Untersuchungszwecken durchgeführt und findet nicht *in vivo* statt. Zwischen dem Fab- und dem Fc-Teil liegt ein hoch beweglicher Abschnitt (Scharnierabschnitt oder „hinge region“), der es den Fab-Teilen des Y-förmigen Moleküls ermöglicht, sich mehr oder weniger weit zu öffnen, um sich an unterschiedliche räumliche Distanzen von antigenen Epitopen anzupassen. Die verschiedenen Aminosäureabschnitte der H-Ketten und L-Ketten besitzen charakteristische räumliche Strukturen, die als Domänen bezeichnet werden. Im abgebildeten IgG-Molekül sind insgesamt 12 solcher Domänen vorhanden (VL und CL sowie VH und CH1, 2, 3). Die Bindungseigenschaften des Moleküls hängen von den Domänen ab, die in den entsprechenden Abschnitten farblich (gelb) gekennzeichnet sind. (Modifiziert nach R. Klinke, H-C. Pape, St. Silbernagl: Physiologie)

Als Immunhistochemie, kurz IHC, bezeichnet man die Untersuchung von Geweben mit immunchemischen Methoden, beispielsweise die Anfärbung von Zell- oder Gewebestrukturen mit an Antikörper gekoppelten Farbstoffen (Kurzlehrbuch Histologie. Ulfig N, Hrsg. 4., korrigierte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2015). In dieser Arbeit wurden zur Darstellung der Proteine im Gewebsschnitt die Immunhistochemie eingesetzt. Man unterscheidet direkte und indirekte Färbungen. Bei der direkten Färbung ist ein Antikörper direkt mit einem Marker gekoppelt, während bei indirekten Färbungen zunächst ein primärer Antikörper sein Epitop erkennt und dann ein sekundärer Antikörper, welcher gegen das Fc-Fragment des primären AK gerichtet ist, zum Einsatz kommt und den Marker trägt. Mithilfe geeigneter Färbelösungen, die das Antikörper-Enzym-Konjugat in Reaktion bringen, entstehen im Hellfeld detektierbare Präzipitate

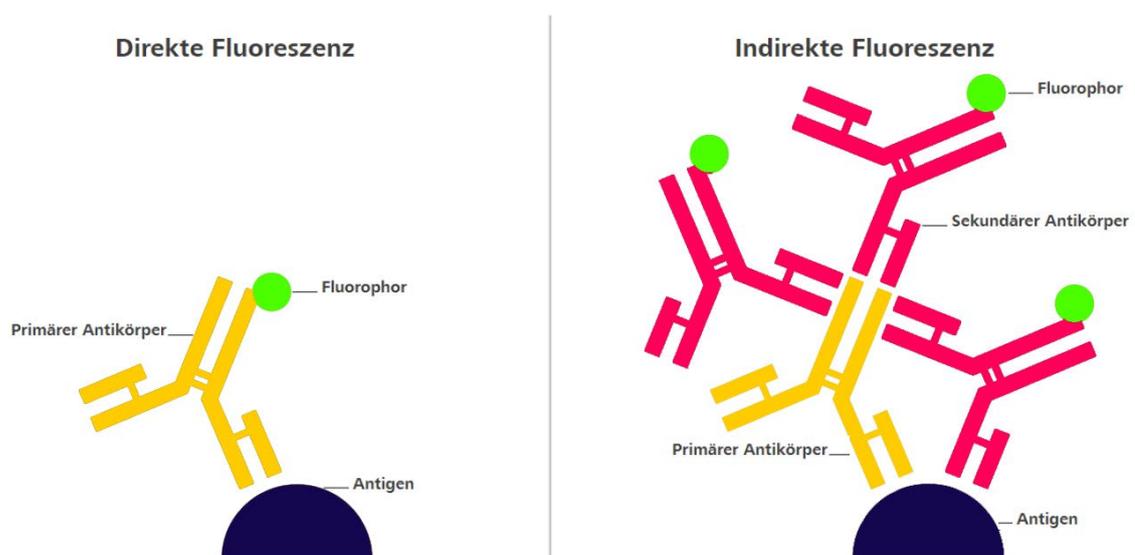


Abbildung 11: Direkte vs. indirekte Fluoreszenz (Modifiziert nach ZEISS Technology Note)

Handelt es sich bei dem Marker um einen fluoreszierenden Farbstoff, spricht man von Immunfluoreszenz. Die Immunfluoreszenz kurz IF ist eine diagnostische Methode aus dem Bereich der Immunhistochemie, bei dem Antikörper eingesetzt werden, die mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert sind. Die gebundenen Antikörper können dann im Fluoreszenzmikroskop mit den entsprechenden Filtern identifiziert werden. Vorteile der direkten Immunfluoreszenz sind ein kürzeres Protokoll und eine geringere Gefahr der Kreuzreaktivität; der größte Nachteil ist die geringe Signalintensität. Bei der indirekten Immunfluoreszenz können mehrere sekundäre Antikörper den gleichen primären Antikörper binden, um das Fluoreszenzsignal zu verstärken. Dieses zweistufige Markierungs-Protokoll erhöht jedoch auch die Komplexität und kann zu Kreuzreaktionen innerhalb der Probe führen.

1.4.1 Nanobodies

Eine besondere Form der für die Forschung genutzte, aber auch in der Natur vorkommende Antikörper, sind die der Kameliden (Kamele, Lamas, Alpakas, Vicunjas). Aufgrund ihrer Struktur wurden diese besonderen Kamelid-Antikörper als schwere Kettenantikörper (hcAb) bezeichnet, da sie nur aus schweren Ketten bestehen und keine leichten Ketten aufweisen. Eine plausible Erklärung könnte sein, dass diese kleinen Einzeldomänen-Antigen-Bindungsfragmente im Gegensatz zu herkömmlichen (vergleichsweise großen) Antikörpern das Targeting von ansonsten unzugänglichen Epitopen, z. B. katalytische Zentren von Enzymen ermöglichen (Flajnik et al., 2011). In Abwesenheit leichter Ketten wird der Fragment-Antigen-bindende (Fab) Teil dieser Antikörper auf eine einzige Domäne reduziert. Daher gehören hcAbs zur Klasse der Single-Domain-Antikörper (sdAbs). Die einzelne Domäne wird als VHH-Domäne (Variable Heavy Domain of Heavy Chain Antikörper) oder Nanobody bezeichnet. Die VHH-Domäne enthält eine vollständige Antigenbindungsstelle und ist das kleinste funktionelle Antigenbindungsfragment (mit etwa 15 kDa - nur ein Zehntel der Größe eines herkömmlichen Antikörpers). (Modifiziert nach <https://www.ptglab.com/products/chromotek-nanobody-based-reagents/about/about-nanobodies/>)

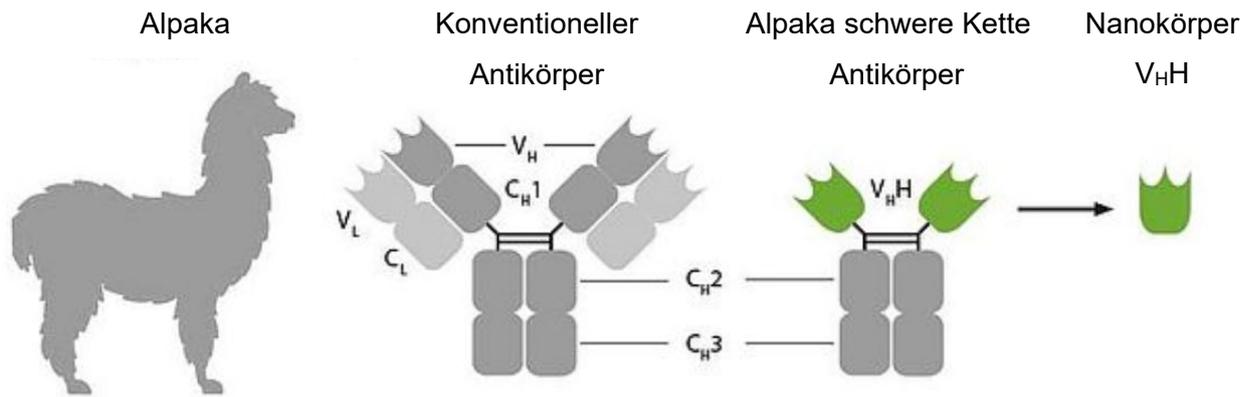


Abbildung 12: Herkunft von Nanokörpern und Vergleich mit konventionellen Antikörpern.
(Modifiziert nach ChromoTek.com)

Im Allgemeinen können Nanokörper rekombinant in Bakterien hergestellt werden, wodurch ihre praktisch unbegrenzte Versorgung in gleichbleibender Qualität sichergestellt wird. Im Gegensatz zu herkömmlichen Antikörpern sind Nanokörper auch außergewöhnlich stabil und halten extremen Temperaturen, Detergenzien, Glycerin, Salz, reduzierenden Bedingungen und dem pH-Wert stand (ChromoTek.com). In dieser Arbeit findet der FluoTag®-X4 anti-GFP (NanoTag Biotechnologies) in der Fluoreszenzmikroskopie Anwendung.

1.5 Fluoreszenzmikroskopie

1.5.1 Definition Fluoreszenz:

Fluoreszenz ist die Emission eines Photons beim Übergang eines Elektrons von einem höheren in ein tieferes Energieniveau eines Moleküls nach Absorption von Licht kurzer Wellenlänge (innerhalb von wenigen Nanosekunden). (G.G. Stokes, 1852)

Dies beschreibt die Eigenschaft von Atomen und Molekülen, in diesem Fall sogenannten Fluorophoren, Licht bei einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren und anschließend Licht mit längerer Wellenlänge zu emittieren.

Die Fluoreszenzmikroskopie kann entweder auf Autofluoreszenz oder der Zugabe von Fluoreszenzfarbstoffen basieren. Sie wird hauptsächlich in der Biologie und Medizin eingesetzt, um Strukturen und Prozesse im Inneren einer Probe zu beobachten.

1.5.2 Prinzipien der Fluoreszenz:

Ein fluoreszierendes Molekül nimmt Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung auf und emittiert dann Licht. Durch Absorption von Photonen kurzwelliger Strahlung (Exzitation) werden Elektronen eines Moleküls in einen höheren, energiereichen kurzlebigen Zustand überführt (Quantensprung). Das Elektron befindet sich dann im angeregten Zustand (excited state). Da aufgrund thermodynamischer Gesetze ein Bestreben besteht, möglichst energiearme Zustände anzunehmen, gibt das Elektron die aufgenommene Energie nach kürzester Zeit (innerhalb weniger Nanosekunden) wieder ab. Die beim Übergang vom energiereichen zum energiearmen Niveau freigesetzte Energie wird als sichtbares Licht größerer Wellenlänge emittiert (Emission). Die Differenz zwischen den Wellenlängen wird als Stokes-Verschiebung (Stokes-Shift) bezeichnet (G.G. Stokes, 1852). Siehe hierzu Abbildung 13 im Folgenden.

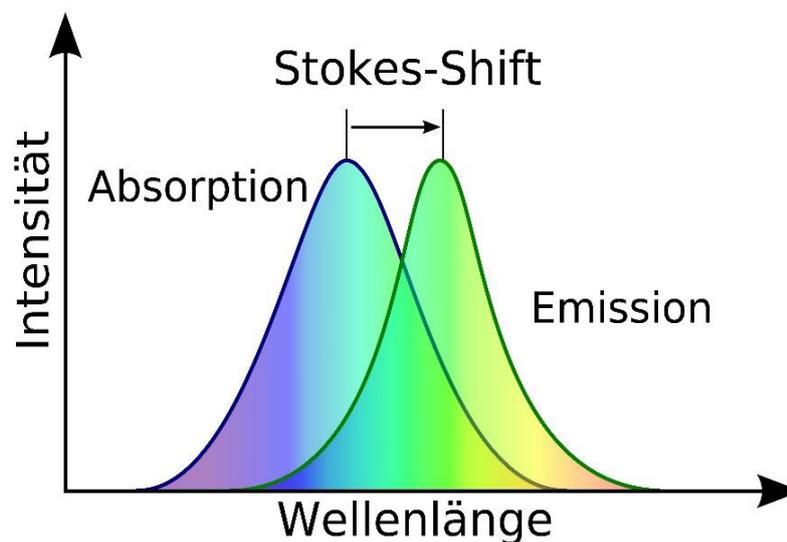


Abbildung 13: Stokes-Verschiebung auch **Stokessche Regel** oder **Stokessches Gesetz** genannt – ist die Verschiebung der Wellenlänge bzw. der Frequenz von Licht zwischen Absorption und Emission. Wie sie beispielsweise bei der Fluoreszenz auftritt. Quelle: Von Cepheiden - Eigenes Werk, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=9463545>

Eine besondere Stellung in der Fluoreszenzmikroskopie nehmen fluoreszierende Proteine wie GFP (engl. green fluorescent protein) und die hiervon abgeleiteten Varianten (EGFP, EYFP oder ECFP u. a.) ein wobei das E der Akronyme für verstärkt (engl. enhanced) steht. GFP ist ein erstmals 1962 beschriebenes Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*, welches bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert. Die Gensequenz dieser Proteine kann durch Transfektion (Einbringen von Fremd-DNS oder RNS) in das Genom eines eukaryotischen Organismus inseriert und zur Ausprägung gebracht werden. Das rekombinante fluoreszierende Protein wird anschließend – abhängig von Insertionsort und Promotorsequenz – von dem

transgenen Organismus exprimiert. Die GFP-Gensequenz kann so als Reporter gen genutzt werden, um entwicklungs- oder gewebespezifische Genexpression *in vivo* sichtbar zu machen. Durch Expression von Fusionsproteinen, sogenannten chimären Proteinen, die aus Bestandteilen eines Zielproteins und dem fluoreszierenden Protein bestehen, können außerdem Zielproteine optisch detektiert, zellulär lokalisiert und charakterisiert werden. So ist es dann möglich, ihre Dynamik im lebenden Organismus zu untersuchen.

Weitere Anwendungsbeispiele von Fluoreszenz in Biochemie und Medizin sind:

Eine Form der automatischen Sequenzierung der DNS mit der Sanger-Methode bzw. Kettenabbruchmethode nach Sanger, welche die Bestimmung der Basenabfolge in einem bestimmten DNS-Molekül ermöglicht. Hierbei hat jede der vier terminierenden Nukleinbasen eines DNS-Fragments ihre spezifische fluoreszierende Markierung. Wenn die markierten DNS-Moleküle anschließend getrennt werden, werden die Marker durch UV-Licht angeregt. Die Identität der Marker wird dann anhand der Wellenlänge des emittierten Lichtes festgestellt.

Die Verbindung Ethidiumbromid. Sie zeigt in Lösung kaum Fluoreszenz, da sie hier ihre Konformation frei ändern kann. Jedoch wird durch Bindung an DNS die Fluoreszenz stark erhöht, was sie nützlich bei der Lokalisierung von DNS-Fragmenten macht, z. B. bei der Agarose-Gelelektrophorese. In dieser Arbeit wurde alternativ, wie in 2.2.4 beschrieben, Midori Green Advance verwendet, da es im Vergleich zu Ethidiumbromid bei sonst ähnlich guten Eigenschaften in Bezug auf Fluoreszenz als nicht toxisch und nicht kanzerogen gilt.

Die Immunologie. Hier werden Antikörper mit einer fluoreszierenden chemischen Gruppe versehen, welche dann als Fluoreszenzsonden fungieren. Moleküle, an die diese Antikörper spezifisch binden, sind so anhand der Fluoreszenz detektierbar. Sie können somit – z. B. in einer Zelle – präzise lokalisiert werden und darüber hinaus kann die Konzentration dieser Moleküle bzw. die Antigen-Konzentration auch quantitativ bestimmt werden.

Im Jahr 1962 wurde entdeckt, dass die fluoreszierende Eigenschaft der Quallenart *Aequorea victoria* (Abbildung 14) auf das grün fluoreszierende Protein (GFP) zurückzuführen ist. (Shimomura et al., 1962)



Abbildung 14: Aequorea victoria, auch Kristallqualle genannt. Das fluoreszierende Protein aus *Aequorea victoria* wird vor allem in der Molekularbiologie in vielen Fällen als Reporterprotein eingesetzt. Das Gen für das grün fluoreszierende Protein (GFP) wurde isoliert, kloniert und konnte dadurch gentechnisch hergestellt werden. (Kendall & Badminton, 1998) Quelle: https://de.wikipedia.org/wiki/Aequorea_victoria

Im Jahr 2008 wurde der Nobelpreis für Chemie für die „Entdeckung und Weiterentwicklung des grün fluoreszierenden Proteins“ an Osamu Shimomura, Martin Chalfie und Roger Tsien verliehen (nobel.org). Modifizierungen des Original-GFP welche unterschiedliche Fluoreszenzspektren aufweisen heißen entsprechend den Farben zum Beispiel CFP (cyan), BFP (blue) oder YFP (yellow).

1.5.2.1 Das Fluoreszenzmikroskop

Die Hauptaufgabe eines Fluoreszenzmikroskops besteht darin, eine Probe mit Licht einer bestimmten Anregungswellenlänge zu beleuchten und gleichzeitig das vergleichsweise schwächere emittierte Licht der Probe zu sammeln und zu trennen.

Abbildung 15 und 16 veranschaulichen den grundlegenden Aufbau und die Funktion eines Fluoreszenzmikroskops, das eine Probe mit GFP abbildet.

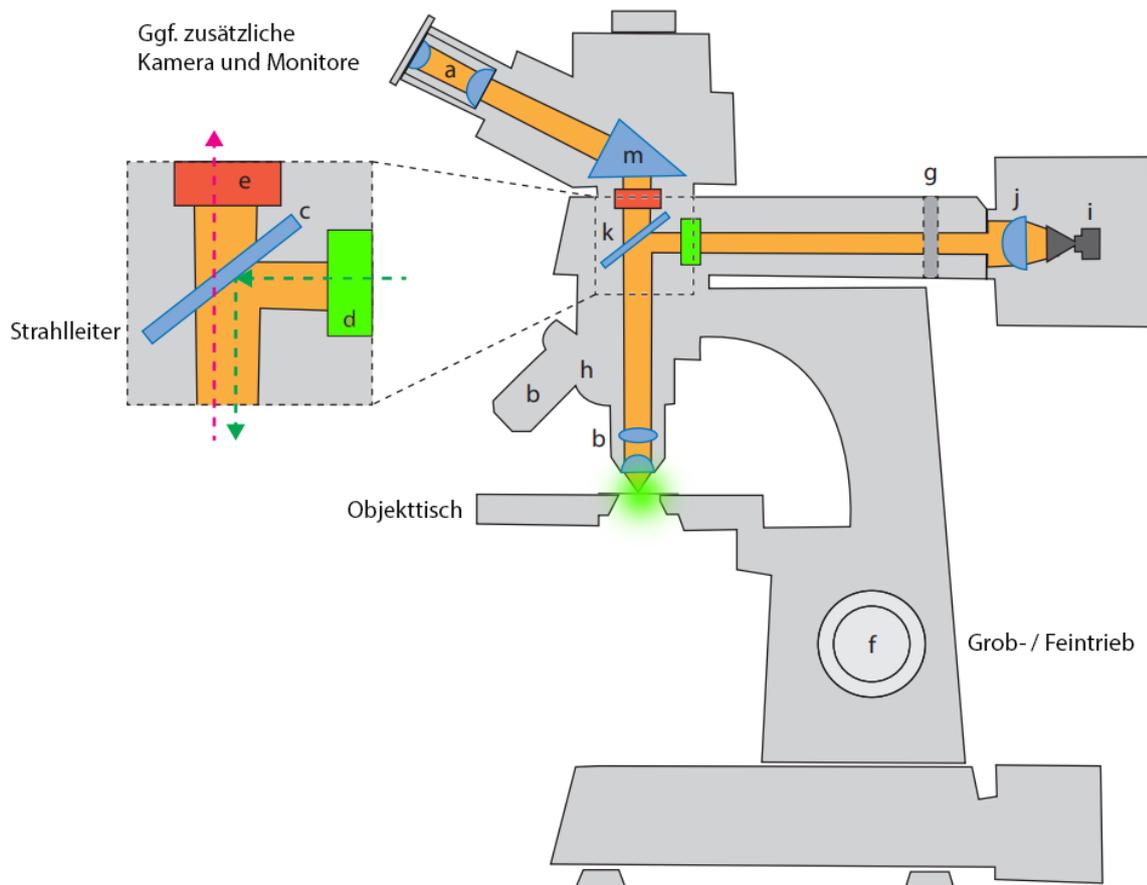


Abbildung 15: Technischer Aufbau der Komponenten eines Fluoreszenzmikroskops: (a) Okular, (b) Objektiv, (c) dichromatischer Spiegel, (d) Exzitationsfilter, (e) Emissionsfilter, (f) Fokussiertrieb (Grob- und Feintrieb), (g) Shutter (Verschlusschieber), (h) Objektivrevolver, (i) Lichtquelle, (j) Kollektor, (k) Filterblock, (m) Tubusprisma. Modifiziert nach: Schmitz S., Desel C. (2018) Fluoreszenzmikroskopie. In: Der Experimentator Zellbiologie. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg

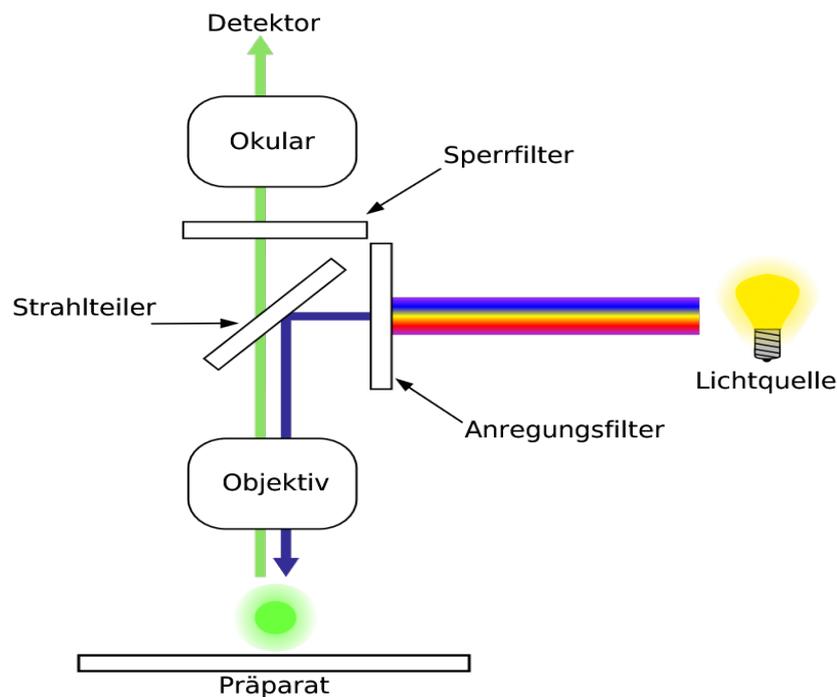


Abbildung 16: Prinzip der Bildgebung und optische Elemente in einem Fluoreszenzmikroskop.
 Quelle: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4876534>

Im Vergleich zu Durchlicht-Hellfeldmikroskopen verfügen Fluoreszenzmikroskope über eine zusätzliche Aufsicht-Beleuchtungsachse für das Fluoreszenz-Anregungslicht. Das zu beobachtende Objekt wird also durch das Objektiv beleuchtet. Die folgende Erläuterung bezieht sich auf die schematische Skizze Abbildung 16.

Mit Hilfe eines passend ausgewählten optischen Filters, dem sogenannten Anregungsfilter, wird von der verwendeten Lichtquelle nur der Teil des erzeugten Lichts durchgelassen, welcher die für die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs notwendigen Wellenlängen enthält. Der Bereich des Spektrums, in welchem der Fluoreszenzfarbstoff leuchtet, darf den Anregungsfilter nicht passieren.

Ein Strahlteiler reflektiert das Anregungslicht zum Objektiv, worauf im Präparat die Fluoreszenz entsteht. Das Objektiv übernimmt somit also auch die Funktion des Kondensors. Die Fluoreszenz ist langwelliger als das Anregungslicht (wie in 1.5.2 beschrieben).

Der Anteil des Fluoreszenzlichts, welcher vom Objektiv gesammelt wird, erreicht wiederum den Strahlteiler. Durch dessen besondere Eigenschaften wird dieses nun längerwellige Licht in Richtung Okular oder Detektor durchgelassen (und nicht gespiegelt). Anregungslicht, welches im Präparat reflektiert wird, nimmt nicht an der Bildgebung teil da es weitgehend wieder zur Lampe gelenkt wird.

Da Strahlteiler nicht perfekt arbeiten, gelangt ein geringer Teil des im Präparat reflektierten Anregungslichts trotzdem in Richtung Okular beziehungsweise Detektor. Da die Intensität der Fluoreszenz im Vergleich zur Anregung sehr schwach ist, ist deshalb ein weiterer optischer Filter, genannt Sperrfilter oder Emissionsfilter erforderlich, um dieses restliche Anregungslicht zu eliminieren. (Modifiziert nach: Grundlagen der Fluoreszenz und Fluoreszenzmikroskopie, Verfasser: Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland, Mai 2019).

1.6 Fragestellung

Im Hinblick auf die zuvor erwähnten Funktionen und Bedeutung des Lphn2-Rezeptors ist die Fragestellung dieser Arbeit, wie ein Lphn2-mVenus Fusionsprotein in Nieren- und Lebergewebe einer Reportermaus sicher mit entsprechenden Antikörpern markiert und in der Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden kann. Bildmaterial bzw. Visualisierungen des Rezeptors in diesen Geweben ist äußerst spärlich, außerdem gestaltet sich der Umgang mit Autofluoreszenz schwierig und es finden sich nur wenige, praktikable Protokolle (Niku et al., 2007; Sun et al., 2011). Es sollen entsprechende Verfahren etabliert, sowie spezifische Eigenschaften der Materialien und Limitationen herausgestellt werden. Ziel ist es eine strukturierte zelluläre Bildanalyse zur Verteilung der Signale zu erstellen, auf deren Grundlage mögliche Funktionen des Rezeptors in den verschiedenen Kompartimenten postuliert werden können. Im Hinblick auf die Expression der Lphn2-mRNS Expression in vielen lebenswichtigen Organensystemen (Meza-Aguilar & Boucard, 2014) kann eine genauere Übersicht für künftige Forschung hilfreich sein.

Darüber hinaus ist die Zielsetzung, das Verfahren praktikabel und wirtschaftlich zu gestalten wobei verschiedene Ansätze, wie zum Beispiel das Aufbereiten der Gewebe, die Behandlungsprotokolle und mögliche Optimierungen im Zusammenhang mit der Akquisition der Signale in der Fluoreszenzmikroskopie etabliert und präsentiert werden sollen. Hierbei wird im Rahmen eines „Proof of Principle“ an bestehende Arbeiten angeknüpft und diese dann um die nötigen Schritte und Verfahren erweitert, welche nötig sind um Lphn2-mVenus in aufbereiteten Nieren- und Lebergeweben der Reportermause bestmöglich sichtbar zu machen.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte, Material und Reagenzien

2.1.1 Geräte

Absaugeinheit Knf LAB Laboport	Knf Neuberger, Freiburg
Analysenwaage ABS-N/ABJ-NM	Kern & Sohn GmbH
CFX-Connect Real-Time System (CFX = Cycling and Fluorescence eXpert)	Bio-Rad, München
Chemi Doc XRS + System	Bio-Rad, München
Elektrophoresewanne	Bio-Rad, München
Fluoreszenzmikroskop, Axio Imager M.2 mit AxioCam 512 color	Zeiss, Oberkochen
Gefrierschrank -80° C HFU600TV	Fisher Scientific, Deutschland
Grant Instruments™ Trockenblockheizsystem	Fisher Scientific, Deutschland
Homogenisator TissueRuptor	Qiagen, Hilden
Kryostat CM 1950	Leica, Nussloch
Kühlschrank 4° C sch800/R	GGM Gastro, Gronau, Deutschland
Leica MZ 9,5:1 Stereomikroskop Binokular	Houston, Texas
Lichtmikroskop CHK	Olympus, Hamburg
Magnetrührer IKAMAG® RET G	Kurt Migge, Heidelberg
Mikrozentrifuge Micro 17, luftgekühlt	Fisher Scientific, Deutschland
Mini-Zentrifuge ROTILABO	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
OK. Mikrowelle OMW 700W	MediaMarkt GmbH, Deutschland
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad, München
Schüttelgerät ST 5, wippend	M. Zipperer, Ballrechten-Dottingen
SevenExcellence pH-Messgerät	Mettler Toledo, Deutschland
Sigma 3-18KS Tischkühlzentrifuge	Sigma, Osterode am Harz

Sub-Cell® GT Gelelektrophoresekammer

mit PowerPac™ Basic Power Supply

Thermalcycler T100

Ultraschall-Homogenisator Sonoplus HD 2070

Vortexer RS-VA 10

vWR OS-500 Shaker

Wasserbad

Bio-Rad, München

Applied Biosystems, USA

Bandelin electronic, Berlin

Phoenix Instrument, Garbsen

Marshall Scientific, Hampton, USA

P-D Industriegesellschaft, Dresden

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Cellstar® TUBES 15ml / 50 ml

Cryomold Standard (25 x 20 x mm)

Einmailinjektionskanüle (Gr. 20 und 16)

Eis

Fettstift Dako Pen

Filterpapier

Midori Green Advance

Mikrotiterplatte

Multititerplatte 96 well, thin wells, PCR plates

Multititerplatte, 96 well, TC Platte, Standard F

Objektträger Super Frost Plus (25 x 75 x 1mm)

Objektträger und Deckgläser 14x60mm

Objektträger Wärmetisch

PAP-Pen Mini Liquid Repellent Slide Marker

Parafilm

Pipetten, serologisch 2ml/5ml/10ml/25ml

Pipettierhilfen LABSOLUTE®

Polypropylen Röhrchen 15ml, 50ml

Probenleiter Precesion Plus Protein All Blue

Greiner Bio One, Gremsmünster

Sakura Finetek, USA

Braun, Meslungen

AF 100 Scotsman, Flockeneisbereiter

Glostrup, Denmark

Macherey-Nagel, Düren

NIPPON Genetics EUROPE, Düren

Bio-Rad, München

HARD-Shell

SARSTEDT, Nümbrecht

R. Langenbrinck, Emmendingen

Carl Roth, Karlsruhe

Medax, Neumünster

Science Services, München

Carl Roth, Karlsruhe

SARSTEDT, Nümbrecht

Th.Geyer, Renningen

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Bio-Rad, München

Reagiergefäß 0,5ml / 1,5ml / 2ml	SARSTEDT, Nümbrecht
TC-Platte 12 Well	Sarstedt, Deutschland
Tissue-Tek® O.C.T Compound,	Sakura® Fine Tek, Torrance, USA
Transferpipette 6ml	Sarstedt, Deutschland
TUBES 5,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Vasco® Einmalhandschuhe Nitril long M	B.Braun, Melsungen

2.1.3 Chemikalien

2-Methylbutan	Carl Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bis-acrylamid 30%/0,8%	Bio-Rad, München
Agarose Biozym LE	Biozym Scientific, Oldendorf
Ambion® Nuclease-free water	Thermo Fisher Scientific, USA
Ammoniumperoxodisulfat	Bio-Rad, München
Avidin/Biotin Blocking Kit	Burlingame, California, USA
BCA-Protein-Assay	Thermo Fisher Scientific, USA
Beta-Mercaptoethanol Gibco®	Thermo Fisher Scientific, USA
cOmplete Protease-Inhibitor	Merck, Darmstadt
Coomassie brilliant blue	Bio-Rad, München
DAPI =4',6-Diamidino-2-phenylindol	Carl Roth, Karlsruhe
Destilliertes Wasser (Aqua bidest)	B.Braun, Melsungen
di-Natriumhydrogenphosphat	Grüssing, Filsum
DMSO for molecular biology	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethanol 70%	Zentrales Chemikalienlager, UKS
Flüssiger Stickstoff	Westfalen, Münster
Forene = 2-Chlor-2-difluormethoxy-1,1,1-trifluorethan	AbbVie, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magermilchpulver Sucofin, leicht löslich	TSI, Zeven
MgCl ₂	Merck, Darmstadt

Midori Green Advance	NIPPON Genetics EUROPE, Düren
Mowiol	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	Grüssing, Filsum
Natriumdihydrogenphosphat	Grüssing, Filsum
Orange G	Sigma Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau S	Carl Roth, Karlsruhe
Rinderserumalbumin	Biomol, Hamburg
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Sudan Black B (Sudanschwarz B)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Super Signal West Pico Peroxide Solution	Thermo Fisher Scientific, USA
Supersignal West Pico Plus	
Luminal Enhancer Solution	Thermo Fisher Scientific, USA
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Bio-Rad, München
Triton X 100	Carl Roth, Karlsruhe
Tween 20	Sigma Aldrich, Steinheim
Vectastain® ABC-Kit, PK-4001) (streptavidine/peroxidase-based immunohistochemistry, Rabbit IgG)	Burlingame, California, USA
Vector® NovaRED™ Peroxidase (HRP) Substrate Kit - LS-J1084	Burlingame, California, USA
Direct-zol® RNA Mini Prep Plus	Zymo Research, Freiburg
Weigerts Hämatoxylinlösung A	
Weigerts Hämatoxylinlösung B	
Goldner Lösung I + II + III	Carl Roth, Karlsruhe
True Black ® Lipofuscin Autofluorescence Quencher	Biotium, Inc., USA
True View ® Autofluorescence Quencher	Vector Labs, USA

2.1.4 Medien und Puffer

Laird-Puffer	0,1 M	12,1 g	Tris
	5 mM	1,86 g	EDTA
	0,2 M	11,69 g	NaCl
	0,2% (v/v)	20 ml	SDS-Lösung (10%)
		ad 1 l	Aqua bidest; pH 8,5
APS Stammlösung	10% (w/v)	1 g	Ammoniumpersulfat
		ad 10 ml	Aqua bidest, Lagerung bei 4° C
Paraformaldehyd-Lösung		4 g	Paraformaldehyd-Pulver
		ad 100 ml	H ₂ Odd; pH 7,4 Titration mit Natronlauge bis sich das Paraformaldehyd aus der milchigen, weißen Flüssigkeit löst (pH >7)
Coomassie-Färbelösung	0,25% (w/v)	1,25 g	Coomassie Brilliant Blue R-250 Essigsäure
	10% (v/v)	50 ml	Methanol
	50% (v/v)	250 ml	Aqua bidest, filtrieren durch Faltenpapier bei RT lichtgeschützt lagern

Ponceau-Färbelösung	0,2% (w/v)	1 g	Ponceau S
	3% (v/v)	15 ml	Trichloressigsäure
		ad 500 ml	Aqua bidest
ProteinaseK-Stammlösung	20 mg/ml	1 g	Proteinase K
		ad 50 ml	Aqua bidest, Lagerung bei -20° C
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	0,757 g	Tris
	3% (w/v)	3 g	SDS (Pulver)
	10% (v/v)	10 ml	Glyzerin
	0.01% (w/v)	10 mg	Bromphenolblau
	5% (v/v)	5 ml	Beta-Mercaptoethanol
	ad 100 ml	Aqua bidest; pH 6,8; Lagerung bei Raumtemperatur ohne Beta-Mercaptoethanol	
1x SDS-Transferpuffer		200 ml	5X SDS-Transferpuffer
	20% (w/v)	200 ml	Methanol
		ad 1 l	Aqua bidest
5x SDS-Transferpuffer	50 mM	15,4 g	Tris-HCl
	0,1 M	18,5 g	Tris-Base
	0,8 M	144,2 g	Glycin
		ad 2 l	Aqua bidest; pH 8,3

SDS Waschblotpuffer	8,5 mM	2,68 g	Tris-HCl
	1,7 mM	0,4 g	Tris-Base
	50 mM	5,8 g	NaCl
	0,1%	2 ml	Tween 20
		ad 2 l	Aqua bidest
Tris-HCl	500 mM	6,06 g	Tris
		ad 1 l	Aqua bidest, pH 7,6
Tris HCl 1,5 M (pH 8,8)	1500 mM	45,43 g	Trizmaabase
		ad 250 ml	Aqua bidest, titriert mit HCl auf pH 8,8
Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8)	500 mM	30,29 g	Trizmahydrochlorid
Gewebe-Lysis-Puffer 1% (v/v)		10 µl	Proteinase K-Stammlösung
		ad 1 ml	Laird-Puffer
Blocking-Solution (BS)	(100 ml)	10%	Pferdeserum (HS)
		0,2%	Rinderserumalbumin (BSA)
		0,5%	triton-x Stammlösung (10%)
			0.2 g BSA in 85 ml 0.1M PBS lösen, ad 10 ml HS und 5 ml Triton-x Stammlösung

Carrier-Solution (CS)	(100 ml)	1%	Pferdeserum (HS)
		0,2%	Rinderserumalbumin (BSA)
		0,5%	triton-x Stammlösung (10%)
			0.2g BSA in 94ml 0.1M PBS lösen, ad 1ml HS und 5ml Triton-x Stammlösung
Lösung A	0,2 M	31,2 g ad 1 l	Natriumdihydrogenphosphat H ₂ Odd; pH 7,4
Lösung B	0,2 M	35,6 g Ad 1 l	Dinatriumhydrogenphosphat H ₂ Odd; pH 7,4
Histoblock Lösung.		10% 0,5% 0,1% Ad 89,4 ml	Pferdeserum (hitzeinaktiviert) Tween Rinderserumalbumin (BSA) PBS, pH 7,4
Mowiol		6 g 2,4 g 6 ml 12 ml	Gylzerol Mowiol 4-88 H ₂ Odd 0,2 M TRIS Puffer pH 8

RIPA Puffer		2,38 g	HEPES
		4,38 g	NaCl
		0,93 g	EDTA
		ad 450 ml	H ₂ O
			pH auf 7,4 einstellen
		2,5 g	Natriumdesoxycholat
		0,5 g	SDS
	5 ml	Triton X-100	
	Ad 500 ml	H ₂ O	
		auflösen bei 60° C	
NaCl-Lösung, isotonisch	0,9% (w/v)	4,5 g	NaCl
		ad 500 ml	H ₂ O; pH 7,4; 1h autoklavieren
PCR 10x Reaktionspuffer	500 mM		KCl,
	100 mM		Tris-HCl (pH 9,0 bei 25° C)
	1%		Triton® X-100
Phosphat-gepufferte Salzlösung (BPS)	137 mM	0,8 g	NaCl
	2,7 mM	0,2 g	KCl
	8,1 mM	1,44 g	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O
Immunoblot- Blockierungslösung	5% (w/v)	2,5 g	Magermilchpulver (Sucofin)
		ad 50 ml	Waschblotpuffer, frisch

2.1.5 Enzyme

Produkt	Herkunft
Taq-Polymerase aus Laborbestand	Überstand aus induzierter <i>E. coli</i> Kultur
Luna [®] Universal Probe One Step Reaction Mix	New England BioLabs, Ipswich, USA
Luna [®] WarmStart [®] RT Enzyme Mix	New England BioLabs, Ipswich, USA
Prime Time Std qPCR Assay Actin	New England BioLabs, Ipswich, USA
Prime Time Std qPCR Assay Lphn1/2/3	New England BioLabs, Ipswich, USA

2.1.6 Oligonukleotid-Startermoleküle aus 2.2.2 und 3.1

Oligo1: MX14656 AGTCGCTCGTGACGACCATAGAGGATAG

Oligo2: MX14658 GGAGATGCATGTCAAATGTAGGTA ACTG

Hersteller: *Integrated DNA Technologies*

2.1.7 Software

Microsoft Excel Version: 18.2004.1162.0 Microsoft Corporation, Redmond, USA

Adobe Photoshop & Lightroom 2020 San José, Kalifornien, USA

ZEISS ZEN 3.4 (blue edition) ZEISS Group, München

2.1.8 Antikörper

Bezeichnung	Verwendung (Verdünnung)	Referenz
Primäre AK		
FluoTag®-X4 anti-GFP	1:1000 / 1:2000	NanoTag Biotechnologies
Chicken anti-GFP	1:2000	Novusbio
Rabbit anti-GFP A-11122	1:1000	Thermofisher Scientific
Sekundäre AK		
Donkey anti-chicken Cy3	1:1500 / 1:750	Jackson Immunoresearch
Donkey anti-rabbit Cy3	1:1000 / 1:500	Merck Millipore
Biotinylated HRP, ABC Elite	40 µl / Well	Vector Labs

2.1.9 Mausstämme und Mäuse

Lphn2: B6;129S6-Adgrl2^{tm1Sud}/J

Symbol: Adgrl2^{tm1Sud}
 Name: adhesion G protein-coupled receptor L2; targeted mutation 1, Thomas C Südhof
 MGI ID: MGI:5503962
 Synonyms: Lphn2KI + neo
 Gene: Adgrl2
 Location: Chr3:148521222-148695808 bp, - strand
 Genetic Position: Chr3, 74.1 cM

Siehe hierzu auch 2.2.1 fortfolgend sowie Erläuterungen in 3.1.

Lphn3: B6;129S6-Adgrl3^{tm1Sud}/J

Symbol: Adgrl3^{tm1Sud}
 Name: adhesion G protein-coupled receptor L3; targeted mutation 1, Thomas C Südhof
 MGI ID: MGI:5605017
 Synonyms: Lphn3flox
 Gene: Adgrl3
 Location: Chr5:81167985-81972980 bp, + strand
 Genetic Position: Chr5, 42.62 cM

Die Lphn3flox Maus dient in dieser Arbeit lediglich als Kontrolle, da sie in Bezug auf die hier durchgeführten Experimente einen Zustand eines physiologischen Wildtyps darstellt. Sie besitzt keine Fluoreszenzeigenschaften. Die im Folgenden benannten „Kontrollen“ oder „Wildtypmäuse“ entsprechen Exemplaren dieses Stammes.

2.2 Methoden

2.2.1 Generation von Mäusen mit Lphn2-Mutation

Die Maus ist einer der wichtigsten Modellorganismen zur Untersuchung der vergleichenden Physiologie und Pathogenese im Menschen. Mäuse sind leicht zu züchten, haben eine kurze Generationszeit sowie relativ große Wurfgrößen (www.biologie.uni-muenchen). Das Mausgenom hat eine ähnliche Größe wie das menschliche, und fast jedes menschliche Gen hat einen Gegenpart im Genom der Maus. In der Wissenschaft eingesetzte Labormäuse stammen allesamt von der Hausmaus (*Mus musculus*) ab. Beschreibungen über erprobte Verfahren zur Identifikation von Lphn2, insbesondere in-vivo getestete Methoden waren rar. Dies führte zu erheblichen Schwierigkeiten bei der Etablierung von Antikörpern, welche zuverlässig sowohl die Spezifität als auch die Sensitivität für den Nachweis der zu untersuchenden Lphn-Proteine besitzen.

Um das Problem der passenden Antikörper zu umgehen, wurde eine transgene Maus geschaffen, welche dann durch einen erweiterten Genabschnitt ein „Protein im Zielprotein“ hat, wofür bereits Antikörper existieren. Dies ist hier für mVenus der Fall.

Bei den Lphn2-Knockin-Mäusen (c2k, KI sind Laborinterne Abkürzungen) handelt es sich um eine genetisch modifizierte Mauslinie (wie im Material und Methodenteil von Anderson et al., 2017) bei der der Lphn2-Genabschnitt um eine kodierende yellow fluorescent protein (YFP) Region erweitert wurde. Genauer gesagt handelt es sich um mVenus (erstmalig beschrieben in Nagai et al. 2002), eine verbesserte Form von avGFP (*Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein) erstmalig publiziert in Prasher et al., 1992 mit optimierten Fluoreszenzeigenschaften, welches sich intrazellulär am C-terminalen Ende des Rezeptors befindet (siehe hierzu 3.3 Abbildung 21). Aufgrund der veränderten Maus DNS ergeben sich in der PCR-Untersuchung für die neue Größe der Genabschnitte folgende Werte zur Alleldiskriminierung: Lphn2 WT (266 bp), Lphn2 KI (333 bp).

Die in dieser Arbeit verwendeten tierischen Gewebe wurden von Dr. Stephan Maxeiner zur Verfügung gestellt und entsprechen Proben der in 2.1.9 aufgeführten Stämme.

2.2.2 Genotypisierung von Mäusen anhand PCR

Genotypisierung ist eine molekulargenetische Untersuchung zum Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit von spezifischen DNS-Sequenzen im Genom eines bestimmten Organismus. Die Genotypisierung zeigt die Allele, die ein Individuum von seinen Eltern geerbt hat. In dieser Arbeit dient es explizit der Klassifikation der Proben bezüglich ihrer genetischen Herkunft (Wildtyp- oder genetisch veränderter Mausstamm). Da Gene den Phänotyp eines Organismus beeinflussen können ist es wichtig, die verantwortlichen Gensequenzen zu kennen, um ihre Funktion und die Auswirkung der Änderung (auf den Phänotyp) zu verstehen. Um einen bestimmten Abschnitt des Genoms zu amplifizieren, muss zumindest einen Teil der Ziel-DNS-Sequenz bekannt sein, um einen geeigneten Primer zu entwerfen. Im Verlauf der Genotypisierung kommen verschiedene Methoden zum Einsatz. Zu den verwendeten Verfahren gehört die Polymerase-Kettenreaktion. Ihr geht die DNS-Isolierung voraus.

2.2.3 Gewebebiopsien / Isolierung genomischer DNS

Hierfür werden Ohrstanzen der Tiere mit einer hierfür vorgesehenen atraumatischen Stanzzange entnommen. Das Gewebe (Ohrknorpel) wird in ein Reaktionsgefäß mit Proteinase K (20 mg/ml) und Lysepuffer gegeben und über Nacht bei 56° C im Wasserbad inkubiert. Hierbei kommt es zur enzymatischen Aufspaltung der Zellen. Das Enzym greift die Peptidbindungen der Proteine an und wird daher für den Abbau von Proteinen in Zelllysaten und zur Freisetzung von Nukleinsäuren verwendet. Daraufgehend werden die Reaktionsgefäße 5 min bei 13000 RPM zentrifugiert, um Zelltrümmer wie beispielsweise Haare und andere unlysierte Bestandteile zu pelletieren. Die im Überstand gelöste DNS wird durch Dekantieren in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Hierzu werden 400 µl Isopropanol hinzugegeben, um die DNS an der Phasengrenze zu präzipitieren. Nun wird die gewonnene DNS mittels Kühlzentrifuge bei 13000 RPM und 4° C sedimentiert, der Überstand wird verworfen. Durch Zugabe von 400 µl 70% Ethanol werden Salze herausgewaschen und die Probe anschließend wieder mit 13000 RPM für 10 min sedimentiert. Der Überstand wird nun verworfen und das am Boden des Reaktionsgefäßes verbliebene DNS-Pellet 30 min. an der Luft getrocknet. Danach werden 50 µl H₂O (DNase und RNase freies Wasser) zugegeben, in denen sich das DNS Pellet wieder löst. Zur Inaktivierung möglicher vorhandener DNasen wird die Probe zuletzt bei 65° C im Hitzeblock für ca. 10 Minuten inkubiert.

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.

Von den zuvor aufgereinigten DNS-Proben werden in einem standardisierten Verfahren je 1 µl Probe mit 24 µl Mastermix bestehend aus: Nuklease freiem Wasser, PCR-Puffer, MgCl₂, Rinderserumalbumin, Betaine, Dimethylsulfoxid, Desoxyribonukleosidtriphosphate, Oligonukleotid-Startermoleküle (Primer), Taq-DNS Polymerase vermischt und im Thermocycler (BioRad T100) mit Programmstufe Basic59 / 95-59-72 Minuten inkubiert. Innerhalb dieser Zeitintervalle erfolgen die für die Polymerasekettenreaktion charakteristischen Abläufe wie im Folgenden beschrieben. Der PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten: Denaturierung, Annealing und DNS-Synthese.

1. Denaturierung: Der PCR-Zyklus wird durch Erhitzen des Reaktionsgemisches auf eine hohe Temperatur gestartet. Dabei wird die DNS-Doppelhelix in zwei Stränge aufgetrennt. Dieser "Schmelz"-Prozess findet normalerweise bei Temperaturen zwischen 90° C - 100° C statt.
2. Annealing (Primerhybridisierung): Das Reaktionsgemisch wird schnell abgekühlt, normalerweise auf 50° C - 65° C, wodurch die beiden Primer an ihre komplementären Sequenzen auf den Template-DNS-Strängen binden können.
3. DNS-Synthese (Primer-Verlängerung): Das Reaktionsgemisch wird erneut erhitzt, diesmal auf eine Temperatur von 72° C, die es der DNS-Polymerase erlaubt, die Primer durch Zugabe von dNTPs, die sich mit den Basen im Template-Strang paaren, zu verlängern. Eine typische PCR beinhaltet 20 - 40 wiederholte Zyklen dieser drei Schritte. Da sich die Anzahl der DNS-Moleküle in jedem Zyklus verdoppelt, wird die DNS exponentiell vervielfältigt. Da die PCR eine hochempfindliche Nachweismethode ist, ist sie auch anfällig für Kontaminationen. Selbst Spuren kontaminierender DNS können zu falschen Ergebnissen führen weshalb hier immer mit Handschuhen, Schutzkittel, Filterspitzen und äußerster Sorgfalt gearbeitet wird.

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

In der Agarose Gelelektrophorese werden DNS-Fragmente in einem elektrischen Feld anhand ihrer Molekülmasse aufgetrennt, und können anschließend mittels fluoreszierenden Farbstoffes sichtbar gemacht werden. Agarose ist ein Polysaccharid. Es wird geschmolzen, wobei die unverzweigten Ketten Helices ausbilden und ein Netzwerk entsteht. Beim Erkalten entsteht dadurch ein festes Gel mit Poren. Je höher die Agarose konzentriert ist, desto kleiner sind die Poren. Die Konzentration des Gels muss zunächst der zu untersuchenden DNS angepasst werden. Um eine optimale Auflösung im Bereich von 300 - 400 Basenpaaren zu erreichen, wurden 1-prozentige Gele (2 g Agarose, auf 200 ml TAE-Puffer) die mit 10 µl Midori-Green (Nippon Genetics Europe, Düren) versetzt wurden, gegossen. Anschließend wurden ca. 20 µl jeder Probe zusammen mit je 5 µl Orange G in jeweils eine der Geltaschen pipettiert. Zwei weitere Geltaschen werden mit 5 µl DNS-Leiter (in dieser Arbeit 100 Basenpaar-DNS-Leiter) sowie einer Negativkontrolle beladen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung werden die DNS-Fragmente in einem UV-Detektionssystem (Chemi Doc XRS+ System) mittels UV-Licht im 490 nm Wellenlängenbereich exponiert und mithilfe der darauffolgenden Midori-Green-Emissionen (Midori-Green bindet an das Rückrat der DNS) im 530 nm Bereich detektiert.

2.2.5 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 Homogenisators, in dem das mit TRIzol[®]-Reagenz versetzte Gewebe (1 ml TRIzol[®]-Reagenz pro 100 mg Gewebe) homogenisiert wird. Hierbei zerkleinert ein rotierendes Messer die Proben, es kommt zum Zellaufschluss und zur Erzeugung eines homogenen Gemisches. Trizol enthält Guanidiniumthiocyanat, welches die Zellen zusätzlich lysiert und gleichzeitig RNasen und andere Enzyme inaktiviert. Zusätzlich enthält das Reagenz Phenol (Hydroxybenzol veraltet auch Karbolsäure), in dem sich die RNS löst. Nach jedem Schritt sollte der Homogenisator in RNase freiem Wasser gereinigt werden, um das Überführen von Verunreinigungen zu vermeiden.

Anschließend wird das Homogenisat mit 1300 RPM zentrifugiert und der RNS-haltige klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Alle folgenden Schritte der RNS-Isolierung wurden in dieser Arbeit mithilfe des Direct-zol[®]RNA Mini Prep Plus (ZYMO RESEARCH, Freiburg) durchgeführt, wobei die RNS an einer Säulenmatrix beim Zentrifugieren aufgereinigt wird. Danach können die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei -70° C gelagert werden.

2.2.6 Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)

Als Real-Time PCR oder quantitative PCR (qPCR) bezeichnet man Methoden, welche dem Nachweis und der Quantifizierung von Nukleinsäuren (DNS oder RNS) dienen. Um eine quantitative Aussage bezüglich der RNS-Transkriptmengen treffen zu können, muss die RNS (Boten-RNS; engl.: Messenger RNS) mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in komplementäre DNS umgeschrieben, amplifiziert und anschließend detektiert werden.

Grundlegend unterscheidet man zwischen zwei qPCR-Ansätzen:

Zum einen gibt es Verfahren, welche auf dem Einbau von Fluoreszenz-Farbstoffen in doppelsträngige DNS beruhen. Hierbei spricht man von farbstoffbasierter qPCR oder Dye-based.

Bei farbstoffbasierten Real-Time PCR Methoden findet eine Echtzeitmessung der Fluoreszenz eines Farbstoffs statt, welcher spezifisch an doppelsträngige DNS (dsDNS) bindet (z.B. SYBR[®] Green). Der Farbstoff selbst hat eine schwache Hintergrundfluoreszenz, welche bei der Bindung an dsDNS dramatisch zunimmt. Die Amplifikation der Zielsequenz führt somit zu einem Anstieg der Fluoreszenz, die direkt proportional zur Menge der bei jedem PCR-Zyklus vorhandenen dsDNS ist. Dieses Prinzip der Real-Time PCR erfordert nur zwei sequenz-spezifische Primer. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, in einer sogenannten Multiplexed qPCR mehrere PCR-Assays zu kombinieren. Die Ziele werden gleichzeitig, aber unabhängig unter Verwendung von Reportern mit unterschiedlichen Spektren nachgewiesen. So kann Probenmaterial gespart und Well zu Well Schwankungen vermieden werden. Die farbstoffbasierte Real-Time PCR ist somit ein schneller und kostengünstiger Weg, um eine größere Anzahl von Proben zu untersuchen.

Ein Nachteil dieser farbstoffbasierten Ansätze ist, dass sie jegliche dsDNS nachweisen, die sich in der Probe befindet. Dazu gehören auch unspezifische Produkte oder Primer-Dimere, wodurch es zu einer ungenauen Quantifizierung kommen kann. Regelhaft wird daher nach jedem qPCR-Experiment eine Denaturierungs-/ Schmelz-Kurve erstellt, um die Reaktionsspezifität zu überprüfen. So kann sichergestellt werden, dass nur das gewünschte Ziel amplifiziert wurde.

Darüber hinaus kann im Gegensatz zur sondenbasierten Real-Time PCR, welche Multiplexing erlaubt, in einem farbstoffbasierten qPCR-Experiment jeweils nur eine Zielsequenz quantifiziert werden.

Zum anderen existieren verschiedene Methoden, bei denen Fluoreszenz-markierte DNS-Sonden zum Einsatz kommen. Folglich spricht man dabei von sondenbasierter qPCR oder Probe-based.

Bei der sondenbasierten Real-Time PCR wird ebenfalls in Echtzeit die Fluoreszenz einer sequenzspezifischen Sonde gemessen, welche mit einem Fluorophor markiert ist. Für diagnostische Anwendungen wird bevorzugt die sondenbasierte qPCR genutzt da sie gegenüber der farbstoffbasierten spezifischer ist. Die sondenbasierte Real-Time PCR ermöglicht die Quantifizierung mehrerer Targets in einer einzigen Reaktion (Multiplexing). Hierzu wird ein spezifischer Fluorophor für jedes Target verwendet. Die Sondendesigns können variieren, am gebräuchlichsten sind sog. Hydrolysesonden (z.B. TaqMan®). Diese beinhalten einen 5'-Reporter Fluorophor und einen 3'-Quencher auf einem kurzen Oligonukleotid, das komplementär zur Zielsequenz ist. Der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) zwischen Reporter und Quencher verhindert die Emission des Fluorophors, solange die Oligosonde intakt ist (geringe Fluoreszenz). Während jedes PCR-Zyklus hydrolysiert die 5'-Flap-Endonuklease Domäne der verwendeten Taq DNS-Polymerase die Sonde, während der Primer verlängert und die Zielsequenz amplifiziert wird. Dadurch wird der Reporter Fluorophor vom Quencher räumlich getrennt, was dann zu einer amplifikationsabhängigen Erhöhung der Fluoreszenz führt. (<https://www.neb-online.de/pcr-dna-amplifikation/qpcr-real-time-pcr-und-rt-qpcr/> zuletzt abgerufen am 01.12.2022)

Nach der reversen Transkription gliedert sich die PCR der DNS-Matrize wie Kapitel 2.2.3 beschrieben in drei sich mehrfach wiederholenden Phasen.

In dieser Arbeit wurden zur qRT-PCR Enzymmixturen von New England BioLabs, Primer und DNS-Sonden von Integrated DNA Technologies verwendet. Hierdurch war es möglich reverse-Transkription und PCR mit einem Reaktionsansatz (One-Step-Workflow) durchzuführen. Pro 1 µl RNS-Probe wurden folgende Reaktionspartner pipettiert:

Tabelle: RT-PCR Reaktionsansatz

Reaktionspartner	Menge
Nuklease freies Wasser	6 µl
Luna [®] Universal Probe One Step Reaction Mix	10 µl
Luna [®] WarmStart [®] RT Enzyme Mix	1 µl
Prime Time Std qPCR Assay Actin	1 µl
Prime Time Std qPCR Assay Lphn1/2	1 µl

Die Amplifikation der komplementären DNS erfolgt in einem Thermocycler (CFX-Connect Real-Time System). Denaturierung bei 95° C für 1 min und dann für je 10 Sekunden pro Zyklus, Anheftung der Oligonukleotid-Startermoleküle und Elongation der Oligonukleotide mittels *Taq*-DNS-Polymerase bei 60° C für je 30 Sekunden. 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 durch eine Gelelektrophorese erübrigt.

2.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese erlaubt die Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülmasse. Um eine hochauflösende Separation der Proteine zu erreichen, muss die Sekundär- und Tertiärstruktur der nativen Proteine aufgefaltet werden. Zu diesem Zweck wird den Proben ein sogenannter SDS-Probenpuffer hinzugefügt. Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate oder SDS) ist ein anionisches Tensid welches als negativ geladenes Detergens durch seinen fetthaltigen Anteil an lipophile Bereiche des Proteins bindet. SDS als anionisches Tensid überdeckt die Eigenladung der Proteine und unterbricht ihre nichtkovalenten Bindungen. Dadurch werden die Proteine aufgefaltet und deren Gesamtladung negativ. SDS bindet in einem stabilen Verhältnis (Pro Gramm Protein binden konstant ungefähr 1,4 Gramm SDS) an die Aminosäure-Kette, so dass die Ladung des Moleküls proportional zur Masse ist. Die negative Gesamtladung ermöglicht ein gleichmäßiges Wanderungsverhalten aller Proteine in Richtung der Anode. Außerdem wird dem SDS-Probenpuffer zwecks zusätzlicher Denaturierung β -Mercaptoethanol, ein reduzierender, Disulfidbrücken spaltender Stoff hinzugefügt. Zusätzlich wird der Farbstoff

Bromphenolblau als Lauffrontmarker zugesetzt. Als Grundlage der Auftrennung dient neben der Elektrophorese ein Gel mit spezifischer Porengröße aus polymerisiertem Acrylamid (Laufmedium). Entsprechend der Molekülmasse der zu untersuchenden Proteine kann das Gel unterschiedlich konzentriert werden, um ein optimales Abbild nach elektrophoretischer Auftrennung zu erreichen. Das Gel besteht aus einem Trenngel, über das eine dünne Schicht Sammelgel pipettiert wird. Das Trenngel wird mit 100% Ethanol überschichtet, um eine Glättung der Gelgrenze zu erreichen. In dieser Arbeit wurden zehnp-prozentige Gele gegossen um eine optimale Auflösbarkeit im Bereich von 100-150 Aminosäuren zu erreichen.

Tabelle: Pipettierschema zur Herstellung von Polyacrylamid-Gelen

Komponente	Trenngel	Sammelgel
H ₂ O	12,3 ml	6.15 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	7,5 ml	
0,5 M Tris, pH 6,8		2,5 ml
Natriumdodecylsulfat 10% (w/v)	300 µl	100 µl
30% / 0,8% (w/v) Acrylamid / Bisacrylamid	9,9 ml	1,34 ml
Ammoniumpersulfat 10% (w/v)	150 µl	50 µl
TEMED	20 µl	10 µl

Nachdem die Gele gegossen und die Proben mit dem Probenpuffer versetzt worden sind, erfolgt die gelelektrophoretische Auftrennung. Hierzu wird ein Probenleiter und die Proben 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. Mithilfe des Probenleiters und des Lauffrontmarkers, welcher als gelbe Bande im Gel zu sehen ist, gelingt die Abschätzung der optimalen Laufzeit. Sind die Proben ausreichend aufgetrennt, kann die Gelelektrophorese gestoppt werden.

2.2.7.1 Visualisierung der aufgetrennten Proteine im Gel

Die Proteine, welche sich nun aufgetrennt in dem Gel befinden, werden mit Hilfe der Coomassie-Silberfärbung sichtbar gemacht und anhand des Probenleiters verglichen. 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, München) auf einem Kippschüttler für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.7.2 Transfer der Proteine auf Nitrocellulosemembran

Beim "Blotting" wird ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt (Elektrotransfer), wodurch die mit SDS-beladenen und negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode wandern. Der Transfer auf eine Nitrocellulosemembran erfolgt in SDS-Transferpuffer. Dazu werden die Gele mit der Nitrocellulosemembran und beidseitig mit Transferpufferbenässten Filterpapieren in die Elektrophoresekammer eingespannt. Bei einer Blotmembran von 10 cm × 10 cm Größe werden im Elektrophorese-Netzteil 250 mA eingestellt und für 2 Stunden belassen.

2.2.7.3 Visualisierung spezifischer Proteine auf der Nitrocellulosemembran

Zur Analyse der aufgetrennten Proteine müssen diese mittels spezifischer Antikörper markiert und anschließend visualisiert werden. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wird die Nitrocellulosemembran für ca. 60 min auf einem oszillierenden Schüttler in der Blockierungslösung gehalten und anschließend mit TBST-Puffer für ca. 10 min gewaschen. Danach erfolgt die Inkubation der Nitrocellulosemembran mit dem primären AK bei 4° C über Nacht in einem abgedunkelten Raum. Eine praktikable Methode ist das Einschweißen der Membran in Blockierlösung mit dem primären Antikörper in Klarsichtfolie. Am Folgetag kann nach dreimaliger Waschung in TBST-Puffer für jeweils ca. 10 min auf einem oszillierenden Schüttler, die ca. 1,5-stündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgen. Nachdem die Antikörpermarkierung abgeschlossen ist, werden die Proteine auf der Nitrocellulosemembran mit der Chemilumineszenzlösung beträufelt. Anders als bei der Fluoreszenz wird der angeregte Zustand bei der Chemilumineszenz durch eine chemische Reaktion erreicht. Die durch Oxidation von Luminol mit Horseradish-Peroxidase (Übergang des Elektrons aus dem höher angeregten Singulettzustand in den Singulettgrundzustand S₀) wird ein Photon im blauen Bereich des Lichtspektrums emittiert. Diese Photonen können anschließend mit Hilfe eines

Detektionssystem (hier ChemiDoc XRS+ Imaging System) aufgezeichnet werden. Nach Ablauf der Reaktion stellen sich die antikörpermarkierten Proteine als "Banden" da und können mit dem Probenleiter verglichen werden.

2.2.8 Fixierung und Organentnahme

Es erfolgt ein stressfreies Umsetzen der Maus aus dem Käfig in einen Exsikkator, welcher am Boden ein Isofluran getränktes Wattepad enthält. Direkter Kontakt der Maus mit Isofluran sollte vermieden werden, um mögliche Hautirritationen zu vermeiden. Die Maus wird dem Isofluran solange ausgesetzt, bis Atemstillstand/Lähmung einsetzen und zum Tod führen. Schutzreflexe werden durch Kneifen der Zehen auf Abwesenheit kontrolliert und die Maus ggf. verlängert im Exsikkator gehalten, bis die Totenstarre eintritt.

Das tote Tier wird auf einer Styroporunterlage auf dem Rücken fixiert und das Fell mit 70% Ethanol benetzt. Hierdurch werden Kleberückstände von Haaren auf den Instrumenten vermieden. Die Haut wird entfernt und der Brustkorb vom Processus xiphoideus bis zur Clavicula eröffnet. Es werden 1500 IE Heparin (\cong 300 μ l) in den linken Ventrikel injiziert, um Koagulationsprozesse weitgehend zu unterbinden. Nach Einschneiden des rechten Atriums kann mit der Injektion von in 10 ml PBS in den linken Ventrikel begonnen werden. Hierdurch kommt es zum Ausspülen des Blutes aus dem Körperkreislauf. Nachdem PBS klar aus dem rechten Ventrikel austritt, erfolgt eine Injektion von 50 ml 4% PFA-Lösung (Paraformaldehyd) auf gleiche Weise bis zum vollständigen Erstarren der Muskulatur. Im Anschluss wird das Abdomen und die Schädelkalotte eröffnet, um die Organe zu entnehmen (Gehirn, Leber, Niere).

Nach Entnahme werden die Gewebe direkt in 4% PFA zur Nachfixierung für 2 Tage inkubiert. Danach erfolgt die Überführung in eine 30% Saccharoselösung (in PBS gelöst) zur Kryoprotektion für weiter 2 Tage oder bis die Gewebe auf den Boden des Gefäßes abgesunken sind.

Die Gewebe werden in 50 ml Falcons bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt und können zu gegebener Zeit in Tissue-Tek eingebettet, direkt geschnitten oder eingefroren werden. Die Immunoblotanalyse erfolgt allerdings mit Geweben, die unfixiert entnommen wurden.

2.2.9 Gewebeschnitte am Kryostaten

Um mikroanatomische Strukturen innerhalb eines Gewebes zu untersuchen, müssen die Proben zu mikrometerdünnen Gewebsschnitten verarbeitet und anschließend angefärbt werden. Zur Anfertigung der Gewebeschnitte am Kryostaten müssen zuerst die Gewebe in Kunststoffformen als kleine Blöcke in Tissue-Tec eingebettet werden. Die Formen mit Gewebe werden für wenige Sekunden, in von flüssigem Stickstoff (-196° C) umspülten 2-Methylbutan (Isopentan) gehalten und schockgefroren. Die Zwischenlagerung erfolgt bei -80° C. Direkt vor dem Schneiden werden die Gewebe auf einen Halter mit Tissue-Tec (O.C.T Compound, Sakura® Fine Tek, USA) fixiert und auf Umgebungstemperatur des Kryostaten i.d.R. -21° C akklimatisiert. Durch vorsichtiges Abtragen der obersten Schichten wird sich bis zum gewünschten Bereich des Organs vorgearbeitet.

Es werden - je nach Protokoll – Schnitten zu je 10 µm, 50 µm oder 100 µm angefertigt. Die Schnitte werden auf Objektträger aufgebracht und bei Raumtemperatur 1 h getrocknet. Falls die Schnitte nicht sofort weiterverarbeitet werden, erfolgt die weitere Lagerung der Objektträger in Präparatkästen bei -20° C.

2.2.10 Autofluoreszenzblockierung mit Sudan Black B (Sudanschwarz, SBB)

Leber und Nieren der Mausstämme Lphn2-mVenus und Wildtypkontrollen werden in TissueTec® en Bloc eingebettet, bei -20° C in einem Kryostat-Mikrotom (Leica) geschnitten (Schnittdicke 10 µm) und auf geeignete Objektträger aufgebracht. Anschließend werden die Objektträger mit den Gewebeschnitten 60 Minuten bei Raumtemperatur zum Trockenen ausgelegt.

Die einzelnen Schnitte werden mit einem Fettstift umfahren, um später Flüssigkeiten als Domüberstand zu halten. Um Verdunstung zu vermeiden, erfolgt die Inkubation in einer Feuchtkammer. Um unspezifische Bindungsstellen auf dem Objektträger abzusättigen, werden die Schnitte in einer Blockierlösung für 1 h inkubiert. Im Anschluss werden die Schnitte 3 x 10 min in PBS gewaschen. Danach erfolgt die Inkubation mit dem GFP Nanobody in einem Verhältnis 1:2000 (FluoTag® X4 anti-GFP, NanoTag) im Dunkeln, über Nacht. Am nächsten Tag werden die Schnitte 3 x 10 min in PBS gewaschen und eine Kernfärbung mit DAPI für 10 min. durchgeführt. Im Anschluss erfolgt die Inaktivierung der Endogenen Autofluoreszenz durch Behandlung mit unterschiedlichen SBB (Sudan schwarz B) Verdünnungen (0,1% - 0,5% gelöst in 70% Ethanol) (Sun et al. 2011). Die Verdünnungsreihen werden für 25 min auf dem Objektträger belassen, danach werden sie 3 x 10 min in PBS gewaschen und schließlich unter einem Deckglas mit Mowiol versiegelt.

2.2.11 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (ICH) ist eine biochemische Methode, mit der Proteine mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht werden können. Das Verfahren erlaubt Strukturen auch auf subzellulärer Ebene zu lokalisieren. So kann beispielsweise bestimmt werden, in welchem Gewebe ein Protein vorkommt und darüber hinaus, in welchem Kompartiment der Zelle es sich befindet. Seit der Erarbeitung grundlegender methodischer Erkenntnisse Ende der 60er Jahre hat sich die IHC zunehmend als eine in medizinischer Diagnostik sowie fächerübergreifender Forschung intensiv eingesetzte Methode etabliert. Das Prinzip beruht auf der Affinität eines Antikörpers zu einem bestimmten Epitop, worauf eine spezifische Bindung des Antikörpers an das Epitop im Sinne einer Antigen-Antikörper-Reaktion stattfindet. Epitope oder synonym antigene Determinante, sind molekulare (Teil)Strukturen, die *in vivo* eine spezifische Immunantwort auslösen können. Ein spezifischer Antikörper bindet mit seiner Antigen-Bindestelle am N-terminalen Ende (aminoterminal).

Man unterscheidet direkte und indirekte Färbemethoden. Bei der direkten Färbemethode ist der Fc-Teil (carboxyterminal) im Sinne eines Immunkonjugats kovalent mit einem 2. funktionalen Molekül wie z. B. einem Enzym oder einem Fluorophor verbunden. Nach Bindung an sein spezifisches Epitop wird dem gekoppelten Enzym in einem weiteren Schritt ein Substrat angeboten, welches unter Bildung eines Farbstoffs mit dem Enzym reagiert. Somit werden die Stellen, an die der AK gebunden hat, oft schon für das bloße Auge oder im Lichtmikroskop sichtbar. Bei fluorophor-markierten Antikörpern erfolgt die Detektion direkt im Fluoreszenzmikroskop.

Bei der indirekten Methode (indirekte Immunfluoreszenz) wird nach Bindung des ersten Antikörpers (wie beschrieben) ein sekundärer Antikörper zugegeben, der sich gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers richtet und beispielsweise enzymgekoppelt ist. Die indirekte Methode erzeugt eine Signalverstärkung, da unter anderem mehrere sekundäre Antikörper einen primären Antikörper binden können und vermehrt Fluorochrome oder Enzyme angesammelt werden. Allerdings kommt es bei der indirekten Methode auch zu mehr Hintergrund als bei der direkten Methode, da der sekundäre Antikörper auch potenziell unspezifisch an Gewebe binden kann. Siehe auch Kapitel 1.4 und Abbildung 11. Bei enzymgekoppelten Methoden wird die gewünschte Farbreaktion durch Zugabe von Substrat ausgelöst.

2.2.12 (Strept-)Avidin-Biotin-Methoden

Biotin, auch als Vitamin B7 oder Vitamin H bezeichnet, gehört zu den wasserlöslichen Vitaminen aus dem B-Komplex. Streptavidin ist ein Protein, welches von Bakterien der Spezies *Streptomyces avidinii* produziert wird und aus vier identischen Protein-Untereinheiten aufgebaut ist. Biotin und Avidin haben eine sehr hohe Affinität zueinander. Diese Eigenschaft wird in verschiedenen immunhistochemischen (auch Immunhistologie genannten) Methoden genutzt.

Bei all diesen Methoden wird ein Biotin konjugierter sekundärer Antikörper eingesetzt. An das Biotin des Antikörpers kann dann Avidin oder auch Streptavidin binden. Die Visualisierung kann durch verschiedene Verfahren geschehen. Zum Beispiel kann ein Fluorophor an das Avidin/Streptavidin gebunden sein, was im Gegensatz zu einem direkt an den sekundären Antikörper gebundenen Fluorophor, zu einer Signalverstärkung führt. Das Avidin kann aber auch bereits mit einem Enzym verbunden sein, welches dann später ein Farbsubstrat umsetzt. Alternativ zu einem Fluorophor oder einem einzelnen Enzym kann aber auch ein Komplex aus Avidin, Biotin und Enzym an das Avidin gekoppelt sein. Diese Kombination von Avidin und Biotin mit einem Enzym nennt man den ABC-Komplex. Das gebundene Enzym kann auch hier wiederum Farbstoff umsetzen. Die ABC-Methode bietet im Gegensatz zu den anderen Methoden eine starke Signalverstärkung, da der große Komplex mehr Enzympartikel tragen kann.

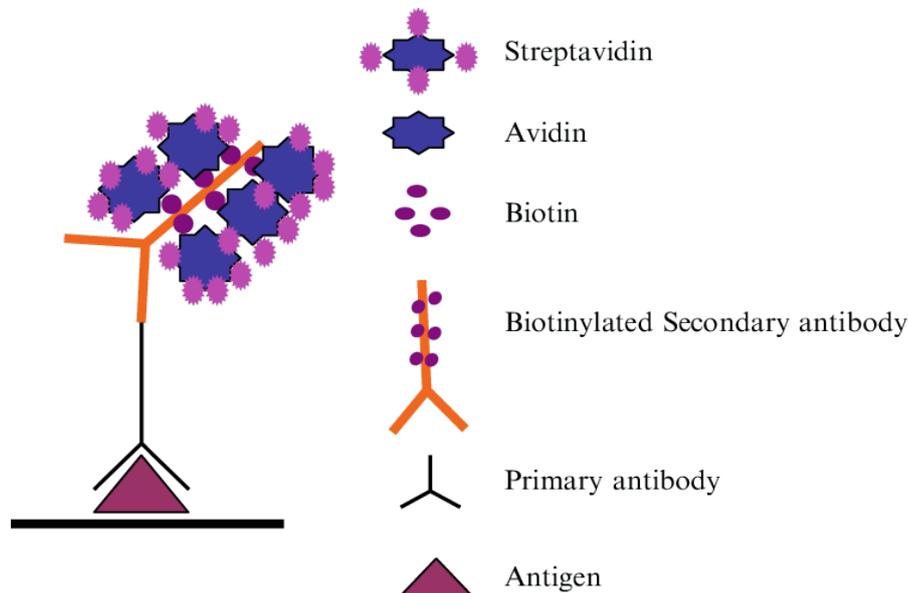


Abbildung 17: ABC-(Avidin-Biotin-Komplex-) Methode: Aus einem biotinylierten Enzym z.B. Meerrettich-Peroxidase und Streptavidin werden große dreidimensionale Komplexe gebildet, welche über freie Bindungsstellen des Streptavidin an Biotin-Gruppen des Sekundärantikörpers binden können. Quelle: Immunohistochemical and Immunofluorescence Procedures for Protein Analysis - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/figure/Avidin-biotin-complex-method_fig3_51620447 [accessed 13 Dec, 2022]

In der vorliegenden Arbeit wurde VECTASTAIN® Elite® ABC Kit Peroxidase (HRP) von Vector Labs, USA genutzt.

Protokoll:

1. Einlegen der OT (Lphn 2 positive und Kontrollen) in Trog + PBS (Phosphatpufferlösung).
2. Herstellen der BS (Blocking Solution) wie in 2.1.4. und überführen der Schnitten zur Blockierung unspezifischer Proteinbindestellen. Inkubation für 30 Minuten.
3. Herstellen der Peroxidlösung zur Inaktivierung endogener Peroxidasen.
5ml Methanol + 45 ml PBS + 400 µl H₂O₂
4. Überführen der Schnitte in Trog mit Peroxidlösung, Blasenbildung durch Peroxid beachten!
Ausreichend lange Verweildauer ggf. auf Schüttler.
5. Mehrfaches Überführen der Schnitte in Trog mit frischer Peroxidlösung bis keine Blasen mehr entstehen.
6. Waschen der OT in PBS für 5 Minuten.
7. Überführen der OT in Trog mit primärer Antikörperlösung. Inkubation für 30 Minuten.
8. Waschen der OT in PBS für 5 Minuten.
9. Überführen der OT in Trog mit biotinyliertem sekundärem Antikörper. Inkubation für 30 Minuten.
10. Waschen der OT in PBS für 5 Minuten.
11. Überführen der OT in Trog mit VECTASTAIN Elite ABC Reagenz. Inkubation für 120 Minuten.
12. Waschen der OT in PBS für 5 Minuten.
13. Herstellen der Peroxidase Substratlösung: NovaRED™ und überführen der OT.
14. Beobachten der Farbreaktion und Abbruch nach 5 Minuten durch Überführen der OT in PBS. Hierdurch besseren Unterscheidung der gefärbten Areale möglich.

3 Ergebnisse

3.1 PCR-Analyse der Mauslinie

Grundlegend wurde eine genetisch modifizierte Mauslinie zur Detektion der Lphn2 Expression herangezogen. Dem Lphn2 Gen dieser Mäuse wurde eine entsprechende kodierende Sequenz des Markerproteins mVenus hinzugefügt. Hierbei handelt es sich um eine verbesserte Form des YFP (Yellow fluorescent protein) welches in die kodierende Region von Lphn 2 inseriert ist. Es dient als Epitop der modifizierten Lphn2-Proteine, welche dann durch geeignete Antikörper erkannt werden können, wie in Anderson et al., 2017 gezeigt. Um potenzielle Mäuse, welche das modifizierte Gen tragen, aus Verpaarungen zu erkennen und zu isolieren, wurde wie unter 2.2.3 beschrieben eine PCR der DNS aus Gewebeproben durchgeführt. Nachstehend ist das Ergebnis einer solchen Untersuchung Abbildung 18. Die Größe der Genabschnitte entsprechen den Erläuterungen aus 2.2.1. Anhand der Banden gelingt eine Zuordnung beispielsweise für Maus #264: homozygoter Knockin, #265 und #268 heterozygote Ausprägung des 333 bp großen Lphn2 Amplicon (vervielfältigter Teilabschnitt der Rückschlüsse auf das veränderte Gen zulässt). Bei heterozygoter Allelkombination verwischen die Banden untereinander und es kommt zu einer oberen und unteren Fraktion. Die Mäuse #266 und #267 entsprechen einer Wildtypvariante. Solche Individuen mit homozygotem Wildtyp wurden als Kontrollen eingesetzt.

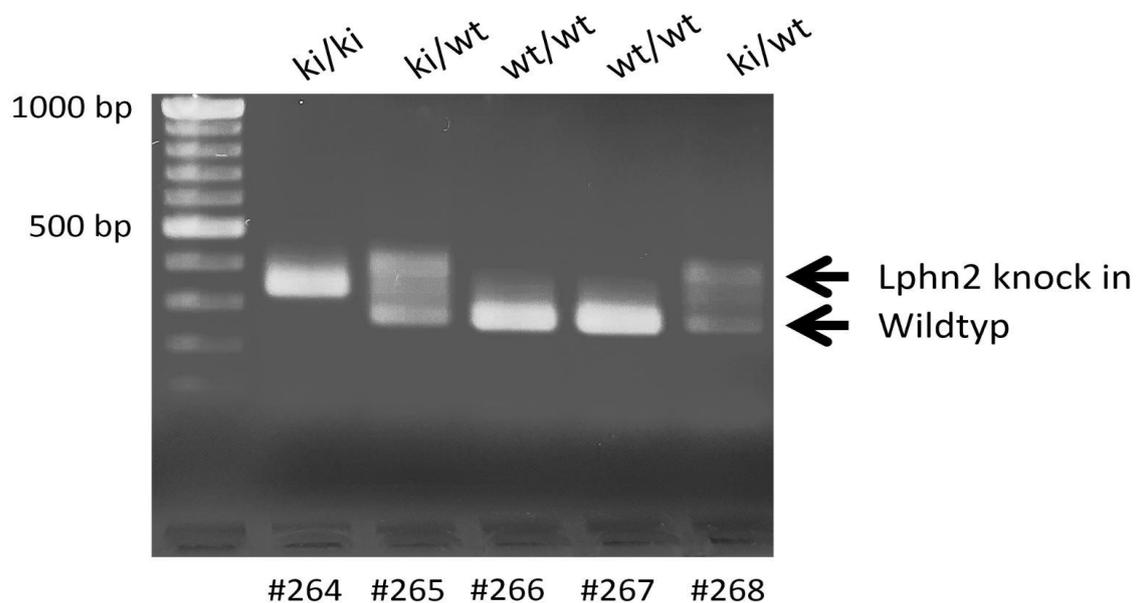


Abbildung 18: Genotypisierung der Reportermause bezüglich des Lphn2 Amplicon. #264: homozygoter Knockin (333 bp), #265 und #268 heterozygot, #266 und #267 Wildtyp (266 bp). Basen-Leiter links.

3.2 Transkriptionsmengen der Lphn1 und Lphn2 Messenger RNS

Basierend auf den Voruntersuchungen vom Simon Zaffalon (Doktorand AG Prof. Krasteva-Christ, Dissertation angenommen) wurde unter anderem die Transkription von Lphn1- und Lphn2 mRNA in Nieren und Lebergeweben untersucht. In diesem initialen Screening fanden sich nur geringe Lphn3-Transkriptmengen in Niere und Leber (<0,5%), daher wurde der Fokus in dieser Arbeit auf Lphn1 und Lphn2 gerichtet.

Es wurde wie in 2.2.6 vorgegangen. Um die Genauigkeit und Aussagekraft der zuvor von Simon Zaffalon erhobenen Daten zu untermauern, wurden wie in der Tabelle Abbildung 20 aufgetragen, nun jeweils 3 Gewebeproben (Triplets) von Niere und Leber aus insgesamt 4 Mäusen untersucht. Beispielsweise enthält Well A01 in der 1. Zeile der 1. Tabelle die Probe von Maus A19 mit Nierengewebe. A02 und A03 in der Zeile darunter enthalten die gleiche Probe. Die Wells A04-A06 enthalten renale Gewebeproben der zweiten aus insgesamt vier Mäusen (B19) wie in der Spalte „Sample“ gezeigt, und so weiter. Aus den Triplets wurden in der Auswertung der beiden rechten Säulen der Mittelwert der Verhältnisse bestimmt und in Abbildung 19 (erneut gemittelt) als Balkendiagramm aufgetragen. Zunächst mRNA-Verhältnis (Transkriptmengen) von Lphn1 Niere zu Leber und daneben mRNA-Verhältnis Lphn2 Niere zu Leber. Zudem wurde die Standardabweichung in Form einer kleinen grauen vertikalen Markierung an der Obergrenze der Balken dargestellt.

Bei der Auswertung der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass die Präsenz einer mRNA nicht zwangsläufig die Herstellung eines bestimmten Proteins bedeutet, auch Konzept der nicht-codierenden RNS (engl. „ncRNA“) genannt. Es existieren RNS-Moleküle, die nicht als Vorlagen für die Proteinsynthese dienen, sondern andere Funktionen im Zellstoffwechsel und der Genregulation erfüllen. Ferner wird die mRNA nach ihrer Translation bis zum fertigen Protein im Rahmen der posttranskriptionellen Modifikation weiterverarbeitet. Unter posttranskriptioneller Modifizierung werden alle Modifikationen der mRNA zusammengefasst, die nach der Transkription erfolgen, teilweise auch währenddessen (kotraskriptionell). Beispiele sind Capping, Polyadenylierung und Spleißen. Beim Spleißen handelt es sich um einen Prozess, bei dem die Introns (nicht kodierende Abschnitte) der prä-mRNA herausgeschnitten und die Exons (kodierende Abschnitte) miteinander verknüpft werden. Introns sind nicht-codierend und werden in der Regel entfernt, bevor die reife mRNA in ein Protein übersetzt wird. Außerdem besteht die Möglichkeit aus der prä-mRNA mittels alternativen Spleißens unterschiedliche mRNAs zu produzieren, die wiederum zur Herstellung unterschiedlicher Proteine weiterverarbeitet werden können.

Es wurde die Lphn1 und Lphn2 Messenger-RNS in Niere und Leber von insgesamt 4 Tieren verglichen. Lphn1-mRNS wird in Niere und Leber unterschiedlich stark transkribiert, das Verhältnis beträgt in Niere vs. Leber nahezu 10:1. Die Expression von Lphn2-mRNS ist in beiden Geweben nahezu gleichstark. Das Verhältnis beträgt bei Niere vs. Leber etwa 1:1, was dem allgemeinen Konsens der Datenlage entspricht (Anderson et al., 2017), (Meza-Aguilar & Boucard, 2014). Ein Vergleich der Transkriptmengen von Lphn1-RNS und Lphn2-RNS unmittelbar nebeneinander ist nicht zulässig, da die Probenassays aufgrund ihrer Sequenzspezifität für das entsprechende Zielgen nicht grundsätzlich vergleichbar sind, da es immer genspezifische Unterschiede gibt, die sich in der relativen Effizienz der PCR-Bedingungen unterscheiden könnten.

Zudem wurde ein gepaarter T-Test für beide Wertegruppen durchgeführt und der resultierende p-Wert angegeben. Der p-Wert gibt an, wie wahrscheinlich es ist, einen derartigen Unterschied zwischen den Mittelwerten allein aufgrund des Zufalls zu beobachten. Ein kleiner p-Wert (typischerweise kleiner als 0,05) deutet darauf hin, dass die Unterschiede zwischen den Mittelwerten wahrscheinlich nicht auf Zufall beruhen und somit statistisch signifikant sind, was einem 95 %-Konfidenzintervall entspricht.

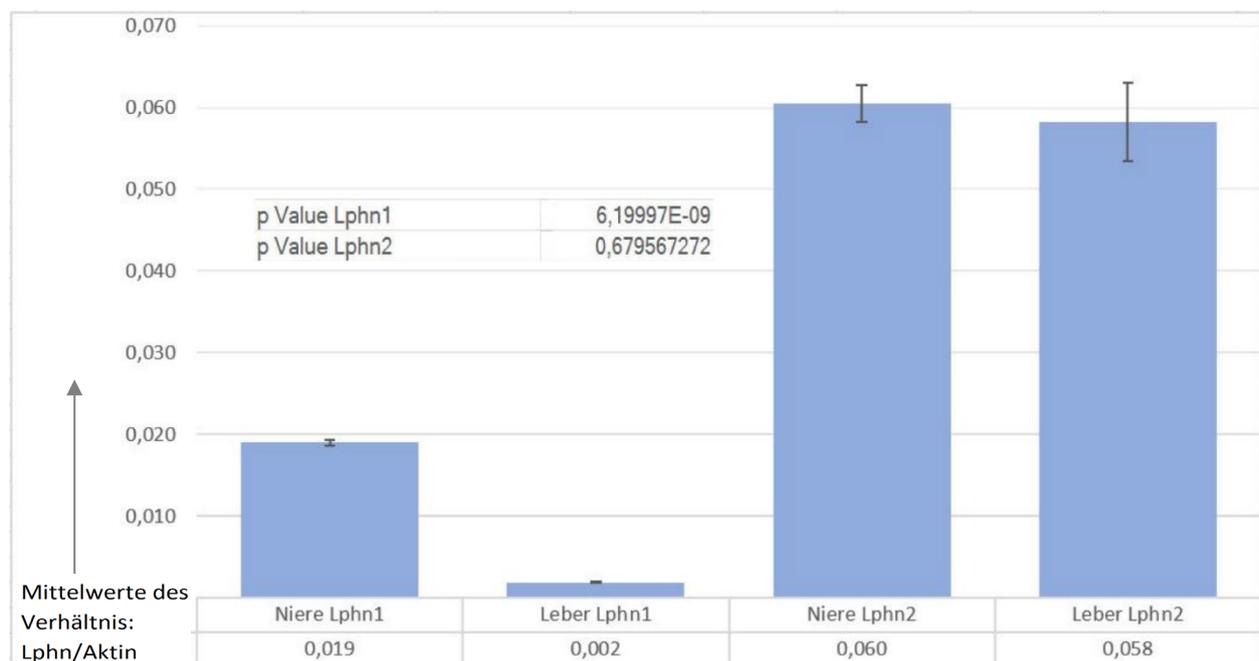


Abbildung 19: qRT-PCR der Gewebe von Niere und Leber bzgl. der Lphn2-Transkriptmengen relativ zu Aktin. Mittelwerte (blaue Balken) aus den Mittelwerten in der Tabelle rechts Abbildung 20. Überblick der Transkriptmengen von Lphn1-RNS und Lphn2-RNS relativ zu dem Haushaltsgen beta-Aktin. Unterschiedlich starke Expression von Lphn1-RNS in Niere und Leber (10:1). Annähernd gleichstarke Expression von Lphn2-RNS in Niere und Leber (1:1). p-Wert Lphn1 = 6.1e-9, signifikant. P-Wert Lphn2 = 0,67 nicht signifikant.

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq Lphn	Cq Aktinwerte	Verhältnis Lphn/Aktin	Mittelwerte
A01	FAM	Lphn1	Unkn	A19 Kidney	26,45	20,85	0,020723352	
A02	FAM	Lphn1	Unkn	A19 Kidney	26,52	20,85	0,019581923	0,019974907
A03	FAM	Lphn1	Unkn	A19 Kidney	26,53	20,86	0,019619446	
A04	FAM	Lphn1	Unkn	B19 Kidney	26,50	20,80	0,019159517	
A05	FAM	Lphn1	Unkn	B19 Kidney	26,72	21,00	0,01899047	0,018928896
A06	FAM	Lphn1	Unkn	B19 Kidney	26,73	20,99	0,0186367	
A07	FAM	Lphn1	Unkn	C19 Kidney	26,55	20,86	0,019397999	
A08	FAM	Lphn1	Unkn	C19 Kidney	26,50	20,80	0,019313074	0,019068135
A09	FAM	Lphn1	Unkn	C19 Kidney	26,86	21,10	0,018493333	
A10	FAM	Lphn1	Unkn	D19 Kidney	26,54	20,79	0,018633146	
A11	FAM	Lphn1	Unkn	D19 Kidney	26,59	20,80	0,018050741	0,018228439
A12	FAM	Lphn1	Unkn	D19 Kidney	26,70	20,91	0,01800143	
B01	FAM	Lphn1	Unkn	A21 Liver	30,77	21,69	0,001841661	
B02	FAM	Lphn1	Unkn	A21 Liver	30,74	21,69	0,001888918	0,001814414
B03	FAM	Lphn1	Unkn	A21 Liver	31,00	21,81	0,001712662	
B04	FAM	Lphn1	Unkn	B21 Liver	30,67	21,69	0,001980767	
B05	FAM	Lphn1	Unkn	B21 Liver	30,48	21,65	0,002202671	0,00210212
B06	FAM	Lphn1	Unkn	B21 Liver	30,74	21,86	0,002122921	
B07	FAM	Lphn1	Unkn	C21 Liver	30,66	21,68	0,001979072	
B08	FAM	Lphn1	Unkn	C21 Liver	30,83	21,59	0,001651983	0,001878637
B09	FAM	Lphn1	Unkn	C21 Liver	30,58	21,61	0,002004857	
B10	FAM	Lphn1	Unkn	D21 Liver	30,59	21,52	0,001863718	
B11	FAM	Lphn1	Unkn	D21 Liver	30,64	21,55	0,001828588	0,001891562
B12	FAM	Lphn1	Unkn	D21 Liver	30,47	21,49	0,00198238	

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq Lphn	Cq Aktinwerte	Verhältnis Lphn/Aktin	Mittelwerte
C01	FAM	Lphn2	Unkn	A19 Kidney	24,74	20,81	0,065745765	
C02	FAM	Lphn2	Unkn	A19 Kidney	24,81	20,79	0,061404527	0,063093397
C03	FAM	Lphn2	Unkn	A19 Kidney	24,75	20,74	0,062129899	
C04	FAM	Lphn2	Unkn	B19 Kidney	24,62	20,66	0,064280114	
C05	FAM	Lphn2	Unkn	B19 Kidney	24,77	20,74	0,061158952	0,062372167
C06	FAM	Lphn2	Unkn	B19 Kidney	24,73	20,71	0,061677434	
C07	FAM	Lphn2	Unkn	C19 Kidney	24,75	20,73	0,061459711	
C08	FAM	Lphn2	Unkn	C19 Kidney	24,64	20,64	0,062480463	0,06256983
C09	FAM	Lphn2	Unkn	C19 Kidney	24,61	20,64	0,063769315	
C10	FAM	Lphn2	Unkn	D19 Kidney	24,99	20,75	0,052781855	
C11	FAM	Lphn2	Unkn	D19 Kidney	24,91	20,71	0,05448726	0,053941826
C12	FAM	Lphn2	Unkn	D19 Kidney	25,03	20,84	0,054556362	
D01	FAM	Lphn2	Unkn	A21 Liver	25,97	21,79	0,055266731	
D02	FAM	Lphn2	Unkn	A21 Liver	25,98	21,81	0,055622795	0,055568827
D03	FAM	Lphn2	Unkn	A21 Liver	25,95	21,79	0,055816955	
D04	FAM	Lphn2	Unkn	B21 Liver	25,52	21,58	0,065147312	
D05	FAM	Lphn2	Unkn	B21 Liver	25,61	21,67	0,065471954	0,065703593
D06	FAM	Lphn2	Unkn	B21 Liver	25,48	21,57	0,066491513	
D07	FAM	Lphn2	Unkn	C21 Liver	25,43	21,51	0,06628456	
D08	FAM	Lphn2	Unkn	C21 Liver	25,54	21,59	0,064590849	0,065785922
D09	FAM	Lphn2	Unkn	C21 Liver	25,55	21,64	0,066482356	
D10	FAM	Lphn2	Unkn	D21 Liver	25,94	21,50	0,045922462	
D11	FAM	Lphn2	Unkn	D21 Liver	25,99	21,54	0,045834469	0,04578509
D12	FAM	Lphn2	Unkn	D21 Liver	26,09	21,63	0,04559834	

Abbildung 20: Aufbau der qRT-PCR und Bedeutung der Werte im CFX-Connect Real-Time System.

Well = Bestückung der Reaktionskammern mit je 3 gleichen Gewebeproben (Triplets) wie in "Sample" gezeigt. A01 – A03 mit A19 Kidney usw. wobei Buchstaben für verschiedene Tiere stehen. Fluor = Fluorophore, hier FAM mit absorbierter Wellenlänge von 495nm und emittierter Wellenlänge von 516nm in dunkelgrün. Target = Lphn 1- bzw. Lphn2 RNS. Content = wurde nicht definiert und blieb leer. Cq Lphn = Quantification cycle Lphn. Cq Aktin = Quantification cycle Aktin. Der Wert wird in der qPCR als Maß für die Expression betrachtet und anhand der Fluoreszenzkurve bestimmt.

3.3 Proteinanalytik von Lphn2

Zum Nachweis der Proteine, welche das Translationsprodukt der transkribierten Gene darstellen, erfolgte ein sogenanntes Immunoblotting wie in 2.2.7 beschrieben. Nicht jedes transkribierte Gen wird zwangsläufig in ein Protein übersetzt. Viele Proteine werden während oder unmittelbar nach der Synthese (posttranslational) kovalent modifiziert. Die Informationen für die Modifikationen sind in der Primärstruktur der Proteine enthalten. Diese entscheidet sowohl direkt als auch mittels posttranslationaler Modifikationen über die Faltung. Posttranslationale Modifikationen erfolgen entweder an primären Bindungen innerhalb der Polypeptidkette oder peripher auf den Seitenketten der Aminosäuren. Die ko- und posttranslationalen Modifikationen tragen maßgeblich zur Komplexität der in verschiedenen Zellen präsenten Proteinstrukturen bei (Löffler/Petrides 2014). Zur Gewährleistung der internen Validität wurden wie bereits in früheren Arbeiten (Anderson et al., 2017) beschriebene Hirnegewebe als Kontrolle mitgeführt. Wie vorbeschrieben zeigt in Abbildung 15 Gehirn eine deutliche Bande als Korrelat des Lphn2 Translationsprodukts. Dieses hat ein geringeres Molekulargewicht als der vollständige Rezeptor, da der große extrazelluläre N-Terminus an der sogenannten GAIN-Region (GPCR-Autoproteolyse-induzierende-Domäne) des Rezeptors autoproteolytisch abgespalten wird. Es wird also nur der transmembranäre Teil mit angehängtem mVenus-Tag durch den Antikörper erkannt, der abgespaltene Teil entzieht sich der Untersuchung. Zur Verifikation wird in den übrigen Geweben also eine positive Bande des Lphn2 Spaltprodukts bei ca. 90 kDa erwartet.

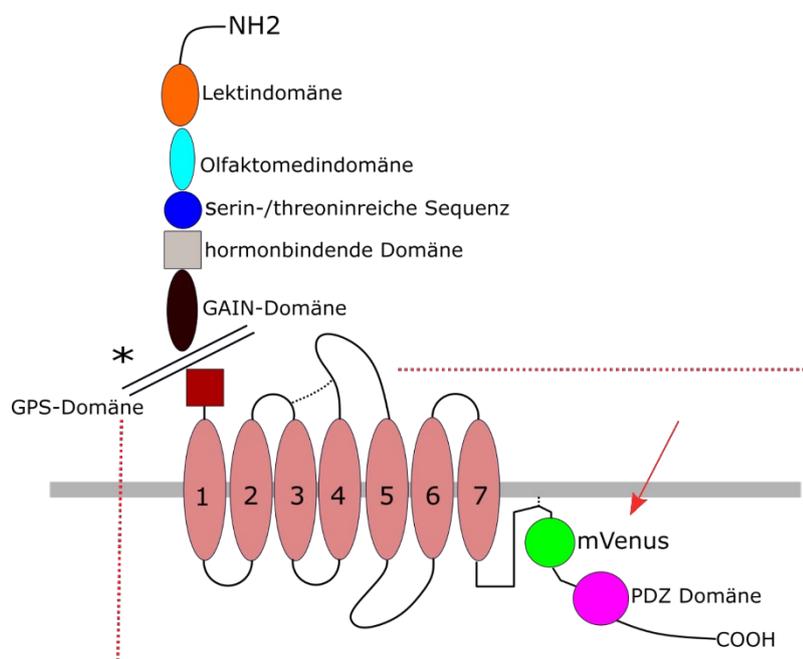


Abbildung 21: Autoproteolytische Spaltung des Lphn2 Rezeptors an der GPS-Domäne (*). Am C-terminus befindet sich die mVenus-Modifikation von Lphn2 (roter Pfeil). Somit ergibt sich zur Detektion von Lphn2 ein niedermolekulares Spaltprodukt von ca. 90-100 kDa.

Lebergewebe zeigt, neben zahlreicher unspezifischer Proteinbindungen, eine weniger prominente, jedoch eindeutige Bande. Die antizipierte Bande im Nierengewebe blieb aus bzw. ist nach oben verschoben. Mögliche methodische Fehler konnten nicht sicher ausgeschlossen werden, da sich bei ca. 100 kDa ein ähnliches Signal wie in der Leber zeigt. Eine unterschiedliche Glykosylierung des Proteins könnte ebenfalls für das Phänomen verantwortlich sein. Zum deutlichen Vergleich wurden die Negativkontrollen des genetischen Wildtyps jeweils vor dem „Knockin“ (Gewebeprobe mit modifiziertem Protein) aufgetragen. Somit konnte in diesem Teil der Arbeit zumindest partiell gezeigt werden, dass es zur extraneuronalen Expression von Lphn2-Protein in der Leber kommt.

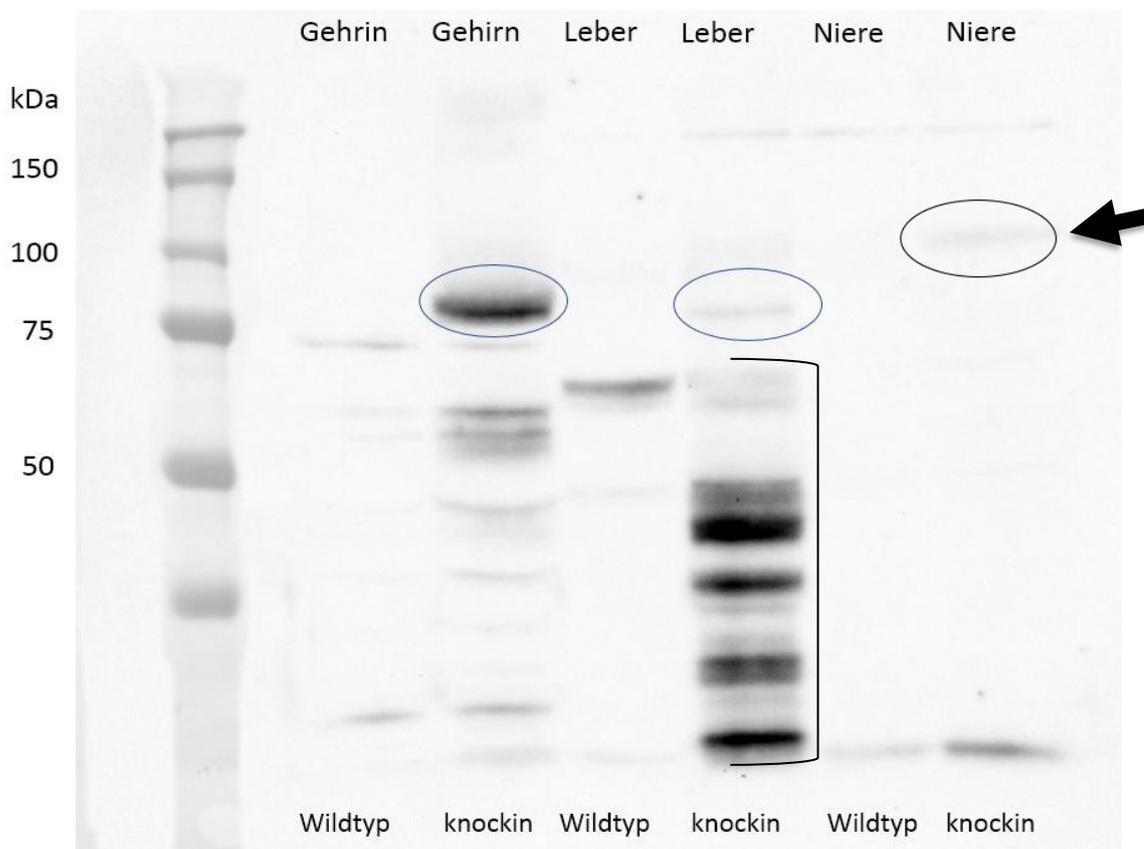


Abbildung 22: Immunoblot: anti-GFP-A11122 (1:2000). Detektion des C terminalen Lphn2 Spaltprodukts nach Autoproteolyse an der GAIN-Region: jeweils Gehirn, Leber und Niere mit Kontrollen voran. Deutliche Banden bei Gehirn- und Leber-Knockin als Korrelat des Lphn2 Translationsprodukts zwischen 75 und 100 kDa. Klammer = zahlreiche unspezifische Proteinbindungen im niedermolekularen Bereich der Leber. Knockin Niere zeigt eine Bande bei etwa 100 kDa (Schwarzer Pfeil).

3.4 Expression von Lphn2 in Gehirnarealen der Maus

Um sich mit histologischen Färbemethoden vertraut zu machen und grundlegende Arbeitsweisen zu erlernen, wurde zum Einstieg eine immunhistochemische Färbung des Hippocampus der Maus angefertigt. Bei guter Verfügbarkeit und relativ leichter Handhabung wurde zunächst ein lichtmikroskopisches Verfahren gewählt. Die folgenden Aufnahmen wurden am Lichtmikroskop mit dem Objektiv Zeiss Plan NEOFLUAR 10fach angefertigt. Wie von (Anderson et al., 2017) vorbeschrieben, konnte beim Lphn2-Knockin eine deutliche Färbung im Stratum lacunosum moleculare der Cornu ammonis Region nachgewiesen werden, welche bei der Kontrolle ausblieb.

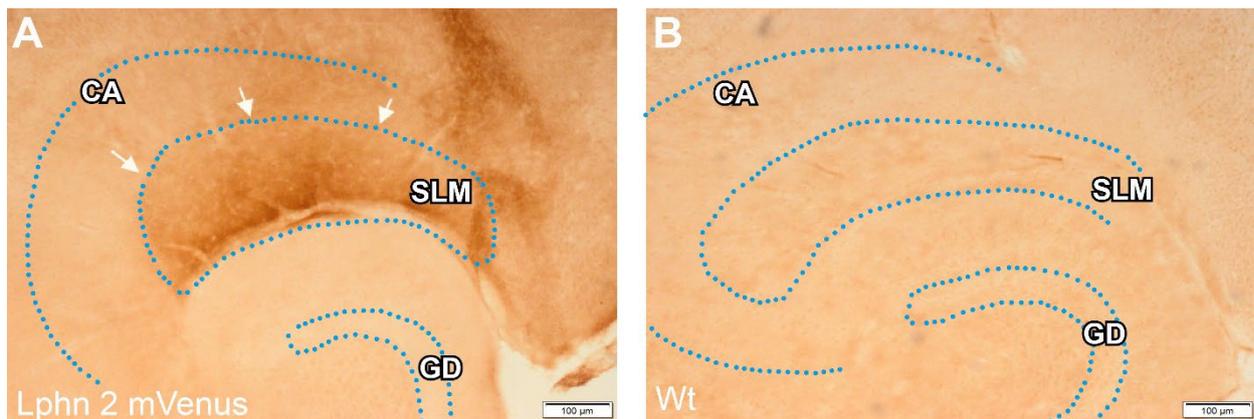


Abbildung 23: Repräsentative immunhistochemische Bilder von Lphn2-mVenus-KI und Wildtyp. Horizontale Schnitte des Hippocampus der Maus. GD = Gyrus dentatus, SLM = Stratum lacunosum moleculare, CA = Cornu ammonis Region. Anti-GFP-A11122 + VECTASTAIN® ABC Kit Peroxidase (HRP)
 A: Lokalisation von Lphn2-mVenus in CA1 Region des Hippocampus der Maus mit Vectastain ABC Reagenz (weiße Pfeile). B: Wildtypkontrolle ohne Nachweis einer Farbreaktion.

3.5 Mikroskopie der Immunfluoreszenz

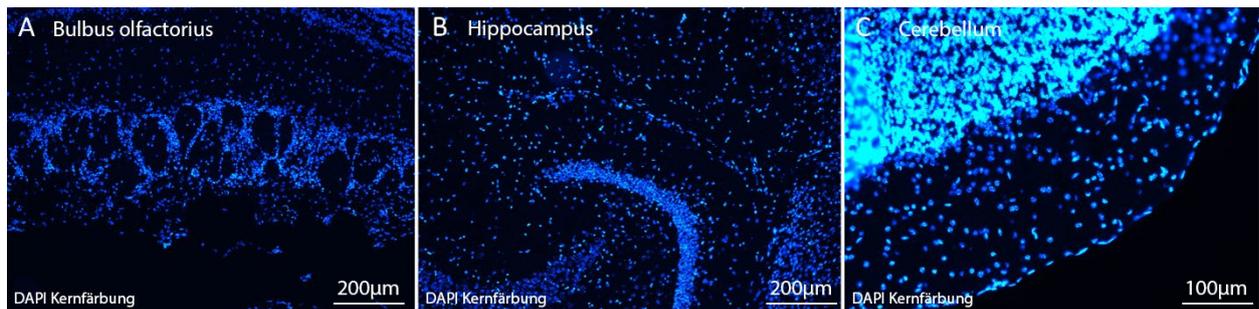


Abbildung 24 (identisch mit Abbildung 9, Kapitel 1.3.3): **Bekannte Expressionsareale von Lphn2 zur Orientierung.** V. l. n. r. A: Bulbus olfactorius, B: Hippocampus, C: Cerebellum. Kernfärbung (Nuclei mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol) blau. Zur Übersichtlicheren Darstellung und als Orientierungshilfe wurden in Abbildung 25, 26 und 27 Bilder mit und ohne Kernfärbung gegenübergestellt.

Um ein optimales Signal-Rausch Verhältnis zu generieren, wurden am Fluoreszenzmikroskop, Axio Imager M.2 mit AxioCam 512 color, folgende Einstellungen vorgenommen:

Objektiv	Zeiss Plan-Apochromat 5X/10X/20X/40X
Lichtquelle	100%
DAPI	100 ms
GFP	4000 ms
Cy3	3000 ms – 6000 ms

Die Gewebeareale aus Abbildung 24 der in 3.1 identifizierten Lphn2 Knockin positiven Mäusen wurden nun mit potenziell passenden Antikörperkombinationen aus 2.1.8 behandelt, um das Lphn2-mVenus-Fusionprotein zu detektieren. Der Nachweis erfolgt mittels Antikörper, der die GFP-Variante mVenus erkennt. Kontrollen wurden jeweils ohne primären AK wie in 4.2 durchgeführt. Die Signaleigenschaften der einzelnen Kombinationen zeigen sich wie folgt.

Es erscheint ein deutliches Signal durch die AK Kombination: Rabbit anti-GFP (A11122, prim. AK) + Donkey anti Rabbit Cy3 (sek. AK) in Bulbus Olfactorius und CA1 Region des Hippocampus (Abbildung 25 und 26). Schwache Signale entstehen auch durch die AK Kombination: Chicken anti-GFP (prim. AK) + Donkey anti Chicken (sek. AK) in Bulbus olfactorius, besser jedoch in der CA1 Region des Hippocampus (Abbildung 25 und 26). Es konnte kein verwertbares Signal durch FluoTag-X4 anti-GFP als direkt gekoppelter Antikörper (ohne Vermittlung durch einen sekundären AK) in Bulbus olfactorius, oder der CA1 Region des Hippocampus detektiert werden. Hierbei ist anzumerken, dass keine Potenzierung der Signale durch einen indirekten zweiten Antikörper zustande kommen kann (Abbildung 25 und 26). Cerebelläre Signale (Abbildung 27) sind bei allen Kombinationen nicht eindeutig vom Hintergrund abzugrenzen, es kommt zu Interaktionen und unspezifisch erhöhtem Signal. Zur übersichtlicheren Darstellung und als Orientierungshilfe wurden in Abbildung 25, 26 und 27 die Bilder mit und ohne Kernfärbung gegenübergestellt. Die im Bild genannten Kontrollen entsprechen Gewebeprobe der in 2.1.9 erläuterten und in Bezug auf das Fusionsprotein als Wildtyp identifizierten Mausgewebe. Siehe hierzu auch 3.1.

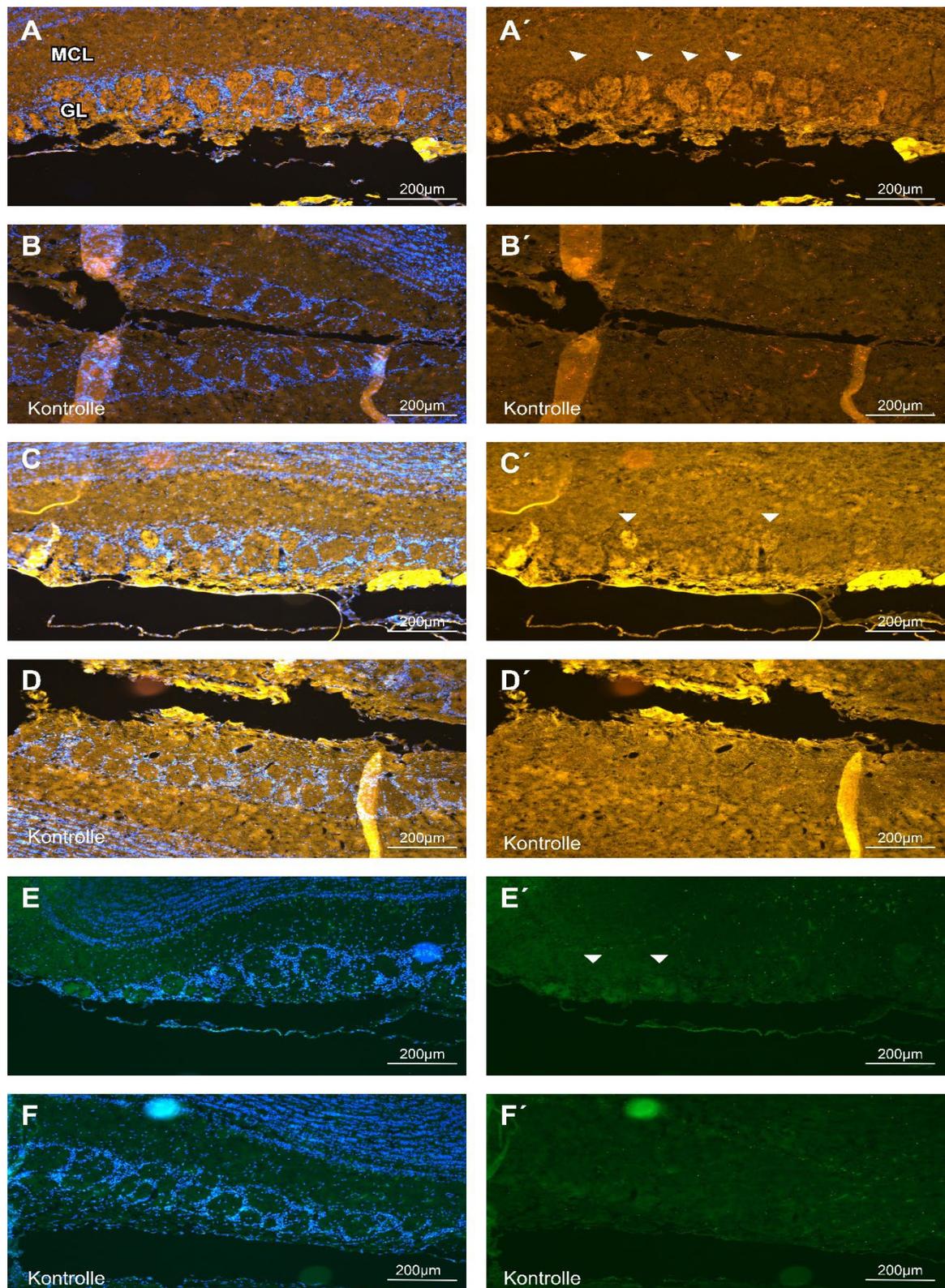


Abbildung 25: Beispiele für immunpositive Signale von Lphn2-mVenus in Bulbus olfactorius der Maus (weißer Pfeil). MCL = Mitralzellschicht, GL = Glomerularschicht. Links DAPI-Kernfärbung zur Orientierung (blaue Signale). A+A': Antikörper = Rabbit anti-GFP (A11122) + Donkey anti Rabbit Cy3 (orange), C+C': Antikörper = Chicken anti-GFP + Donkey anti Chicken Cy3 (orange), E+E': Antikörper = FluoTag®-X4 anti-GFP (hellgrün). B+B', D+D', F+F' = Wildtyp Kontrolle mit gleichen Antikörpern.

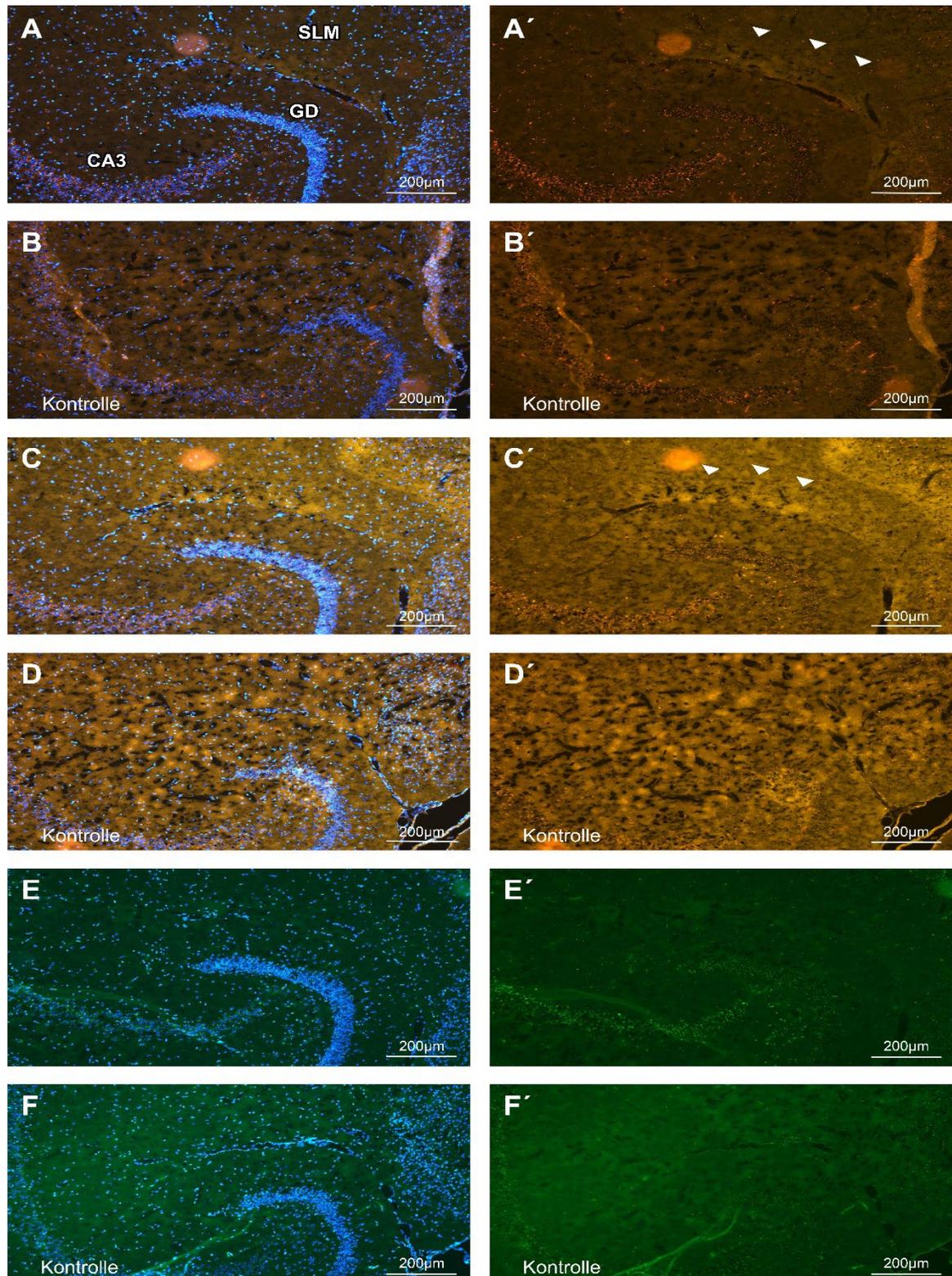


Abbildung 26: Immunlokalisation von Lphn2-mVenus in Hippocampus der Maus (weißer Pfeil). CA = Cornu ammonis Region, SLM = Stratum lacunosum moleculare, GD = Gyrus dentatus. Links DAPI-Kernfärbung zur Orientierung (blaue Signale). A+A': Antikörper = Rabbit anti GFP (A11122) + Donkey anti Rabbit Cy3 (orange), C+C': Antikörper = Chicken anti GFP + Donkey anti Chicken Cy3 (orange), E+E': Antikörper = FluoTag®-X4 anti-GFP (hellgrün). B+B', D+D', F+F' = Wildtyp Kontrolle mit gleichen Antikörpern.

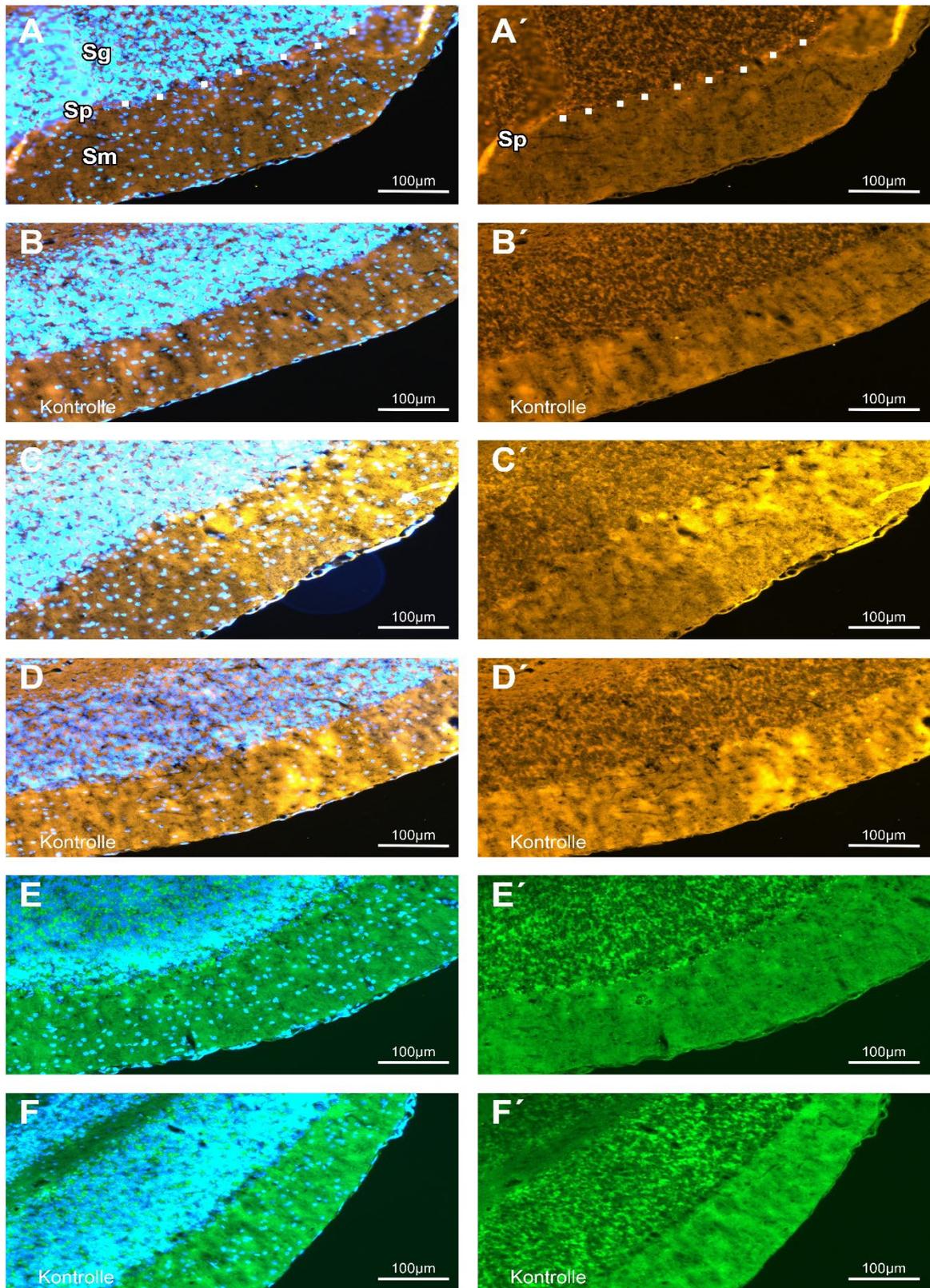


Abbildung 27: Immunlokalisation von LPHN2-mVenus in Cerebellum der Maus. Sg = Stratum granulosum, Sm = Stratum moleculare, Sp = Stratum purkinjense. Links DAPI-Kernfärbung zur Orientierung (blaue Signale). A+A': Antikörper = Rabbit anti A11122 + Donkey anti Rabbit Cy3 (orange), C+C': Antikörper = Chicken anti GFP + Donkey anti Chicken Cy3 (orange), E+E': Antikörper = FluoTag@-X4 anti-GFP (hellgrün). B+B', D+D', F+F' = Wildtyp Kontrolle mit gleichen Antikörpern.

3.5.1 Immunlokalisation im flottierenden Schnitt

Über einen Zeitraum von 24 Stunden und unter Bewegung auf einem Schüttler wurde durch freies Schweben in der jeweiligen Antikörpersuspension versucht, optimale Bedingungen zur Erkennung des Epitops zu schaffen und die Penetration des Gewebes zu verbessern. In Anderson et al., 2017, Abbildung 1 konnte so die Verteilung der Fluoreszenz im Mausgehirn unter Verwendung des GFP-Antikörpers deutlich dargestellt werden. Durch die Dicke des Gewebeschnitts und die Überlagerung der Schichten in der mikroskopischen Aufnahme sind hier jedoch keine verlässlichen Aussagen möglich. Die Methode erhöht außerdem die Autofluoreszenz im Präparat deutlich. Dies ist am ehesten durch die große Schnittdicke (100 μm) zu erklären. Zusätzlich ist der Umgang mit den Schnitten in einer Wellplatte technisch umständlich, es kommt zur Fragmentierung und Einfaltungen während der Positionierung auf dem Objektträger (Abbildung 28, 29).

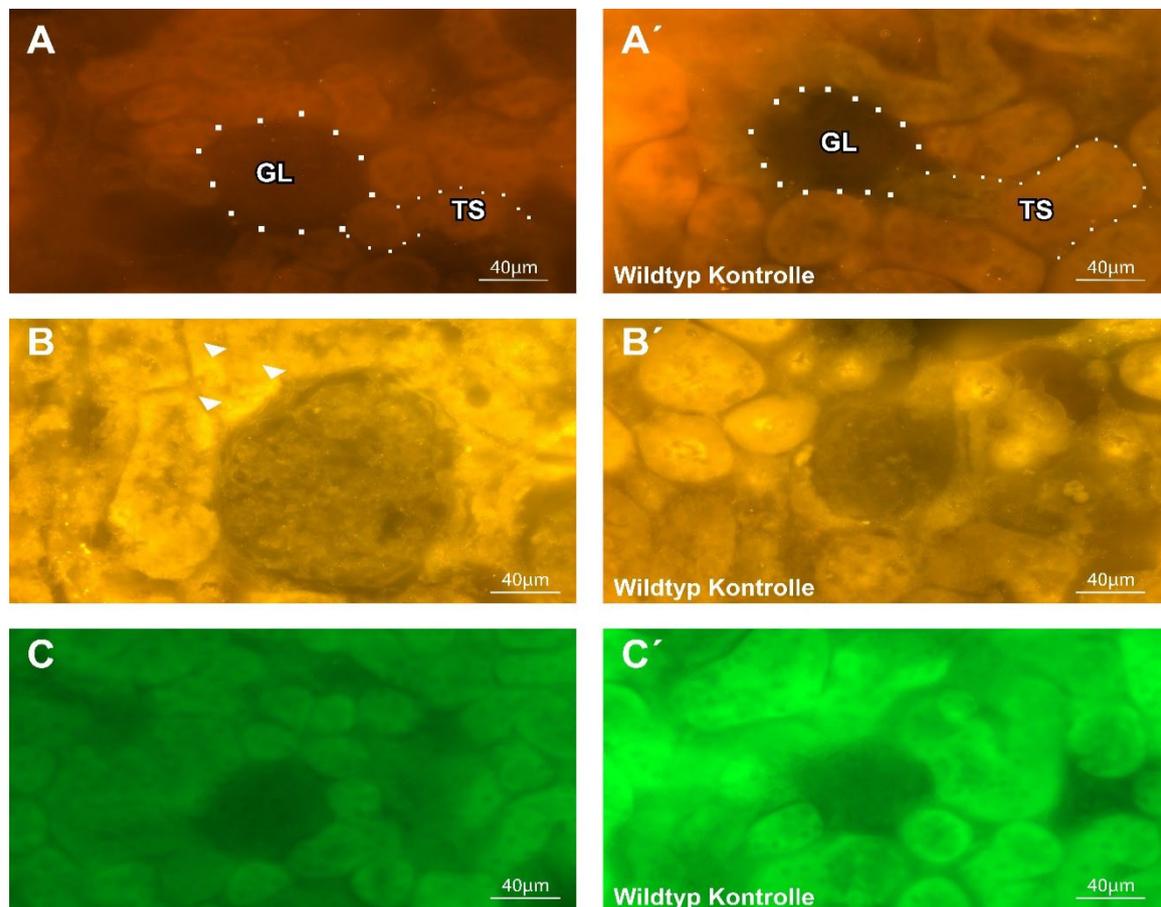


Abbildung 28: Antikörpervergleich im flottierenden Schnitt: Niere. 100 μm , GL = Glomerulus, TS = Tubulussystem, A: Rabbit anti A11122 + Donkey anti Rabbit cy3, kein sicherer Signalnachweis. B: Chicken anti GFP + Donkey anti Chicken Cy3, weiße Pfeile zeigen mögliche flächige Signale im Bereich des Tubulusapparats. C: FluoTaq®-X4 anti-GFP. A', B', C' = Kontrollen, teils unspezifischer Hintergrund bei gleicher Expositionsdauer.

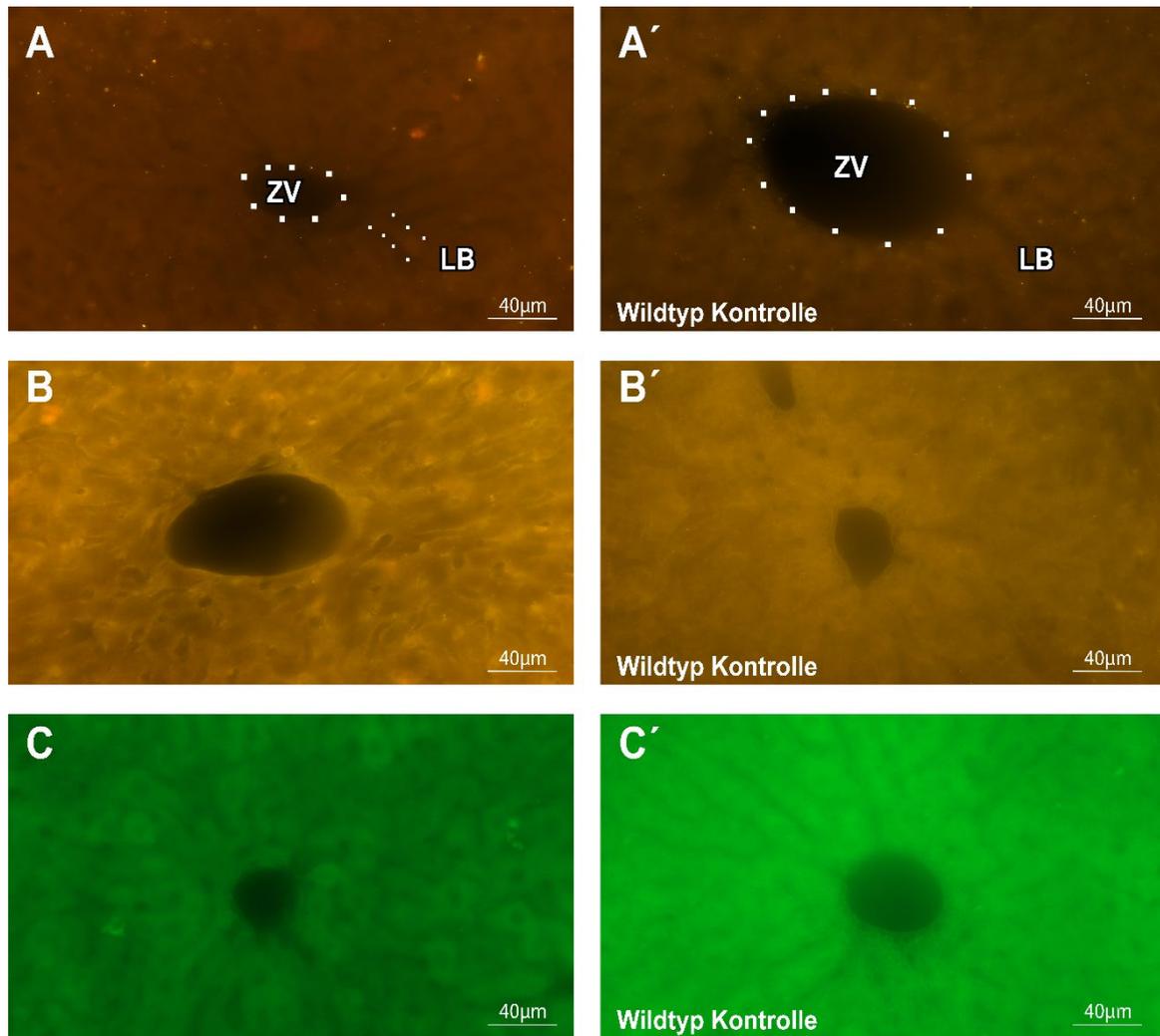


Abbildung 29: Antikörpervergleich im flottierenden Schnitt: Leber 100 µm, ZV = Zentralvene, LB = Leberbälkchen, A: Rabbit anti GFP (A11122) + Donkey anti Rabbit Cy3, B: Chicken anti GFP + Donkey anti Chicken Cy3. Flächige "Signalstrassen" im Leberparenchym, Überlagerung durch rote Blutkörperchen und unspezifische Konglomerate. C: FluoTaq®-X4 anti-GFP. A', B', C' = Kontrollen unspezifisch heller, bei gleicher Expositionsdauer.

3.5.2 Reduktion der Autofluoreszenz durch Sudanschwarz B

Die biologische Autofluoreszenz von beiden Geweben sowohl in Nierentubuli als auch in Leberbälkchen ist selbst bei geringer Schichtdicke erheblich (siehe auch Abbildung 28 und 29). Zusätzlich erschweren Gewebekomponenten wie rote Blutzellen (RBC) oder unspezifische Präzipitate die Unterscheidung zwischen relevantem Signal und Hintergrund. Daher war es erforderlich, geeignete „Quenching-Methoden“ zu etablieren, um endogene Fluorophore zurückzudrängen. Zum Einstieg wurde Sudanschwarz B (SBB, engl. „Sudan black B“, Sigma-Aldrich, Deutschland) gewählt. Sudanschwarz B ist eine synthetisch hergestellte chemische Verbindung, die üblicherweise zur Färbung von Chromosomen und bakteriellen Lipiden verwendet wird. Es ist ein schwarzer Feststoff, welcher in Alkohol gelöst wird. Dies stellt im Rahmen der Inkubation ein Problem dar, da sich der Alkohol durch seinen Dampfdruck rasch verflüchtigt, wodurch es umso schneller zum Austrocknen der Objektträger während der Inkubationszeit kommen kann. Darüber hinaus ist die Handhabung jedoch unkompliziert. Im eigenen Versuch wurden Schichtdicken von 50 µm gewählt und so das Bildrauschen um ein akzeptables Maß zurückgedrängt. Bisher wurden Anwendungsmethoden in Leber und Niere (Niku et al., 2007), (Sun et al., 2011) mit zufriedenstellendem Ergebnis beschrieben. Im eigenen Versuch wurde die Fluoreszenz jedoch lediglich im gesamten Bild abgeschwächt und es entsteht eher der Eindruck einer Trübung anstatt einer besseren Erkennbarkeit etwaiger Signale. Die Schwächung der Fluoreszenz folgt wie erwartet den Konzentrationsstufen (in folgender Abbildung 30 unten links im Bild). Zunächst kommt es zur Schwächung einiger stark signalgebender Tubulusanteile (in der Niere) sowie den Leberbälkchen. Rote Blutkörperchen und unspezifische Präzipitate stechen im eigenen Versuch bei Konzentration von 0,01% und 0,1% Sudanschwarz B vor allem im Nierenparenchym (Glomerulus und Tubulusapparat) besonders hervor (Abbildung 30, C und D).

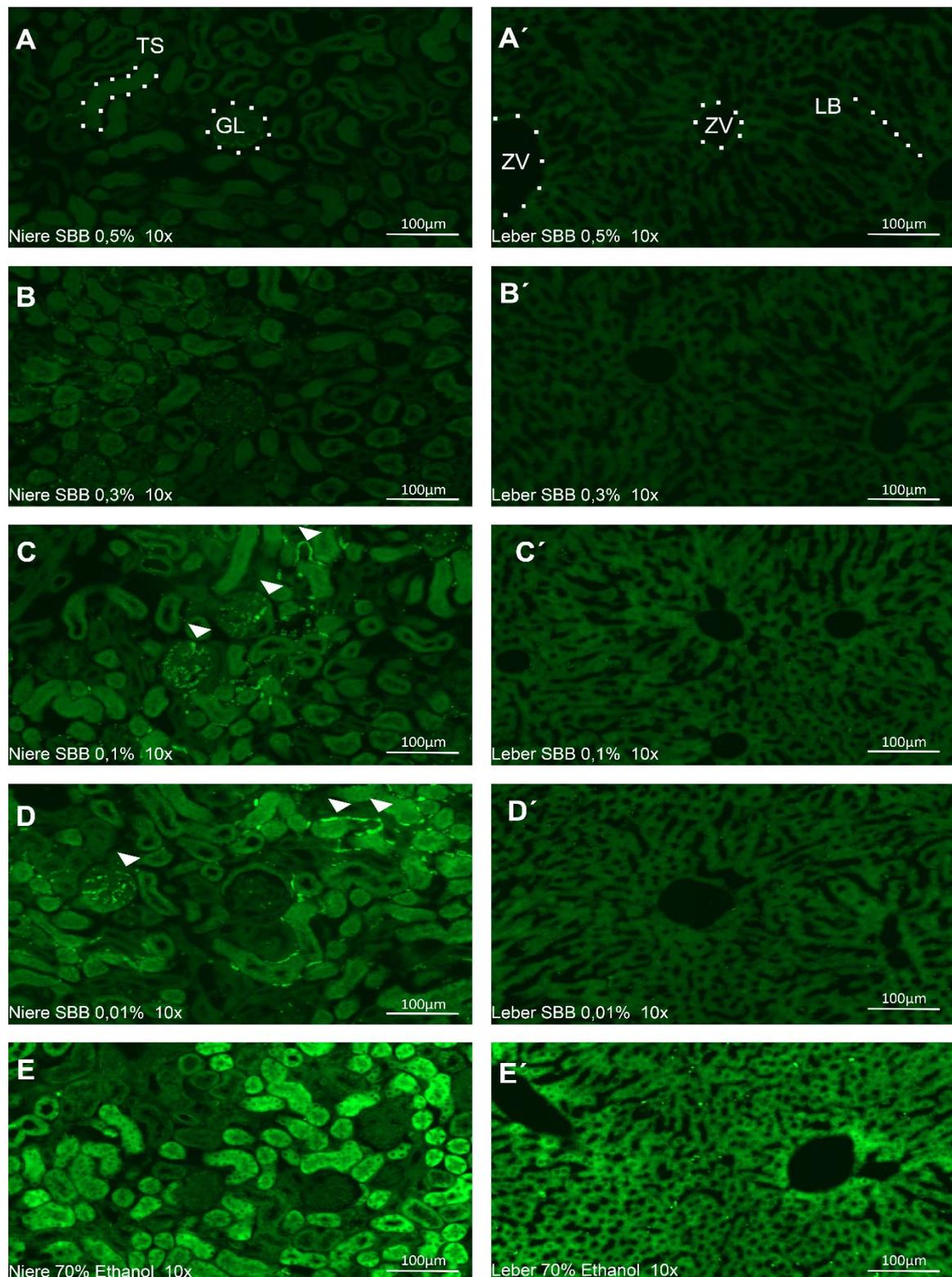


Abbildung 30: Auswirkung unterschiedlicher SBB-Konzentrationen auf die Autofluoreszenz des Gewebes. Niere (A-E) und Leber (A'-E') nach Inkubation in unterschiedlichen Konzentrationen in SBB: A/A', 0,5%; B/B', 0,3%; C/C', 0,1%; D/D', 0,01%; E/E' Kontrolle 70% Ethanol. Auf Basis bereits gezeigter Methoden (Sun et al., 2011) konnte hier auch eine Abnahme der Autofluoreszenz erreicht werden. Dennoch erschweren unspezifische Konkrementen und rote Blutkörperchen die eindeutige Identifizierung des Signals (weißer Pfeil).

3.5.3 Reduktion der Autofluoreszenz durch TrueBlack® und TrueView®

Bei guten Resultaten in den Hirnregionen (Abbildung 26 und 27) wurde der anti-GFP (A11122 aus Rabbit) + Donkey anti Rabbit Cy3 auf Niere und Leber mit 10 µm Schnittdicke nativ angewendet, sowie mit TrueBlack® (Biotium, USA) und TrueView® (Vector Labs, USA) versucht, den unspezifischen Hintergrund zu reduzieren. In vorangegangenen Versuchsreihen konnte aufgrund fulminanter Autofluoreszenz der beiden Gewebetypen keine eindeutige Signaldifferenzierung vorgenommen werden. In diesem Versuch konnten erstmals eindeutige Fluoreszenzsignale des Lphn2 GPCR extraneuronal in Niere und Leber identifiziert werden. Die Signalintensität ist bereits im Nativpräparat, besonders im Tubulusbereich der Niere, herausragend (Abbildung 31, A nativ). Es zeigen sich kleinste, punktförmige, scheinbar dem Innenlumen des Tubulusapparats folgende, hellorangene Signale.

Im Hepatozyten sind Hintergrundsignale stark ausgeprägt (Abbildung 31, A' nativ). Die sichere Differenzierung zwischen Leberbälkchen und den darin enthaltenen hellorangenen Signalen ist im Nativpräparat erschwert. Da das Leberparenchym sehr stoffwechselaktiv ist, sind hier unspezifische Interaktionen mit den Antikörpern denkbar.

Das Quenching mit TrueBlack® wurde probatorisch vorgenommen, da es sich hierbei prinzipiell um einen Lipofuscinquencher handelt der nach Herstellerangabe jedoch auch nicht-Lipofuscin Quellen erfasst. Bei protokollgerechter Anwendung kommt es jedoch zu einer matten Trübung des Präparats mit nahezu vollständiger Auslöschung der Signale sowie einer Unschärfe der Strukturen, die nicht primär durch die Mikroskopeinstellung korrigiert werden konnte (Abbildung 31, B TrueBlack), (Abbildung 31, B' TrueBlack).

TrueView® drängt den Hintergrund deutlich zurück und hebt relevante Signale vor allem in Hepatozyten deutlich hervor. Im gesamten abgebildeten Leberparenchym zeigen sich hellorange Signale entlang der Hepatozytenbälkchen, betont an Leberzellgrenzen bei Aussparung der Sinusoide (Abbildung 31, C' TrueView). Während der Hersteller den Einsatz dieser Methode an verschiedenen Stellen im Färbeprozess als möglich angibt, wurde hier stets am Ende, unmittelbar vor dem Fixieren und Konservieren der Gewebe auf dem Objektträger mit TrueView® behandelt.

Das speziell für diese Arbeit entworfene Verfahren zur Identifikation von extraneuronalen Lphn2 aGPCR Signalen ist in seiner Form bisher nicht vorbeschrieben. Es kann bei kurzer Inkubationszeit sicher angewendet werden und eröffnet zahlreiche weitere Forschungsoptionen im Bereich Identifizierung und Lokalisation dieses Rezeptors.

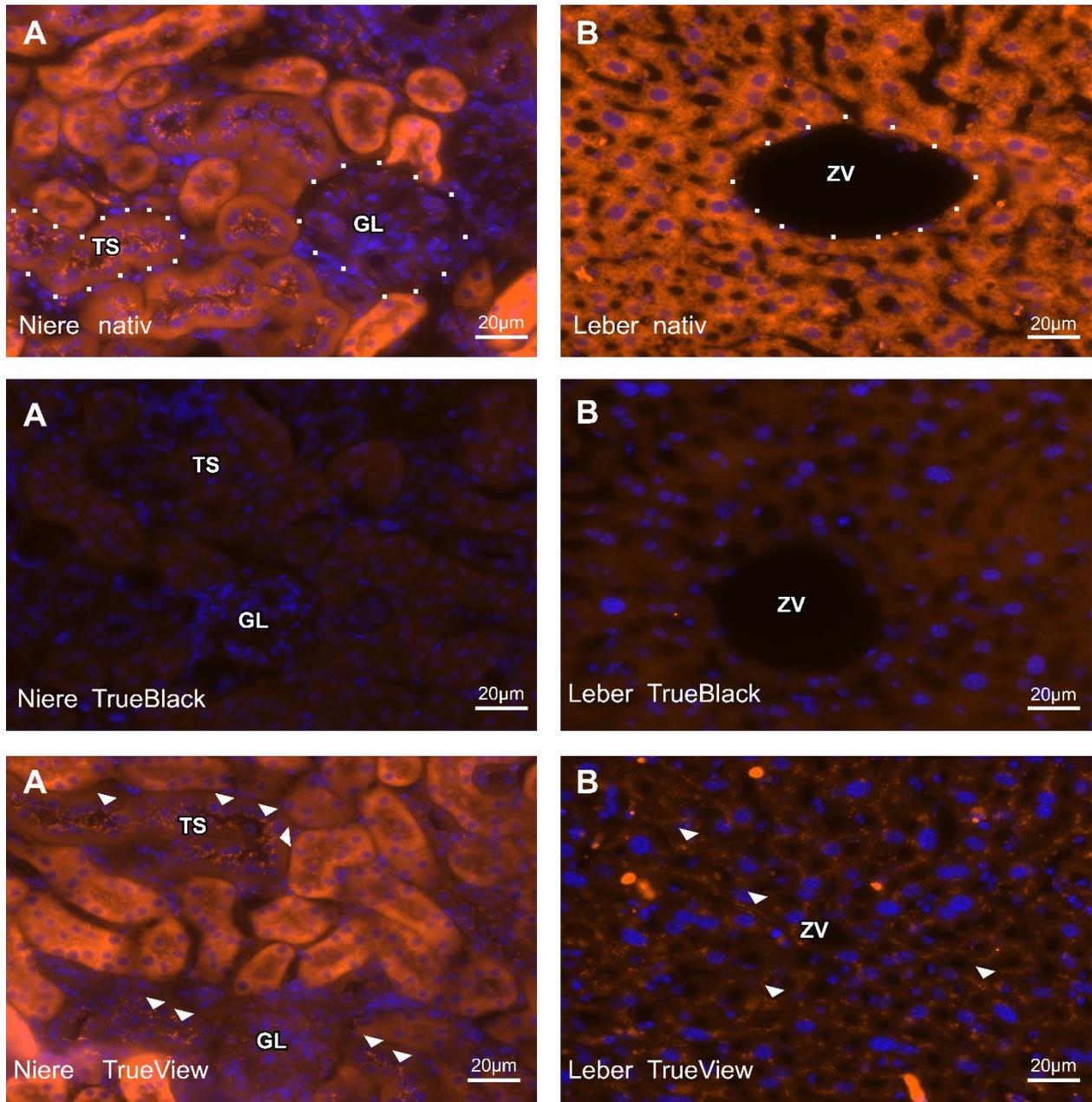


Abbildung 31: Signalverhalten bei unterschiedlichen Quenching Methoden. TS = Tubulussystem, GL = Glomerulus, ZV = Zentralvene. Links A: Niere, rechts B: Leber, von oben nach unten: Nativ = Rabbit anti GFP (A11122) + Donkey anti Rabbit Cy3 ohne Quenching, darunter TrueBlack®, darunter TrueView® Quencher. Im Nativ- und TrueView®-Bild zeigen sich deutliche Signale im Tubulussystem. TrueView® ermöglicht Signalidentifikation auch im Leberparenchym während TrueBlack® keine Zuordnung von Signalen ermöglicht.

3.5.4 Signaldistribution auf Organebene

Mikroanatomische Unterschiede im Aufbau einzelner Organbereiche wie in 1.3.1 und 1.3.2. könnten mit einer spezifischen Verteilung des Rezeptors einher gehen. Nachdem die Demaskierung der Signale mittels TrueView® etabliert wurde, erfolgte nun ein Screening der Organparenchyme auf mögliche auffällige Verteilungsmuster (Abbildung 32). Die makroskopische Betrachtung der Objektträger allein (wie in der Hellfeldmikroskopie üblich) ist ohne Anregungssignal für die Fluoreszenz nicht zulässig. In den Übersichtsaufnahmen mittels 5-fach Okular zeigt sich das Signalverhalten wie folgt.

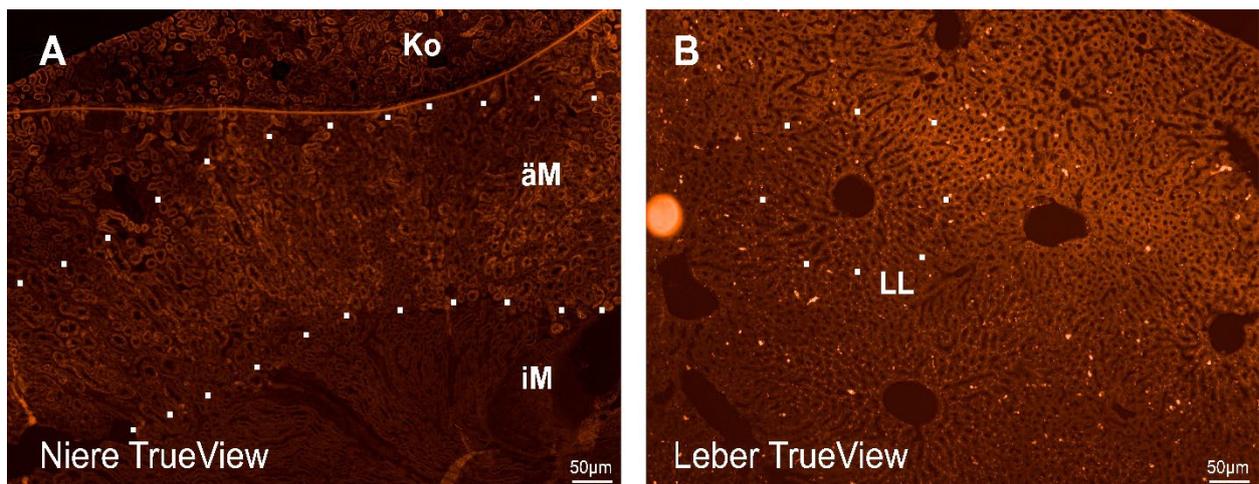


Abbildung 32: Signaldistribution im Organparenchym von A = Niere und B = Leber. Übersicht der Areale durch Zeiss Plan-Apochromat 5-fach. Ko = Kortex renalis, äM = äußeres Mark, iM = inneres Mark. LL = Leberläppchen. A: Überwiegend positive Signale im Bereich des Kortex und des äußeren Marks. Außen- und Innenstreifen können nicht differenziert werden. Im inneren Nierenmark ist neben unspezifischem Hintergrund kein eindeutiges Signal erkennbar. B: Artefaktreiche Aufnahme. Das Leberparenchym zeigt ein ubiquitäres Verteilungsmuster im Bereich eines Leberläppchens mit primärer Organisation entlang der Hepatozytenbalkchen. Auch über mehrere funktionelle Einheiten hinweg bis zur Laberkapsel (oben rechts im Bild) kann keine Signalalteration abgegrenzt werden.

3.5.5 Reevaluation der vorherigen Ergebnisse und Kontrolle der Methoden

Im Hinblick auf Haltbarkeit und Konservierung der Objektträger mit den Proben wurde nach 6 Monaten (Zeitintervall eines Semesters der UdS und Einführung neuer Doktoranden) eine Kontrolle der Gewebe auf ihre Autofluoreszenz und Signalstärke durchgeführt (Abbildung 33). Es sollte überprüft werden, ob bisher identifizierte Signale und Bildeindrücke sowie Mikroskopieeigenschaften weiterhin auftreten. Alle Objektträger wurden protokollgerecht im Dunkeln bei 4° C sorgfältig aufbewahrt. Während die Nativpräparate, welche mit der etablierten AK-Kombination: Rabbit anti GFP (A11122) + Donkey anti Rabbit Cy3 ohne Quencher noch zufriedenstellende Signalintensitäten aufweisen, sind TrueView® behandelte Objektträger ausgebleicht und weisen keine spezifischen Signale mehr auf. In diesem Aufbau konnte so eine grundsätzliche zeitliche Limitation im Umgang mit den behandelten Geweben herausgestellt werden, bei denen einen zusätzliche Reduktion der Autofluoreszenz mittels TrueView® vorgenommen wurde.

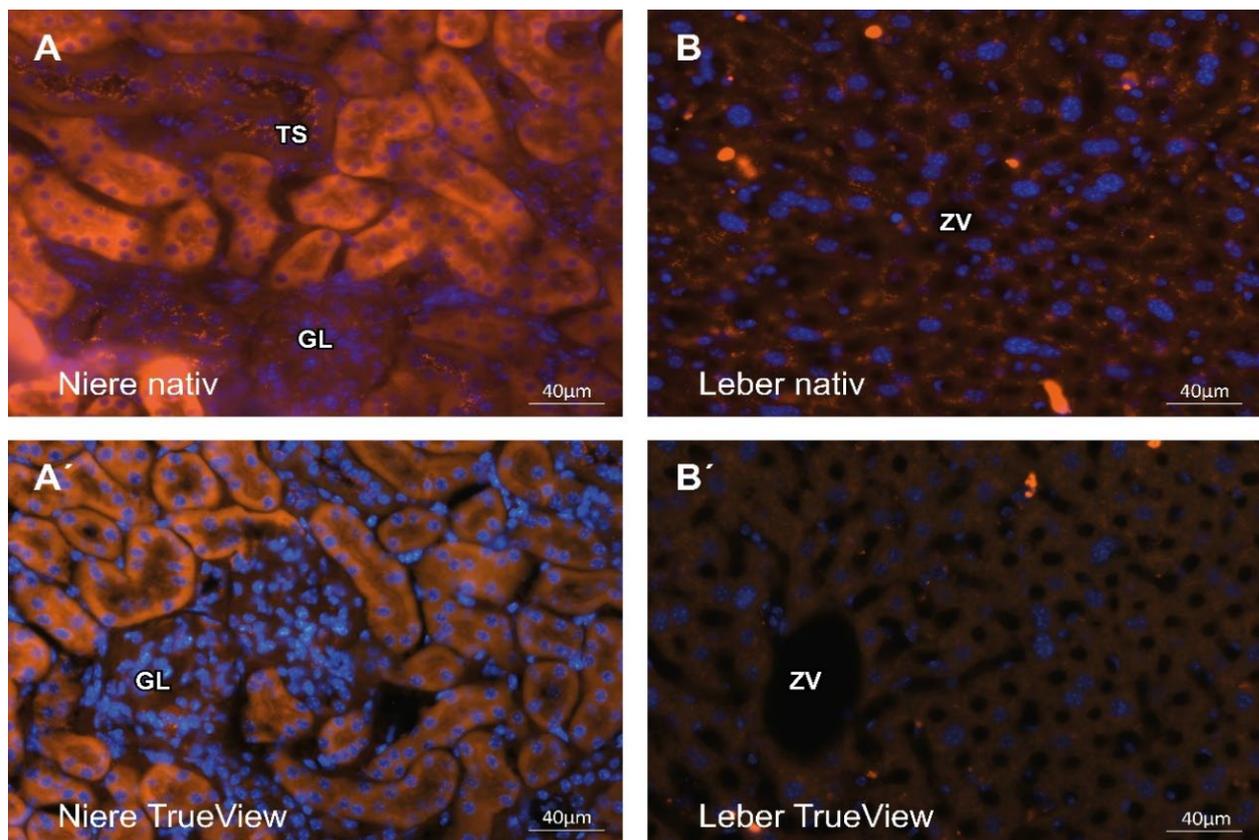


Abbildung 33: Kontrolle der Fluoreszenz von mit TrueView behandelten OT nach 180 Tagen. GL = Glomerulus, TS = Tubulussystem, ZV = Zentralvene. A + A' = Niere, B + B' = Leber, 10 µm Schnittdicke, nativ = ohne Quenchingmethoden. A'+B'= TrueView® behandelt. Alle Proben mit AK: Rabbit anti GFP (A11122) + Donkey anti Rabbit Cy3. Fluoreszenzvergleich nach 6 Monaten mit identischen Einstellungen. In A' und B' fehlen die feinen orangenen Signale in Tubulussystem und Leberbälkchen, das Präparat wirkt ausgebleicht.

3.5.6 Subzelluläre Analyse der Gewebe

Nachdem eindeutige Signale sowohl im Tubulussystem der Niere als auch im Bereich der Hepatozytenbälkchen der Leber sicher nachgewiesen werden konnten, erfolgte die genaue Analyse der Strukturen (Abbildung 34). Neben perinukleären Arealen, erscheinen Signale der Leber entlang feinsten Strukturen, möglicherweise Gallenkanälchen zwischen aneinandergrenzenden Hepatozyten (Abbildung 34 C). In der Niere erkennt man tubulär deutlich apikale, dem Lumen zugewandte Signale, welche sich von nukleär in die Peripherie ausbreiten, jedoch nicht in die basalen Bereiche der Tubulusepithelzellen vordringen. Das intrazelluläre Verteilungsmuster lässt auf eine Modifizierung durch das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat schließen, da einzelne Signalcluster sich in der Momentaufnahme perinukleär zeigen. Besonders auffallend ist die streng auf den apikalen Zellpol gerichtete Signalorientierung im proximalen Tubulussystem der Niere (Abbildung 34 A).

Aufgrund der Anordnung kann in beiden Fällen von einer Lokalisation an Grenzflächen und/oder Membranen ausgegangen werden, wie es für GPCRs charakteristisch ist. Da in beiden Kompartimenten Flüssigkeiten im Austausch mit Gewebe und extrazellulärer Matrix stehen, wären hier, neben der klassischen Rolle als Stabilisator neuronaler Synapsen (Anderson et al., 2017) und (Boucard et al., 2014), druckresponsive und/oder regulatorische Eigenschaften denkbar. Bisher konnte eine Modulation der Zellmorphologie in Zusammenhang mit Aktin durch unterschiedliche Lphn Expressionsmuster von Cruz-Ortega & Boucard, 2019 gezeigt werden.

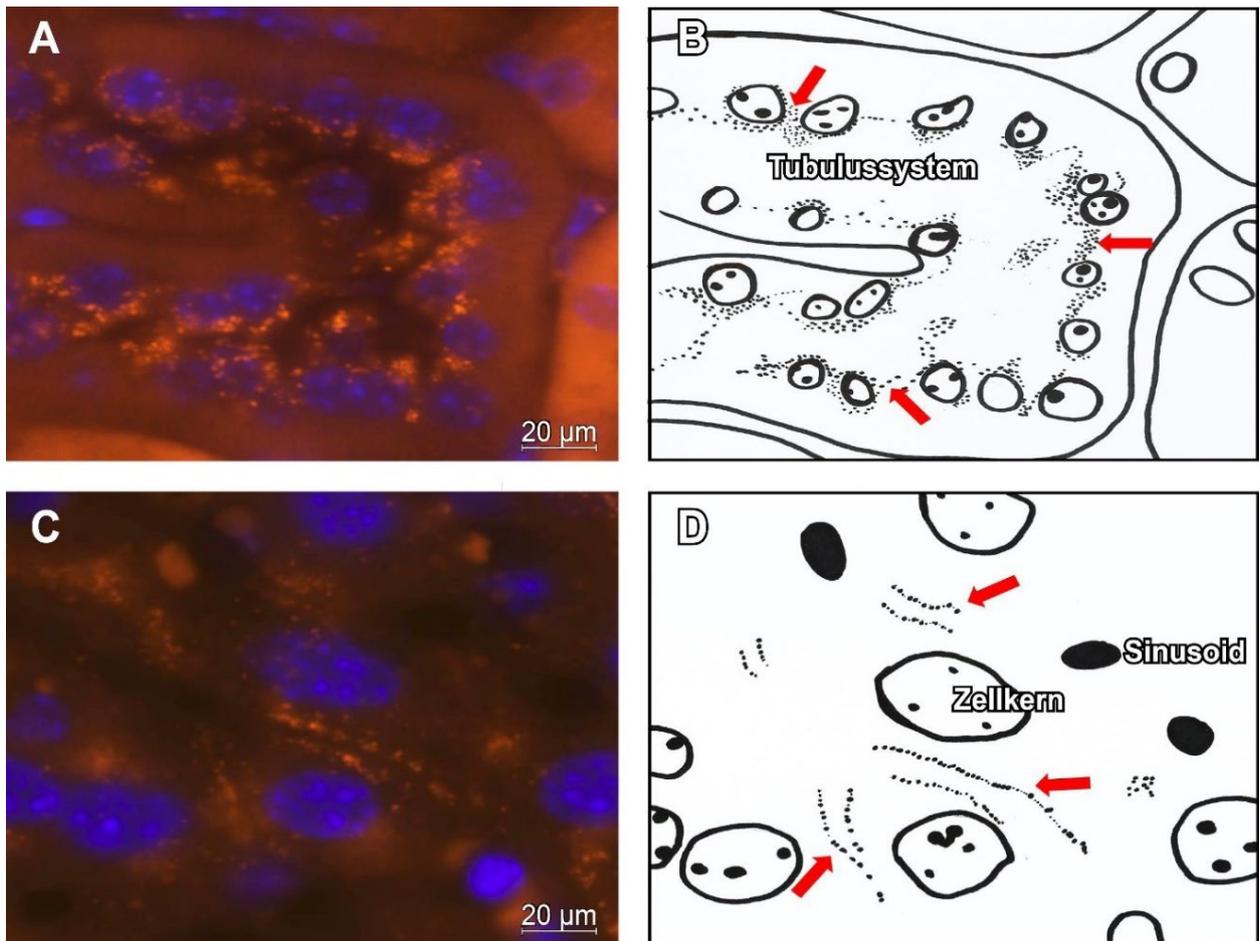


Abbildung 34: Subzelluläre Analyse einzelner Strukturen in Niere und Leber. A: Querschnitt durch das Tubulussystem der Niere B: Skizze relevanter Strukturen aus A, roter Pfeil = Lphn2-Signal entlang des Tubululumen, blau = Zellkerne der Tubulusepithelzellen. C: Querschnitt des Leberparenchyms. D: Skizze relevanter Strukturen aus C, dunkle Flächen = Lebersinusoide, blau = Hepatozytenzellkerne, roter Pfeil = Lphn2-Signal entlang der mutmaßlichen Canaliculi biliferi zwischen zwei Leberzellgrenzen.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zur Untersuchung der Lphn2 Proteinexpression im extraneuronalen Gewebe von Niere und Leber wurde der komplette Weg von DNS über RNS bis hin zum Membranprotein experimentell nachverfolgt. Zum Nachweis des mVenus Knockin im Lphn2 Gen der experimentellen Mauslinie wurden PCR Analysen durchgeführt und entsprechende Mausgewebe selektiert sowie untersucht. Die Banden im PCR Agarose Gel zeigen das Vorhandensein des modifizierten Gens (Abbildung 18). Aufbauend auf vorangegangenen Erkenntnissen eines breiten Screenings, wurde auf Hirn, Leber und Niere als vielversprechende Gewebe fokussiert. Messungen der mRNA Transkriptionsmengen von Lphn1 in Niere und Leber ergaben im Rahmen der qRT-PCR ein Verhältnis von 10:1, also 10-fach höhere Transkriptmengen im Nierengewebe. Lphn2 mRNA wurde in beiden Organen in einem Verhältnis von etwa 1:1 gemessen (Abbildung 19). Die Proteinanalytik zur Verifikation des Transkriptionsvorgangs zeigte die zu erwartenden Spaltprodukte von Proteinen in Leber-, Nieren und Gehirngewebe, wobei ein Signal im Nierengewebe hier nicht eindeutig auf gleicher Höhe identifiziert werden konnte. In Abbildung 22 zeigt sich bei etwa 100 kDa jedoch eine charakteristische Bande.

Nun wurden bereits bekannte Färbeprotokolle an Hirngewebe im Sinne des "proof of principle" nachvollzogen. Wie von Anderson et al., 2017 Anderson et al., 2017 vorbeschrieben, konnte zunächst in der Hellfeldmikroskopie eine Färbung im *Stratum lacunosum moleculare* der Cornu ammonis Region nachgewiesen werden. Neben dem Hippocampus wurden dann zwei weitere bekannte cerebrale Expressionsareale von Lphn2 der Maus (Bulbus olfactorius, Cerebellum) mit je drei eigenen Antikörperkombinationen behandelt und verglichen. Im gleichen Schritt konnte die Eignung der Antikörper, sowie deren Binde- und Signalverhalten validiert werden. In der Zusammenschau zeigt sich die Antikörperkombination: Rabbit anti GFP (A11122) + Donkey anti Rabbit Cy3 als beste Option. Eine Immunlokalisation im flottierenden Schnitt wie unter 3.5.1 beschrieben lieferte keine zufriedenstellenden Ergebnisse (Abbildung 28 und 29).

Entscheidende Fortschritte wie die Optimierung des Signal-Rausch-Verhaltes wurden über entsprechende Mikroskopeinstellung und verschiedene Substanzen zur Behandlung der Proben in einem "trial and error" Prinzip erreicht. Durch die Nachbehandlung der Objektträger mit Sudanschwarz in verschiedenen Konzentrationsstufen wurde die Fluoreszenz jedoch lediglich im gesamten Bild abgeschwächt und es entsteht der Eindruck einer Trübung anstatt einer besseren Erkennbarkeit etwaiger Signale. Bei protokollgerechter Anwendung von TrueBlack® kommt es

zu einer matten Trübung des Präparats mit nahezu vollständiger Auslöschung der Signale sowie einer Unschärfe der Strukturen, die nicht durch Mikroskopeinstellung korrigiert werden konnte.

TrueVIEW® erwies sich im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie hier als am geeignetsten und ermöglicht Signalidentifikation im Leber- und Nierenparenchym, was bisher noch nicht vorbeschrieben wurde. Im Anschluss wurde die Signalverteilung auf gesamter Organebene analysiert.

Durch die Reevaluation nach 6 Monaten konnte eine zeitliche Limitation im Umgang mit TrueVIEW® behandelten Objektträgern herausgestellt werden.

In der Übersichtsdarstellung des Nierengewebes zeigte sich die stärkste Signalintensität im Bereich des äußeren Marks. Hier befinden sich, wie in Abbildung 6 gezeigt, Anteile der Henleschleife wie proximaler Tubulus *pars recta*, Intermediärtubulus und distaler Tubulus *pars recta*. Darauf folgend erscheint die Nierenrinde mit Glomeruli etwas weniger signalintensiv und das innere Mark, welches die Sammelrohre und die Henleschleife enthält, weitgehend ohne Fluoreszenzsignal.

In der Übersichtsdarstellung des Leberparenchyms ist keine Signalalteration von zentral bis zur Leberkapsel hin zu erkennen. Innerhalb eines Leberläppchens mit Zentralvene treten Signale entlang der aneinandergrenzenden Hepatozyten hervor, welche durch ihren histologischen Aufbau die Canaliculi biliferi bilden.

Beide Phänomene wurden schließlich in subzellulärer Analyse mit starker Vergrößerung genauer untersucht. Hierbei konnten, aufgrund der Anordnung und des Verteilungsmusters, mutmaßlich immer dem Lumen zugewandte, membranständige Signale vor allem im Tubulusapparat der Niere und entlang kleinster Kanälchen innerhalb des Leberparenchyms identifiziert werden. Aufgrund der Dreidimensionalität können im Anschnitt Signalverläufe zwar nur abschnittsweise, jedoch ausreichend genau nachverfolgt werden.

Somit konnte das in 3.3 beschriebene Lphn2 mVenus Fusionsprotein in Nieren- und Lebergewebe per Fluoreszenzmikroskopie mit bis zu 40facher Vergrößerung sicher nachgewiesen werden, was bisher nicht beschrieben wurde.

4.2 Kontrollen und Genauigkeit der diagnostischen Methoden

Wie auch in dieser Arbeit vorgegangen wurde, empfiehlt es sich, das zu untersuchende Protein, sofern möglich, von seiner Entstehung aus zu nachzuvollziehen. Zunächst sollte das Vorhandensein des vermuteten DNS-Abschnitts z.B. mittels PCR-Analyse (englisch: polymerase chain reaction, PCR) bestätigt werden. Es wäre auch möglich, die sogenannte In situ-Hybridisierung zu nutzen, um spezifische DNS oder auch RNS in Zielzellen nachzuweisen. Hierbei werden spezifische Sonden verwendet, die komplementär zu der zu erfassenden DNS- oder RNS-Sequenz sind. Optional können diese Sonden auch mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder einer radioaktiven Markierung versehen werden. Finden diese Sonden nun ihre komplementäre Sequenz lagern sie sich in einem Hybridisierungsschritt (Erhitzen und anschließendes Abkühlen) an und sind dann mit geeignetem Detektor nachweisbar, was das Vorhandensein der Zielsequenzen beweist (Fischer et al., 1997)

Als weitere mögliche Kontrollmethode kann ein Western Blot, oder auch Immunoblot eingesetzt werden. Mit dieser Methode ist es möglich die erwarteten Proteine auf einer Membran sichtbar zu machen und sogar ihre Größe und Menge in einem Verhältnis zu bestimmen. Zunächst werden die zu untersuchenden Proteine aus einer Gewebeprobe extrahiert, typischerweise durch Zerstörung der Zellen und anschließende Auftrennung der Proteine mittels Gel-Elektrophorese. Die Proteine werden aufgrund ihrer Größe in diesem Schritt getrennt.

Nach der Elektrophorese werden die Proteine aus dem Gel auf eine Membran (normalerweise eine Nitrocellulosemembran) übertragen. Dieser Schritt ermöglicht die Fixierung der Proteine in ihrer räumlichen Verteilung auf der Membran und macht sie für Antikörper zugänglich. Um unspezifische Bindungen zu minimieren, wird die Membran in einer Lösung blockiert, die normalerweise ein Protein wie BSA oder Milchpulver enthält. Dies verhindert, dass Antikörper unspezifisch an die Membran binden.

Die Membran wird mit einem spezifischen Primärantikörper inkubiert, der gegen das Protein gerichtet ist, das nachgewiesen werden soll. Der Primärantikörper bindet spezifisch an das Zielprotein. Überschüssige Primärantikörper werden durch mehrere Waschschriffe entfernt, um unspezifische Bindungen zu minimieren.

Die Membran wird mit einem Sekundärantikörper inkubiert, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist und normalerweise mit einem Reporter-Molekül (z.B. Enzym, Fluoreszenz wie in 1.4) markiert ist. Dieser Schritt ermöglicht die Detektion des Primärantikörpers beispielsweise mit enzymatischer Reaktion oder einer Fluoreszenzreaktion. Das resultierende Signal wird fotografiert oder mit einem Scanner gescannt, wodurch die Positionen der Zielproteine sichtbar

wird. Durch Vergleich mit einem Marker können die Größe und die Konzentration der Zielproteine bestimmt werden.

Um höhere Spezifitäten zu erreichen, also um nur solche Ziele zu erkennen, welche auch erkannt werden sollen, sodass die Rate der falsch positiven Ergebnisse möglichst gering bleibt, bedient man sich verschiedener Kontrollverfahren.

Das Wichtigste ist die Kontrolle ohne Primärantikörper. Sie besteht darin, Gewebeprobe oder Zellen mit allen Reagenzien zu behandeln, außer dem Hauptantikörper. So wird festgestellt, ob die detektierten Signale tatsächlich auf das Vorhandensein des zu untersuchenden Proteins zurückzuführen sind und nicht auf unspezifische Bindungen oder Hintergrundsignale.

Weiter ist die positive Kontrolle zu erheben, sie beinhaltet die Verwendung von Proben, bei denen sicher das zu untersuchende Protein vorhanden ist, was dazu dient die Funktionalität der eingesetzten Methode zu bestätigen. Die in dieser Arbeit eingesetzte Lphn2-Reportermaus wie in 2.1.9 und 2.2.1 aus (Anderson et al., 2017) besitzt nachweislich entsprechende DNS und RNS, außerdem wurde der GFP-Antikörper und der rabbit A-11122 wie in 2.1.8 bereits erfolgreich in Gehirngewebe dieser Maus eingesetzt.

In der Konsequenz sollte in Geweben in denen das Zielepitop nicht vorkommt kein Signal vorkommen, bzw, sind etwaige Signale hier als unspezifisch oder Hintergrundsignal anzusehen. Kontrollen in dieser Arbeit verfügen auf genetischer Basis nicht über entsprechende Eigenschaften, was einer Negativkontrolle entspricht.

Schlussendlich ist in der Kontrastkontrolle für die Fluoreszenzmikroskopie wichtig sicherzustellen, dass der Kontrast und die Helligkeit der Bilder korrekt eingestellt wird, um die Signale angemessen zu visualisieren. Bei der Einstellung der Belichtungsdauer sollte die Belichtung für schwache Signale länger sein, während für starke Signale eine kürzere Belichtung ausreicht. Jeder Fluoreszenzkanal (z.B. GFP, DAPI, Cy3) muss am Fluoreszenzmikroskop entsprechend angepasst werden (siehe auch Tabelle 3.4.). Ferner wurde die Färbung der Zellkerne mit einem nukleären Farbstoff (DAPI = 4',6-Diamidino-2-phenylindol) vorgenommen, um die Position der Zellkerne zu identifizieren und die räumliche Verteilung der Färbung zu beurteilen. Darüber hinaus bietet der Farbkontrast blau/orange, blau/grün, blau/gelb zusätzliche Trennschärfe.

4.2.1 Signal-Rausch-Verhältnis

Zahlreiche zelluläre Moleküle besitzen eine Autofluoreszenz – auch Eigenfluoreszenz oder Primärfluoreszenz genannt. Die Autofluoreszenz im Präparat kann das Fluoreszenzsignal der Markersubstanz (z.B. Fluoreszenzantikörper) überlagern und verändern, sodass spezifische Signale schwer detektiert werden können. Fixierungs- und Präparationsverfahren können Fluoreszenzeigenschaften endogener Moleküle stark verändern. Im Zusammenhang mit dem hier behandelten Themengebiet wurden speziell in Cerebellumschnitten die Identifikation von Signalen durch fluoreszierende Lipofuscingranula erschwert. Die Qualität der Signale in Niere und Leber wurde durch eine Reihe von Versuchen mit True Black Lipofuscin Autofluorescence Quencher (Biotium Inc., USA), True View Autofluorescence Quencher (Vector Labs, USA) und Sudan Black B (Sigma Aldrich, Deutschland) untersucht. Quenching bedeutet, dass beim Übergang der Elektronen, von hohen Anregungsniveaus in den Grundzustand, die Energie nicht in Form von Licht (als Fluoreszenz) freigesetzt wird, sondern auf andere Moleküle (Quencher) übertragen wird oder als Wärme verloren geht. Dies kann durch Bildung von Komplexen oder durch häufige Zusammenstöße von Molekülen geschehen. In dieser Arbeit wurden bei immunhistochemischen Färbungen, endogene Peroxidasen mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) behandelt, um die Aktivität bei darauffolgenden Färbemethoden zu minimieren. Die in den Versuchen verwendete „Blocking Solution“ wurde auf ihre endogene Peroxidaseaktivität getestet und es konnte keine Farbreaktion festgestellt werden. Weitere Ansätze, wie z.B. Photobleaching und konfokale Mikroskopie wurden in Erwägung gezogen.

4.3 Grenzen der Forschung

Obwohl das menschliche Genom drei Latrophilin-Homologe enthält, (Sugita et al., 1998), fokussiert sich diese Arbeit auf den Lphn2-Rezeptor in der Maus aufgrund seiner verbreiteten Präsenz in extraneuronalen Geweben (Anderson et al., 2017). Es wurden Antikörper eingesetzt, welche das in den Lphn2 DNS-Abschnitt der Mäuse eingefügte mVenus-Tag-kodierende Proteinepitop erkennen. Eine Detektion des naiven Rezeptors durch Antikörper war im hier dargestellten Versuchsaufbau nicht möglich und wurde bis zum Zeitpunkt dieser Arbeit nur über genetisch veränderte Mauslinien indirekt mit entsprechenden Antikörpern realisiert. Das Bindeverhalten der bereits in vorherigen Arbeiten genutzten Antikörper wurde zuvor durch Wiederholung bekannter erfolgreicher Experimente validiert. Die Immunlokalisation im Cerebellum zeigt bei allen drei AK Kombinationen scheinbar sogar mehr Signal im *Stratum moleculare* der Kontrollen (Abbildung 27 B, D, F). Hier ist jedoch von einem vermehrten Hintergrundsignal durch Lipofuscingranula auszugehen. Dies sind Oxidationsprodukte ungesättigter Fettsäuren, welche vor allem in Purkinjezellen von Säugetieren vorkommen und eine starke Autofluoreszenz aufweisen (Di Guardo, 2015). Aufgrund der Anfälligkeit für Störsignale ist dieser Bereich zur Verifikation der Antikörper und auch des Lphn2 mVenus Signals ungeeignet. Im Rahmen der Praktikabilität und Wirtschaftlichkeit wurden zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses drei chemische Quenchingpräparate und deren Nutzungsverfahren etabliert. Aufgrund von Aufhellungseffekten während der Fluoreszenzmikroskopie konnte TrueBlack® Lipofuscin Autofluorescence Quencher von Biotium Inc. nicht weiterverwendet werden und ist für diesen speziellen Bereich ungeeignet. Weitere Optionen wie Photoquenching wurden diskutiert. Zuletzt konnte nur TrueVIEW® (Vectorlabs) erfolgreich umgesetzt werden. In den Experimenten 3.5.5 sind mit TrueVIEW® behandelte Schnittpräparate mit der Antikörperkombination: rabbit anti-GFP (A11122) + donkey anti rabbit Cy3 nach 180 Tagen ausgebleicht und konnten trotz sorgfältiger Aufbewahrung nicht erneut zufriedenstellend mikroskopiert werden, was eine relative zeitliche Limitation darstellt. Es empfiehlt sich also behandelte Objektträger einer Versuchsreihe zügig zu mikroskopieren und zu dokumentieren, um nicht einem etwaigen unbemerkten Signalverlust zu erliegen.

Gemeinsam mit den etablierten Methoden konnten Signale sichtbar gemacht und bis auf eine 40-fache Vergrößerung des Zeiss Plan Achromat Objektivs visuell dargestellt werden. Ultimativ wurde sich nach der Proteinanalytik rein auf visuelle Signalverfolgung und Interpretation gestützt, was ohne Fluoreszenz in dieser Form nicht möglich gewesen wäre. Die Optionen der Hellfeldmikroskopie, wie z.B. Immunhistochemie, konnten nur Anhaltspunkte in Übersichtsdarstellungen liefern, ermöglichten jedoch keine genauere Analyse einzelner Signale.

Immunlokalisation im flottierenden Schnitt mit großer Schnittdicke (100 µm) und 24 h Antikörperbehandlung in Wellplatten wie in 3.5.1, erwies sich als nicht zielführend. Im speziellen Versuchsaufbau sollte durch das dreidimensionale Flottieren in der Lösung auf einem oszillierenden Schüttler über einen längeren Zeitraum eine verbesserte Zugänglichkeit des Epitops geschaffen werden. Obwohl das in der Theorie überzeugende Verfahren sorgfältig und technisch einwandfrei durchgeführt wurde, konnte keine der drei Antikörperkombinationen zufriedenstellend ausgewertet werden. In der Mikroskopie der Immunfluoreszenz stellen sich die Ebenen überlagert dar und es entsteht ein unscharfer Bildeindruck ohne sichere Identifikationsmöglichkeiten.

Während für die genaue Lokalisation und Verteilung im subzellulären Gewebe die Konfokalmikroskopie möglicherweise noch genauere Bilddaten geliefert hätte, wurde aus Gründen der Verfügbarkeit und Wirtschaftlichkeit die Fluoreszenzmikroskopie favorisiert. In einer Abwägung des Aufwand-Nutzen-Verhältnisses konnten auch so detaillierte Daten gewonnen - und Laborressourcen optimal genutzt werden.

4.4 Vorschläge für zukünftige Forschung / Ausblick

Die Lokalisation von Lphn2 in extraneuronalen Geweben wie Niere und Leber eröffnet neue Einblicke in die Forschung dieses Bereichs. Abbildung 35 zeigt die fehlende Datenlage bezüglich Lphn im Bereich „Digestive system“ und „Urinary system“ 2015. Wie in 1.2 erwähnt, konnten einige Felder durch jüngste Forschung vervollständigt werden. Da der Rezeptor in unterschiedlichen Geweben jenseits von Neuronen exprimiert wird, sollte weiterhin eine Orientierung über seine neuronale Relevanz hinweg stattfinden, hier sind besonders spezielle Spleißvarianten wie z.B. Lphn3 in pankreatischen Inselzellen von Interesse. Untersuchungen aus der vorangegangenen Arbeit von Simon Zaffalon und der vorliegenden konnten den Lphn2 Rezeptor nun zumindest auch histologisch in Zunge, Leber und Niere nachweisen. Potentiell relevante Mengen mRNA konnten in der Arbeit von Simon Zaffalon außerdem in Retina, Zunge, Herz, Gehirn, Rückenmark, Leber und Niere nachgewiesen werden was in der Zusammenschau für den multifunktionalen Charakter dieser Rezeptoren spricht. Abbildung 35 zeigt eine Übersicht der bisher erforschten Organsysteme aller 3 ADGRL Gene ("Lphn1-3") aus einem Review von 2015 (Hamann et al., 2015)

Subfamily	I				II				III				IV				V				VI				VII				VIII				IX			
Gene	ADGRL1 (LPHN1)	ADGRL2 (LPHN2)	ADGRL3 (LPHN3)	ADGRL4 (LPHN4)	ADGRE1 (EMR1)	ADGRE2 (EMR2)	ADGRE3 (EMR3)	ADGRE4 (EMR4)	ADGRES (CD97)	ADGRA1 (GPR123)	ADGRA2 (GPR124)	ADGRA3 (GPR125)	ADGRC1 (CELSR1)	ADGRC2 (CELSR2)	ADGRC3 (CELSR3)	ADGRD1 (GPR133)	ADGRD2 (GPR144)	ADGRF1 (GPR110)	ADGRF2 (GPR111)	ADGRF3 (GPR113)	ADGRF4 (GPR115)	ADGRF5 (GPR116)	ADGRB1 (BAI1)	ADGRB2 (BAI2)	ADGRB3 (BAI3)	ADGRG1 (GPR56)	ADGRG2 (GPR64)	ADGRG3 (GPR97)	ADGRG4 (GPR112)	ADGRG5 (GPR114)	ADGRG6 (GPR126)	ADGRG7 (GPR128)	ADGRAV1 (VLGR1)			
Function																																				
Cellular/systemic																																				
Mol/Cell																																				
Cell size, shape control, and cytoskeleton																																				
Planar polarity																																				
Adhesion and migration																																				
Cell cycle, death, and differentiation																																				
Organ-specific																																				
Hematopoietic system and immunity																																				
Cardiovascular system																																				
Respiratory system																																				
Digestive system																																				
Urinary system																																				
Endocrine system and metabolism																																				
Reproductive system																																				
Musculoskeletal system																																				
Skin																																				
Nervous system and behavior																																				
Sensory organs																																				
Clin																																				
Developmental defects/disorders																																				
Tumorigenesis																																				

Human EMR4 is a pseudogene (Hamann et al., 2003; Caminschi et al., 2006). Mol/Cell, molecular/cellular; Clin, clinical

unknown
assumed
shown

Abbildung 35: Funktionelle Beteiligung von Adhäsions-GPCRs an verschiedenen Organsystemen. Zusammenfassung verfügbarer, veröffentlichter Daten aus Menschen- und Mausmodellen, *in vitro* und *in vivo*. Grauer Kasten = Lphn 1,2,3. Für Lphn2 konnten Beteiligungen an Nervensystem und Verhalten, Zellzyklus, -tot, und -differenzierung sowie Teile des kardiovaskulären Systems gezeigt werden. Angenommen wird auch eine Lphn3 Beteiligung an Tumorentstehung (Hamann et al., 2015).

Latrophiline haben einzigartige Eigenschaften innerhalb der GPCR-Superfamilie da sie strukturelle Eigenschaften von Adhäsionsmolekülen und Mediationseigenschaften von Zell-Zell oder Zell-Matrix Kontakten mit nach intrazellulär gerichteter G-Protein vermittelter Signalweiterleitung kombinieren (Monk et al., 2015). Wie hier gezeigt werden konnte, ist der Lphn2-Rezeptor u.a. wie für aGPCRs üblich, auch extraneuronal an Membranen lokalisiert, speziell dort, wo verschiedene Kompartimente und Milieus voneinander getrennt werden. Hier ist über den Signalweg und spezielle endogene Liganden bisher wenig bekannt. Mehrere putative Liganden wurde im Laufe der Jahre beschrieben, was zu der Vorstellung führte, dass die Rezeptoren hauptsächlich mit zellulären und extrazellulären Matrixliganden interagieren, im Gegensatz zu anderen GPCR-Klassen, die hauptsächlich mit kleinen Molekülen oder Peptiden interagieren (Langenhan et al., 2013). Jüngst wurden jedoch weitere Hypothesen veröffentlicht, wobei ein gebundener Agonist innerhalb des Rezeptors selbst, genauer im C-terminalen Fragment, für eine Aktivierung verantwortlich ist, was jedoch zunächst das Entfernen des N-terminalen Fragments erfordert um den Agonisten „frei zu legen“. Hierbei handelt es sich um die sogenannte „Stachel“ Sequenz, welche dann als Peptidligand eine Signalweiterleitung in Gang setzt (Liebscher et al., 2022). Wenn es gelingt die Stachelsequenz als synthetisch hergestellten Liganden einzusetzen, können dann die Rezeptorfunktion und potenzielle therapeutische Ansätze weiter entschlüsselt werden.

Lphn3 Spleißvarianten regulieren die Insulinsekretion aus pankreatischen Inselzellen durch die Reduktion von intrazellulärem cAMP über einen inhibitorische G-Protein Weg (Röthe et al., 2019). Analog hierzu könnten renale Tubulusepithelzellen oder Cholangiozyten ebenfalls Modulation des Zellstoffwechsels vornehmen was in Anbetracht der Verteilung von Lphn2 in Niere oder Leber plausibel erscheint.

Weitere Forschung zeigt den Zusammenhang mit Modulation der Endothelzell-zu-Zell- und Zell-zu-Extrazelluläre Matrix (ECM)-Adhäsion, sowie Zelloberflächenaufbau und Barrierefunktion in Blutgefäßen, was für onkologische Szenarien wie z.B. Umstände bei Tumoraussaat/Metastasierung relevant sein könnte (Camillo et al., 2021). Ferner sind Endothelzellen und Endothelzellkontakte auch relevante Strukturen endovaskulärer Therapieansätze wie Gefäßstents, „Drug-eluting Balloons“ und Pharmakotherapie im Bereich der Thrombozytenaggregationshemmung und Adhäsion. In entsprechenden Modellen, z.B. nach Applikation von Druck auf die Gefäßwand, lokal applizierter Medikamente oder selektivem ausschalten/inaktivieren des Rezeptors, könnten hier weitere Therapieansätze im Bereich der Gefäßmedizin gewonnen werden, wenn eine gleichartige Lokalisation des Rezeptors, wie in dieser Arbeit demonstriert wurde, auch auf Gefäße übertragbar ist.

Zelluläre Erweiterungen sowie Kontaktstellen, die in allen Säugetierzellen vorkommen, benötigen für ihre Bildung Elemente des Aktin-Zytoskeletts (Rich & Terman, 2018). Möglicherweise stellt eine Dysfunktion des Rezeptors, seines Gens oder eines speziellen Signalweges - ferner auch das Fehlen spezieller Liganden, eine Ursache für organbezogene Bindegewebserkrankungen (Fibrosen), Epithelzellkarzinomentstehung oder Metastasierungsprozesse aufgrund der gestörten Barrierefunktion dar.

In Vorarbeiten von Scholz et al., 2015 konnte das Latrophilin-Homolog in *Drosophila melanogaster* als wichtiger Faktor der Mechanosensorik identifiziert werden. Duckverhältnisse und deren Änderungen, wie sie durch Ultrafiltration in Leber (Galle) und Nierenparenchym (Primärharn) vorkommen, können als mechanische Reize gelten. Zusammenhänge mit zellulären Umbaumechanismen sowie deren Signalwegen bei Leberzirrhose, portaler Hypertension oder arterieller Hypertonie könnten auf dieser Basis weiter untersucht werden.

Als praktisch durchführbare Experimente könnten z.B. in Mäusen hypertensive Episoden mit konstant erhöhten Blutdruckwerten medikamentös provoziert und Auswirkungen auf die Lphn2 Expression im Nierenparenchym sowie dazugehörige Proteinanalytik beobachtet werden. Ein etabliertes Verfahren ist das Angiotensin-II-Mausmodell für Aortenaneurysmen in Wortmann et al., 2020, welches entsprechend modifiziert werden könnte. Hierbei wird über eine subkutan implantierte osmotische Pumpe, die kontinuierliche Applikation verschiedenster Substanzen über einen bestimmten Zeitraum erlaubt. Eine andere Option findet sich auf der Internetseite der Firma PreSens: Überprüfung der mikrovaskulären Perfusion in der Mausniere mit dem VisiSens™ System. Hier wird mittels U-förmigem Edelstahlclip die Nierenarterie in der Maus verengt. In der Folge erhöht sich die zirkulierende Menge von Angiotensin II, welches dann wieder für einen Anstieg des Blutdrucks verantwortlich ist.

Komplementär wäre es möglich, die Experimente dieser Arbeit an Mäusen mit Fettlebererkrankung oder Leberzirrhose (z.B. durch hochkalorische Ernährung) und konsekutiver portaler Hypertension durchzuführen. Einen Überblick über die etablierten Mausmodelle in Zusammenhang mit Leberfibrose gibt Yanguas et al., 2016. Hier besteht bereits ein Potpourri an experimentellen Ansätzen, z.B. chemisch, Diät-basiert (wie erwähnt) oder chirurgisch. Als weit verbreitet, gilt die intraperitoneale Injektion von Tetrachlormethan zur Induktion einer Leberfibrose in Nagern (Yanguas et al., 2016).

Ein Problem bei der Untersuchung von Lphn2 knock-out Mäusen ist ihre embryonale Letalität (Anderson et al., 2017). In einem Experiment könnte jedoch durch Genmanipulation der Lphn2 Rezeptor zellspezifisch ausgeschaltet werden, um etwaige Auswirkungen auf System- oder Organebene eines Organismus zu detektieren, sofern Überlebensfähigkeit des Tiers besteht.

Dies ist beispielsweise durch Nestin-Cre vermittelte Deletion in Nervenzellen erreicht worden (Anderson et al., 2017). Hier wären neben histologischen und anatomischen Auswirkungen auch *in vivo* Diagnostiken der Maus z.B. in der Form von Blutanalysen (Entnahme submandibulär, retrobulbär oder über die Schwanzvene) denkbar. Das Augenmerk könnte hier auf in der Humanmedizin verwendete Parameter wie Glomeruläre Filtrationsrate (GFR), Kreatinin, Cystatin C, Bilirubin, Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) oder Gamma-Glutamyltransferase (Gamma-GT) gerichtet werden.

Additiv könnte diese Arbeit durch Konfokalmikroskopie des Rezeptors in seinen entsprechenden Kompartimenten ergänzt werden. In diesem Zusammenhang könnte dann das Signal Rausch Verhältnis verbessert und die Lokalisation und Verteilung noch genauer aufgeschlüsselt werden.

5 Literaturverzeichnis

- Anderson, G. R., Maxeiner, S., Sando, R., Tsetsenis, T., Malenka, R. C., & Südhof, T. C. (2017a). Postsynaptic adhesion GPCR latrophilin-2 mediates target recognition in entorhinal-hippocampal synapse assembly. *Journal of Cell Biology*, *216*(11), 3831–3846. <https://doi.org/10.1083/jcb.201703042>
- Bjarnadóttir, T. K., Fredriksson, R., Höglund, P. J., Gloriam, D. E., Lagerström, M. C., & Schiöth, H. B. (2004). The human and mouse repertoire of the adhesion family of G-protein-coupled receptors. *Genomics*, *84*(1), 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2003.12.004>
- Boucard, A. A., Maxeiner, S., & Südhof, T. C. (2014a). Latrophilins function as heterophilic cell-adhesion molecules by binding to teneurins: Regulation by alternative splicing. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(1), 387–402. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.504779>
- Camillo, C., Facchinello, N., Villari, G., Mana, G., Gioelli, N., Sandri, C., Astone, M., Tortarolo, D., Clapero, F., Gays, D., Oberkersch, R. E., Arese, M., Tamagnone, L., Valdembrì, D., Santoro, M. M., & Serini, G. (2021). LPHN2 inhibits vascular permeability by differential control of endothelial cell adhesion. *Journal of Cell Biology*, *220*(11). <https://doi.org/10.1083/jcb.202006033>
- Chen, F., Venugopal, V., Murray, B., & Rudenko, G. (2011). The structure of neurexin 1 α reveals features promoting a role as synaptic organizer. *Structure*, *19*(6), 779–789. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.03.012>
- Cruz-Ortega, J. S., & Boucard, A. A. (2019). Actin cytoskeleton remodeling defines a distinct cellular function for adhesion G protein-coupled receptors ADGRL/latrophilins 1, 2 and 3. *Biology Open*, *8*(4), 1–11. <https://doi.org/10.1242/bio.039826>
- Davletov, B. A., Meunier, F. A., Ashton, A. C., Matsushita, H., Hirst, W. D., Leliana, V. G., Wilkin, G. P., Dolly, J. O., & Ushkaryov, Y. A. (1998). Vesicle exocytosis stimulated by α -latrotoxin is mediated by latrophilin and requires both external and stored Ca²⁺. *EMBO Journal*, *17*(14), 3909–3920. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.14.3909>
- di Guardo, G. (2015). Lipofuscin, lipofuscin-like pigments and autofluorescence. *European Journal of Histochemistry*, *59*(1), 1–2. <https://doi.org/10.4081/ejh.2015.2485>
- Fischer, K., Bentz, M. & Döhner, H. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). *Med. Klin.* *92*, 279–283 (1997). <https://doi.org/10.1007/BF03045083>

- Flajnik, M. F., Deschacht, N., & Muyldermans, S. (2011). A case of convergence: Why did a simple alternative to canonical antibodies arise in Sharks and Camels? *PLoS Biology*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001120>
- G.G.Stokes. (1852). The following researches originated in a consideration of the very remarkable phenomenon discovered by. *Philos.Trans.R.Soc.London*, 142(June 1848), 463–562.
- Gorio, A., Hurlbut, W. P., & Ceccarelli, B. (1978). Acetylcholine compartments in mouse diaphragm: Comparison of the effects of black widow spider venom, electrical stimulation, and high concentrations of potassium. *Journal of Cell Biology*, 78(3), 716–733. <https://doi.org/10.1083/jcb.78.3.716>
- Grasso, A., & Senni, M. I. (1979). A Toxin Purified from the Venom of Black Widow Spider Affects the Uptake and Release of Radioactive γ -Amino Butyrate and N-Epinephrine from Rat Brain Synaptosomes. In *Eur. J. Biochem* (Vol. 102).
- Hamann, J., Aust, G., Araç, D., Engel, F. B., Formstone, C., Fredriksson, R., Hall, R. A., Harty, B. L., Kirchhoff, C., Knapp, B., Krishnan, A., Liebscher, I., Lin, H. H., Martinelli, D. C., Monk, K. R., Peeters, M. C., Piao, X., Prömel, S., Schöneberg, T., ... Schiöth, H. B. (2015). International union of basic and clinical pharmacology. XCIV. adhesion G protein-coupled receptors. *Pharmacological Reviews*, 67(2), 338–367. <https://doi.org/10.1124/pr.114.009647>
- Holz, G. G., & Habener, J. F. (1998). Black widow spider α -latrotoxin: A presynaptic neurotoxin that shares structural homology with the glucagon-like peptide-1 family of insulin secretagogic hormones. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 121(2), 177–184. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(98\)10088-3](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(98)10088-3)
- Jackson, V. A., Del Toro, D., Carrasquero, M., Roversi, P., Harlos, K., Klein, R., & Seiradake, E. (2015). Structural basis of latrophilin-FLRT interaction. *Structure*, 23(4), 774–781. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.01.013>
- Janicki, P. K., & Habermann, E. (1983). Tetanus and Botulinum Toxins Inhibit, and Black Widow Spider Venom Stimulates the Release of Methionine-Enkephalin-Like Material In Vitro. *Journal of Neurochemistry*, 41(2), 395–402. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1983.tb04755.x>
- Kendall, J. M., & Badminton, M. N. (1998). *Aequorea victoria* bioluminescence moves into an exciting new era. *Trends in Biotechnology*, 16(5), 216–224. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01184-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01184-6)

- Krasnoperov, V. G., Beavis, R., Chepurny, O. G., Little, A. R., Plotnikov, A. N., & Petrenko, A. G. (1996). The Calcium-Independent Receptor of α -Latrotoxin Is Not a Neurexin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 227(3), 868–875. <https://doi.org/10.1006/BBRC.1996.1598>
- Langenhan, T., Aust, G., & Hamann, J. (2013). *Sticky Signaling-Adhesion Class G Protein-Coupled Receptors Take the Stage*. www.SCIENCESIGNALING.org
- Langenhan, T., Prömel, S., Mestek, L., Esmaeili, B., Waller-, H., Hennig, C., Kohara, Y., Avery, L., Vakonakis, I., & Russ, A. P. (2009). *NIH Public Access*. 17(4), 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.08.008>.Latrophilin
- Langenhan, T., Prömel, S., Mestek, L., Esmaeili, B., Waller-Evans, H., Hennig, C., Kohara, Y., Avery, L., Vakonakis, I., Schnabel, R., & Russ, A. P. (2009). Latrophilin Signaling Links Anterior-Posterior Tissue Polarity and Oriented Cell Divisions in the *C. elegans* Embryo. *Developmental Cell*, 17(4), 494–504. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.08.008>
- Levoye, A., Dam, J., Ayoub, M. A., Guillaume, J. L., & Jockers, R. (2006). Do orphan G-protein-coupled receptors have ligand-independent functions? New insights from receptor heterodimers. *EMBO Reports*, 7(11), 1094–1098. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400838>
- Liebscher, I., Schöneberg, T., & Thor, D. (2022). Stachel-mediated activation of adhesion G protein-coupled receptors: insights from cryo-EM studies. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 7, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01083-y>
- Liu, M., Zhang, J., & Liu, C. (2018). Clinical efficacy of recombinant human latrophilin 3 antibody in the treatment of pediatric asthma. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(1), 539–547. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5376>
- Longenecker, H. E., Hurlbut, W. P., Mauro, A., & Clark, A. W. (1970). Effects of black widow spider venom on the frog neuromuscular junction: Effects on end-plate potential, miniature end-plate potential and nerve terminal spike. *Nature*, 225(5234), 701–703. <https://doi.org/10.1038/225701a0>
- Lu, Y. C., Nazarko, O. v., Sando, R., Salzman, G. S., Südhof, T. C., & Araç, D. (2015). Structural Basis of Latrophilin-FLRT-UNC5 Interaction in Cell Adhesion. *Structure*, 23(9), 1678–1691. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.06.024>
- Matsushita, H., Lelianova, V. G., & Ushkaryov, Y. A. (1999). The latrophilin family: Multiply spliced G protein-coupled receptors with differential tissue distribution. *FEBS Letters*, 443(3), 348–352. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00005-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00005-8)

- Meza-Aguilar, D. G., & Boucard, A. A. (2014a). Latrophilins updated. In *Biomolecular Concepts* (Vol. 5, Issue 6, pp. 457–478). De Gruyter Mouton. <https://doi.org/10.1515/bmc-2014-0032>
- Monk KR, Hamann J, Langenhan T, Nijmeijer S, Schöneberg T, Liebscher I. Adhesion G Protein-Coupled Receptors: From In Vitro Pharmacology to In Vivo Mechanisms. *Mol Pharmacol*. 2015 Sep;88(3):617-23. doi: 10.1124/mol.115.098749.
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E. et al. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* 20, 87–90 (2002). <https://doi.org/10.1038/nbt0102-87>
- Nicholls, D. G., Rugolo, M., Scott, I. G., & Meldolesi, J. (1982). α -Latrotoxin of black widow spider venom depolarizes the plasma membrane, induces massive calcium influx, and stimulates transmitter release in guinea pig brain synaptosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(24 I), 7924–7928. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.24.7924>
- Niku, M., Pessa-Morikawa, T., Taponen, J., & Iivanainen, A. (2007). Direct observation of hematopoietic progenitor chimerism in fetal freemartin cattle. *BMC Veterinary Research*, 3. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-3-29>
- Nourry, C., Grant, S. G. N., & Borg, J.-P. (2015). *PDZ Domain Proteins: Plug and Play!* Downloaded from www.stke.org/cgi/content/full/sigtrans;2003/179/re7<http://stke.sciencemag.org/>
- Pierce, K. L., Premont, R. T., & Lefkowitz, R. J. (2002). Seven-transmembrane receptors. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 3, Issue 9, pp. 639–650). <https://doi.org/10.1038/nrm908>
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., & Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111(2), 229–233. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90691-H](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90691-H)
- Prömel, S., Frickenhaus, M., Hughes, S., Mestek, L., Staunton, D., Woollard, A., Vakonakis, I., Schöneberg, T., Schnabel, R., Russ, A. P., & Langenhan, T. (2012). The GPS Motif Is a Molecular Switch for Bimodal Activities of Adhesion Class G Protein-Coupled Receptors. *Cell Reports*, 2(2), 321–331. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.06.015>
- Rich, S. K., & Terman, J. R. (2018). Axon formation, extension, and navigation: only a neuroscience phenomenon? In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 53, pp. 174–182). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.08.004>

- Röthe, J., Thor, D., Winkler, J., Knierim, A. B., Binder, C., Huth, S., Kraft, R., Rothmund, S., Schöneberg, T., & Prömel, S. (2019). Involvement of the Adhesion GPCRs Latrophilins in the Regulation of Insulin Release. *Cell Reports*, 26(6), 1573-1584.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.040>
- Sando, R., & Südhof, T. C. (2021). Latrophilin gpcr signaling mediates synapse formation. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.65717>
- Schiöth, H. B., & Lagerström, M. C. (2008). Structural diversity of g proteincoupled receptors and significance for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(4), 339–357. <https://doi.org/10.1038/nrd2518>
- Scholz, N., Gehring, J., Guan, C., Ljaschenko, D., Fischer, R., Lakshmanan, V., Kittel, R. J., & Langenhan, T. (2015). The Adhesion GPCR Latrophilin/CIRL Shapes Mechanosensation. *Cell Reports*, 11(6), 866–874. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.008>
- Shimomura O, Johnson Fh, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *J Cell Comp Physiol*. 1962 Jun; 59:223-39. doi: 10.1002/jcp.1030590302. PMID: 13911999.
- Sugita, S., Ichtchenko, K., Khvotchev, M., & Südhof, T. C. (1998). α -Latrotoxin receptor CIRL/latrophilin 1 (CL1) defines an unusual family of ubiquitous G-protein-linked receptors: G-protein coupling not required for triggering exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 273(49), 32715–32724. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.49.32715>
- Sun, Y., Yu, H., Zheng, D., Cao, Q., Wang, Y., Harris, D., & Wang, Y. (2011). Sudan Black B Reduces Autofluorescence in Murine Renal Tissue. In *Arch Pathol Lab Med* (Vol. 135).
- Tobaben, S., Südhof, T. C., & Stahl, B. (2002). Genetic analysis of α -latrotoxin receptors reveals functional interdependence of CIRL/latrophilin 1 and neurexin 1 α . *Journal of Biological Chemistry*, 277(8), 6359–6365. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111231200>
- Tymiak, A. A., Norman, J. A., Bolgar, M., DiDonato, G. C., Lee, H., Parker, W. L., Lo -, L. C., Berova, N., Nakanishi, K., Haber, E., & Haupt, G. T. (1993). Physicochemical characterization of a ouabain isomer isolated from bovine hypothalamus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(17), 8189–8193. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.17.8189>
- Tzeng, M. chin, & Siekevitz, P. (1978). The effect of the purified major protein factor (α -latrotoxin) of black widow spider venom on the release of acetylcholine and norepinephrine from mouse cerebral cortex slices. *Brain Research*, 139(1), 190–196. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(78\)90073-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90073-2)

- Wortmann, M., Meisenbacher, K., Busch, A. et al. Mausmodelle für die Erforschung abdomineller Aortenaneurysmen. *Gefäßchirurgie* 25, 236–243 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00772-020-00647-y>
- Yanguas SC, Cogliati B, Willebrords J, Maes M, Colle I, van den Bossche B, de Oliveira CPMS, Andraus W, Alves VAF, Leclercq I, Vinken M. Experimental models of liver fibrosis. *Arch Toxicol.* 2016 May;90(5):1025-1048. doi: 10.1007/s00204-015-1543-4. Epub 2015 Jun 6. PMID: 26047667; PMCID: PMC4705434.
- Yasinska, I. M., Sakhnevych, S. S., Pavlova, L., Selnø, A. T. H., Abeleira, A. M. T., Benlaouer, O., Silva, I. G., Mosimann, M., Varani, L., Bardelli, M., Hussain, R., Siligardi, G., Cholewa, D., Berger, S. M., Gibbs, B. F., Ushkaryov, Y. A., Fasler-Kan, E., Klenova, E., & Sumbayev, V. V. (2019). The TiM-3-galectin-9 pathway and its regulatory mechanisms in human breast cancer. *Frontiers in Immunology*, 10(JULY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01594>
- Yin, G. N., Kim, D. K., Kang, J. I., Im, Y., Lee, D. S., Han, A. reum, Ock, J., Choi, M. J., Kwon, M. H., Limanjaya, A., Jung, S. B., Yang, J., Min, K. W., Yun, J., Koh, Y., Park, J. E., Hwang, D., Suh, J. K., Ryu, J. K., & Kim, H. M. (2022). Latrophilin-2 is a novel receptor of LRG1 that rescues vascular and neurological abnormalities and restores diabetic erectile function. *Experimental and Molecular Medicine*, 54(5), 626–638. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00773-5>

Anhang:

<https://www.abcam.com/technical>

<https://www.biologie.uni-muenchen.de/tdot-vr/einblick-aus/modellorganismen-biologie-2.pdf>

https://www.chemie.de/lexikon/G-Protein-gekoppelter_Rezeptor.html

<https://www.chromotek.com/technology/discovery-of-nanobodies>

<https://www.neb-online.de/pcr-dna-amplifikation/qpcr-real-time-pcr-und-rt-qpcr>

FLUOROPHORE TABLE

Dye	Absorbance Wavelength	Emission Wavelength	Visible color
Hydroxycoumarin	325	386	blue
methoxycoumarin	360	410	blue
Alexa fluor	345	442	blue
aminocoumarin	350	445	blue
Cy2	490	510	green (dark)
FAM	495	516	green (dark)
Alexa fluor 488	494	517	green (light)
Fluorescein FITC	495	518	green (light)
Alexa fluor 430	430	545	green (light)
Alexa fluor 532	530	555	green (light)
HEX	535	556	green (light)
Cy3	550	570	yellow
TRITC	547	572	yellow
Alexa fluor 546	556	573	yellow
Alexa fluor 555	556	573	yellow
R-phycoerythrin (PE)	480;565	578	yellow
Rhodamine Red-X	560	580	orange
Tamara	565	580	red
Cy3.5 581	581	596	red
Rox	575	602	red
Alexa fluor 568	578	603	red
Red 613	480;565	613	red
Texas Red	615	615	red
Alexa fluor 594	590	617	red
Alexa fluor 633	621	639	red
Allophycocyanin	650	660	red
Alexa fluor 633	650	668	red
Cy5	650	670	red
Alexa fluor 660	663	690	red
Cy5.5	675	694	red
TruRed	490;675	695	red
Alexa fluor 680	679	702	red
Cy7	743	770	red

Nucleic acid probes:

Dye	Absorbance Wavelength	Emission Wavelength	Visible color
DAPI	345	455	blue
Hoechst 33258	345	478	blue
SYTOX blue	431	480	blue
Hoechst 33342	343	483	blue
YOYO-1	509	509	green
SYTOX green	504	533	green
TOTO 1, TO-PRO-1	509	533	green
SYTOX orange	547	570	yellow
Chromomycin A3	445	575	yellow
Mithramycin	445	575	yellow
Propidium iodide	536	617	red
Ethidium bromide	493	620	red

Danksagung

Ich möchte hiermit Univ.-Prof. Dr. med. vet. Gabriela Krasteva-Christ sowie Dr. rer. nat. Stephan Maxeiner für die Überlassung des interessanten Themas, für den stets freundlichen Umgang mit mir und den ständigen Support größten Dank aussprechen.

Ein weiterer Dank richtet sich an die Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Dr. med. vet. Gabriela Krasteva-Christ mit all ihren Mitgliedern, welche mir mit ihrer Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft ein lehrreiches Arbeitsumfeld geschaffen und mich vor so manchem Fehltritt bewahrt haben. Der Wissenstransfer und die Erfahrungen dieser Zeit haben mir Einblicke gewährt, welche anders niemals möglich gewesen wären.

Auch möchte ich hiermit meinen Kommilitonen und Freunden danken, welche mich im Studium unterstützt haben, sie waren nicht selten meine Leidensgenossen, Lehrer und Retter.

