

Die Natur ist für den Wissenschaftler ein Spiegel, der alle dreißig Jahre zerbricht.

Erwin Chargaff

in Horace Judson: Der 8.Tag der Schöpfung

Für Gaby, meine Familie und Freunde

**Molekularbiologische Untersuchungen
am Tetraspan Molekül Plasmolipin**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Michael Hamacher

aus Wuppertal

Düsseldorf, 2002

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1. Berichtersteller: Prof. Dr. Hans Werner Müller

2. Berichtersteller: Prof. Dr. Rolf Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 05. Februar 2003

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Nervensystem und Myelin	1
1.2	Schwanzzellen	3
1.3	Plasmolipin	6
1.4	Ziele	10
2	Material und Methoden	12
2.1	Medien und Reagenzien	12
2.2	DNA	13
2.2.1	DNA-Isolation	13
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	13
2.2.3	Klonierung	14
2.2.4	Sequenzierung	15
2.2.5	Southern Blot Analyse	16
2.3	RNA	17
2.3.1	RNA-Isolierung aus dem Ischiasnerv der Ratte	17
2.3.2	Reverse Transkription (RT) und RT-PCR	18
2.3.3	Quantitative PCR (Q-PCR)	18
2.4	Proteine	18
2.4.1	Protein-Isolation	18
2.4.2	Western Blot Analyse	19
2.5	Zellkultur	19
2.5.1	Zellkultur von Fibroblasten der Maus	19
2.5.2	Embryonale Stammzellen	21
2.5.3	Zellkultur von Schwanzzellen der Ratte	23
2.5.4	Zellkultur von MDCK-Zellen	24
2.5.5	Überexpression von Plasmolipin in Schwanzzellen aus der Ratte und in MDCK-Zellen	24
2.5.6	Anreicherung von Plasmolipin überexprimierenden Schwanzzellen	24
2.6	RNA Interferenz (RNA _i)	25

2.6.1	Transfektion von siRNAs mittels Oligofectamine	25
2.6.2	Expression von shRNA mittels pSUPER-Konstrukt	26
2.7	Indirekte Bestimmung der Adhäsion	27
2.8	Untersuchung der Apoptose mit dem TUNEL-Assay	27
2.9	Bestimmung der Zellproliferation	28
2.10	Durchmusterung einer genomischen Maus DNA Bibliothek	28
2.11	Tiere	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Veränderung der Plasmolipin-Expression in Zellkultur	30
3.1.1	Reduktion der Plasmolipin-Expression über die RNA Interferenz (RNA _i)	30
3.1.2	Die Transfektion von Schwanzzellen der Ratte mit doppelsträngiger RNA führt zu einer verminderten Plasmolipin mRNA-Expression und zu einer verminderten Proteinmenge	30
3.1.3	Die Transfektion mit shRNA kodierenden pSUPER-Konstrukten führt ebenfalls zu einer verminderten Plasmolipin-Expression	33
3.1.4	Überexpression von Plasmolipin	34
3.1.5	Einfluss der Plasmolipin mRNA-Expression auf die Zellmorphologie	35
3.1.6	Eine Verminderung der Plasmolipin mRNA-Expression führt nicht zu vermehrter Apoptose	39
3.1.7	Eine Verminderung der Plasmolipin mRNA-Expression führt nicht zu einer veränderten Proliferation	40
3.1.8	Eine Verminderung der Plasmolipin mRNA-Expression führt zu ei- ner leicht verringerten Adhäsion auf Fibronectin und zu einer leicht erhöhten Adhäsion auf Laminin	41
3.1.9	Eine Änderung der Plasmolipin mRNA-Expression führt zu einer Veränderung der Expression anderer Myelogene	42
3.2	Plasmolipin überexprimierende Mausmutanten	46
3.2.1	Generierung transgener Mäuse	46
3.2.2	Etablierung unabhängiger transgener Mauslinien	48

3.3	Plasmolipin defiziente Mausmutante	49
3.3.1	Durchmusterung einer genomischen P1 Maus-Bank	49
3.3.2	Genomische Struktur des Plasmolipin-Gens der Maus	50
3.3.3	Generierung und Detektion von Plasmolipin defizienten ES-Kolonien	51
3.4	Plasmolipin und das Bardet-Biedl Syndrom	54
4	Diskussion	55
4.1	Die Induktion von RNA _i ist auch in primären Zellkulturen eine einfache und effektive Methode zur spezifischen Reduktion der RNA- und Protein- Expression	55
4.2	Der Einfluss des Plasmolipins auf die Zelladhäsion	58
4.2.1	Extrazellulärmatrix und Integrine	58
4.2.2	Zellmorphologie	61
4.3	Tetraspan Moleküle und Integrine	63
4.3.1	Lipid Rafts	63
4.3.2	Integrine und Tetraspan Moleküle	64
4.4	Der Einfluss des Plasmolipins auf andere Myelogene	68
4.5	Ähnlichkeiten zwischen Plasmolipin und MAL	70
4.6	Vitalität	71
4.7	Plasmolipin überexprimierende Mäuse	72
4.8	Generierung von Plasmolipin defizienten Mausmutanten	75
4.9	Plasmolipin und das Bardet-Biedl Syndrom	76
4.10	Aussichten	79
5	Zusammenfassung	81
6	Literatur	83
7	Anhang	100
	Abkürzungen	100
	Liste der verwendeten Q-PCR Primer	101
	Liste der verwendeten Primer	101
	Sequenzen	102

Plasmolipin-cDNA der Maus 102
Plasmolipin-Gen der Maus 103

1 Einleitung

1.1 Nervensystem und Myelin

Das Nervensystem der Vertebraten ist eines der komplexesten und leistungsfähigsten Organe im Tierreich. Es wird unterteilt in das zentrale Nervensystem (ZNS) und in das periphere Nervensystem (PNS) sowie seit einiger Zeit auch in das enterische Nervensystem (ENS), die sich in einigen Bereichen zum Teil deutlich voneinander unterscheiden. Gemeinsam ist allen eine hohe Nervenleitungsgeschwindigkeit und Informationsverarbeitung. Diese hohe Effektivität, gebündelt auf sehr kleinem Raum, wird zum einen durch eine hohe Verschaltung der Nervenzellen untereinander erreicht und zum anderen durch eine hohe Geschwindigkeit der Informationsweiterleitung über relativ große Distanzen.

Da sich Axone, die der Informationsweiterleitung dienenden Fortsätze von Nervenzellen, im physikalischen Sinne ungefähr wie Metall-Leiter verhalten, ist die Leitungsgeschwindigkeit direkt abhängig von der Längskonstante λ , d.h. von der Depolarisationsgeschwindigkeit der Membran. Diese ist abhängig vom Querwiderstand R_m sowie dem Außen- und Innenwiderstand R_a und R_i : $\lambda = \sqrt{\frac{R_m}{R_i + R_a}}$. Zur Erhöhung der Längskonstante und damit auch der Impulsfortleitung gibt es im Tierreich zwei Möglichkeiten:

- Vergrößerung des Leiter-Durchmessers

Da R_m umgekehrt proportional zum Radius ist, R_i aber zum Quadrat des Radius, nimmt der Innenwiderstand umso mehr ab und die Leitungsgeschwindigkeit umso mehr zu, je größer der Radius wird. Dieser Weg findet sich bei den Riesenaxonen der Tintenfische o.ä. Ein großer Nachteil ist allerdings der immense Platzbedarf großkalibriger Axone, welcher der Ausbildung komplexer Schaltkreise im Wege steht.

- Isolation und Saltatorische Erregungsweiterleitung

Die Isolation eines Axons durch Myelinscheiden erhöht den Querwiderstand R_m und somit auch die Längskonstante. Die Erregungsleitung findet ausschließlich an regelmäßig wiederkehrenden Einschnürrungen statt, den sogenannten Ranvier'schen Schnürringen, über die die Impulsfortleitung saltatorisch geschieht. Myelinisierte Axone benötigen daher wenig Platz und haben eine hohe Leitungsgeschwindigkeit.

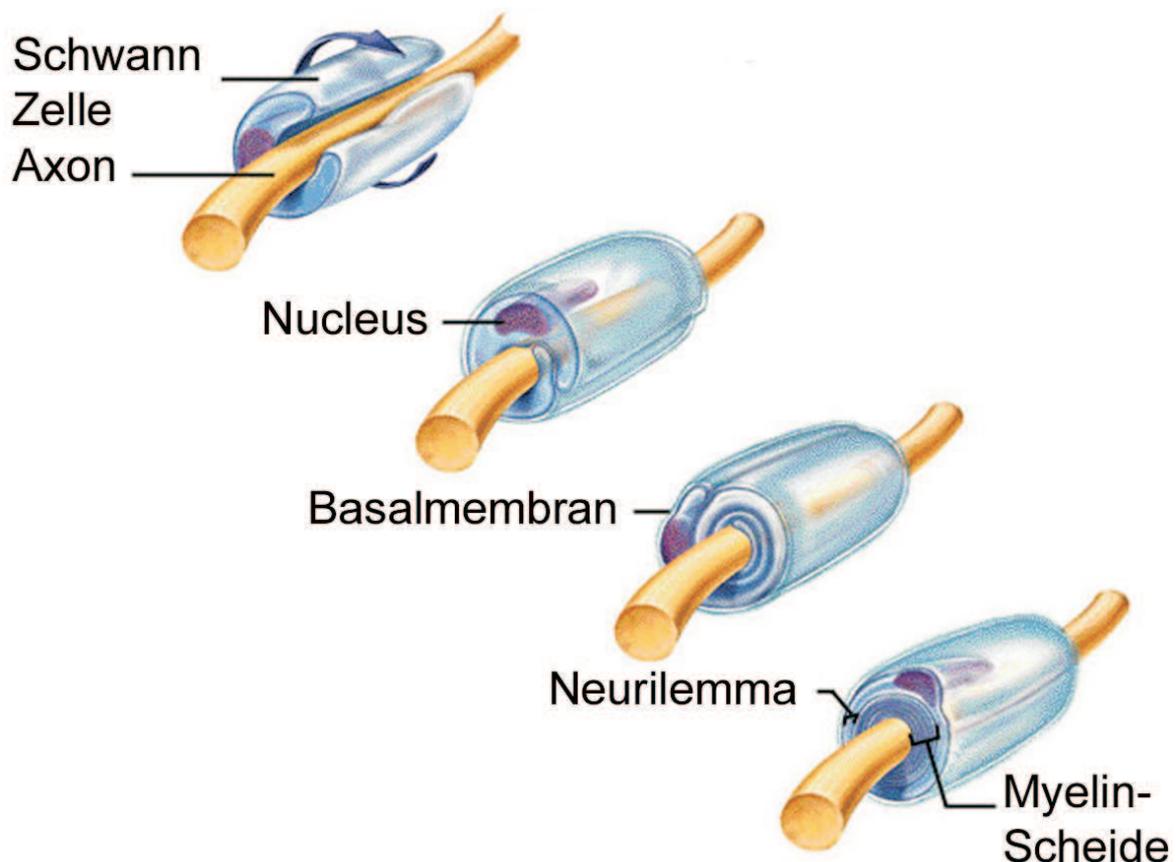


Abbildung 1: Schema eines peripheren Nervs

Schwannzellen nehmen zu Beginn der Myelinogenese einen 1:1 Kontakt mit Axonen auf und umwickeln diese, indem der Zellrand unter den gegenüberliegenden Zellrand geschoben wird. Gleichzeitig kommt es zu einer Kompaktierung des Zytosols unter dem Einfluss von membranständigen Myelinproteinen. Abbildung verändert nach: Skript zur Vorlesung „Nervous System“ des Instituts für Biochemie und Molekulare Biologie, Eberly College of Science, Pennsylvania State University).

Die Gehirne der höher entwickelten Organismen verdanken ihre große Leistungsfähigkeit vor allem dem zuletzt genannten Punkt, der Myelinisierung. Die Isolation der Nervenbahnen wird dabei im ZNS durch die Oligodendrozyten bewerkstelligt und im PNS durch die Schwannzellen (Abb. 1). Da in der vorliegenden Arbeit vornehmlich an Schwannzellen gearbeitet wurde, soll im folgenden nur auf diese eingegangen werden.

1.2 Schwannzellen

Die Vorläuferzellen der Schwannzellen, die Neuralleisten-Zellen (neural crest cells), entstammen dem Neuroepithelium des dorsalen Randes der sich zum Neuralrohr einfaltenden Neuralplatte (Lobsiger *et al.*, 2002). Sie wandern bei der Ratte am Embryonal-Tag 9-10 (E9-10) vom Neuralrohr lateral und ventral weg in ihre Zielgebiete und entwickeln sich u.a. zu Melanozyten, glatten Muskelzellen, PNS Neuronen und glialen Zelltypen (Anderson, 1993; Henion und Weston, 1997).

Eine wichtige Frage in der Entwicklung der Schwannzellen ist, welche Faktoren für das Einschlagen der unterschiedlichen Entwicklungsmöglichkeiten notwendig sind. Die Entwicklung des Ischiasnerven der Ratte hat sich dabei als ein gutes Modellsystem herausgestellt (Mirsky und Jessen, 1999; Lobsiger *et al.*, 2002). Die ersten Axone projizieren in den Bereich der Hinterbeine der Ratten zwischen E13 und E14. Sie sind mit Vorläuferzellen der Schwannzellen assoziiert, die die Axone bereits in Gruppen zur späteren Myelinisierung einteilen. Werden diese Zellen von den Axonen getrennt, sterben sie in Zellkultur ab, so dass das Überleben dieser frühen Schwannzell Stadien von Faktoren abhängen muss, die von den Neuronen sezerniert werden. Es handelt sich dabei vor allem um β -Neureguline, die an die erbB3- oder erbB4-Rezeptoren auf den Schwannzell-Vorläufern binden können (Dong *et al.*, 1995, Shah *et al.*, 1994; Shah *et al.*, 1996). Sie bewirken nicht nur das Überleben der Vorläuferzellen, sondern verhindern auch, dass diese in eine neuronale Entwicklung eintreten. Mausmutanten, die entweder Neuregulin- oder erbB3-defizient sind, zeigen kaum Schwannzell Vorläufer (Riethmacher *et al.*, 1997; Meyer und Birchmeier, 1994). Während die Neuregulin-defizienten Mutanten aber bereits am Tag E11.5 aufgrund von Herzdefekten sterben, überleben die erbB3-Mutanten bis zur Geburt und besitzen Axone, die ihre Zielgebiete innervieren konnten. Allerdings starben rund 80 % aller Spinalganglien und Motoneurone bis zum Tag E18 ab. Schwannzellen scheinen daher zwar nicht für die Elongation oder das Auswachsen der Axone verantwortlich zu sein, aber für das Überleben der Neurone. In diesem Zusammenhang wurden Mitglieder der GDNF-Familie (*glial-derived neurotrophic factor*) wie Neurturin oder Persiphein diskutiert, die von den Schwannzellen abgesondert werden (Kotzbauer *et al.*, 1996; Milbrandt *et al.*, 1998; Henderson *et al.*, 1994; Arce *et al.*, 1998).

Ab dem Tag E16 finden sich im PNS der Ratte zwei Typen von Schwannzellen (Lobsinger *et al.*, 2002): Die myelinisierenden Schwannzellen, die mit größeren Axonen assoziiert sind und die Myelogene P0 und MBP (Basisches Myelin Protein, *myelin basic protein*) verstärkt exprimieren, sowie die nicht-myelinisierenden Schwannzellen, die mit kleineren Axonen in Kontakt treten und nur geringe Menge an P0 und MBP exprimieren. Die Differenzierung zu myelinisierenden Zellen ist reversibel und kann zum Beispiel nach Nervenverletzungen wieder rückgängig gemacht werden, um geeignete Umgebungsbedingungen für wiederauswachsende Neurone zu schaffen (Mirsky und Jessen, 1996). Es kommt zu einem Abbau des Myelins, zur Einwanderung von Makrophagen und zur Schwannzell Proliferation, einem Vorgang, der als Waller'sche Degeneration bezeichnet wird (siehe Salzer und Bunge, 1980).

In diesem Stadium werden von den Schwannzellen neurotrophe Faktoren wie NGF, LIF, BDNF und NT4/5 sezerniert sowie Adhäsionsmoleküle wie L1, N-Cam oder N-Cadherin exprimiert, die sonst nur nicht-myelinisierende Zellen aufweisen (Jessen und Mirsky, 1992). Die umliegenden Schwannzellen bleiben als sogenannte Büngner'sche Bänder in ihren ursprünglichen Positionen, so dass die proximal erhalten gebliebenen Axonstümpfe wieder aussprossen und entlang der Schwannzellen in Richtung ihrer früheren Zielgebiete wachsen können. Die Schwannzellen differenzieren nach erneutem Axonkontakt und myelinisieren die Axone wieder, allerdings in einer etwas weniger kompakten Form.

Für die Prozesse während der Myelinisierung in der Entwicklung wie auch nach einer Nervenläsion sind eine Reihe von Transkriptionsfaktoren von großem Interesse (Küry *et al.*, 2001; Mirsky und Jessen, 1999). Vor allem für das Zinc-Finger Protein Krox-20 und das POU-Domänen Protein Oct-6 (Scip) konnte gezeigt werden, dass sie für die Myelinisierung und Kompaktierung des Myelins im PNS mitverantwortlich sind. Krox-20 defiziente Mausmutanten zeigen zwar eine 1:1 Kontaktaufnahme von Schwannzellen mit Axonen, aber keine Ausbildung der Myelinscheide (Abb. 1) und keine Myelinisierung. Auch Oct-6 defiziente Mausmutanten bilden keine oder nur eine verspätete Myelinisierung aus.

Die Mutationen einiger Myelogene ähneln zum Teil stark den Phänotypen der Oct-6 bzw. Krox-20 Mutanten (zur Übersicht der Myelogene siehe Nave, 1994; Martini und Schachner, 1997). Das dominanteste Protein im PNS-Myelin ist das P0, das neben anderen Proteinen aufgrund seiner homophilen Interaktionsfähigkeit für die Kompaktierung der extrazellulären Seite der sich spiralförmig um ein Axon windenden Schwannzelle verantwortlich gemacht wird (Abb. 1; D'Urso *et al.*, 1990; Filbin *et al.*, 1990). Darüber hinaus scheint P0 durch Interaktionen mit der Membran und dem Zytoskelett Desmosomen zu bilden und die Kompaktierung des Zytoplasmas bewirken zu können (Doyle *et al.*, 1995). Mausmutanten ohne P0-Gen können ebenfalls keine Myelinscheiden aufbauen, nachdem sich ein 1:1 Kontakt zwischen Axonen und Schwannzellen ausgebildet hat (Martini *et al.*, 1995b). Heterozygote P0 +/- Mäuse bilden zunächst morphologisch unauffällige Myelinscheiden aus, entwickeln aber im Alter von vier Monaten eine Myelindegeneration mit sogenannter Zwiebelschalenstruktur und vermehrter Schwannzell Proliferation aus (Martini und Schachner, 1997). P0 scheint daher an der Aufrechterhaltung der Myelinscheiden beteiligt zu sein.

Ähnliche gendosisabhängige Effekte konnten im Falle des Peripheren Myelin Proteins PMP22 gefunden werden (Suter und Snipes, 1995; Müller, 2000). Eine Verdopplung des Gens führt zu der erblichen humanen Neuropathie Charcot-Marie-Tooth Typ 1A (Timmermann *et al.*, 1992; Matsunami *et al.*, 1992), während der Verlust eines Allels die erbliche Neuropathie mit Neigung zu Druckpareisen (HNPP) hervorruft (Chance *et al.*, 1994). Knock-out Mäuse belegen, dass PMP22-defiziente Tiere eine verspätete Myelinisierung, fokale Hypomyelinisierung, vermehrt proliferierende Schwannzellen und schließlich Demyelinisierung zeigen (Adlkofer *et al.*, 1995). Die richtige Protein-Stöchiometrie und quantitative Zusammensetzung der Zellmembran scheint demnach für die Bildung und den Erhalt der Markscheiden wichtig zu sein, wie dies auch die Folgen von Mutationen in anderen Proteinen wie Connexin 32 oder PLP vermuten lassen (Anzini *et al.*, 1997; Garbern *et al.*, 1997). Eine weitere Myelinkomponente, die während der Ischiasnerventwicklung und -regulation als reguliert exprimiert gefunden wurde und daher eine Rolle im Ablauf der Myelinisierung spielen könnte, ist das Plasmolipin.

1.3 Plasmolipin

Die Anzahl an Veröffentlichungen, die Plasmolipin direkt oder indirekt zum Thema haben, hält sich seit den ersten Beschreibungen aus dem Jahre 1979 in einem überschaubaren Rahmen. Eine Suche im PubMed der National Library of Medicine generiert eine Liste mit 26 Einträgen, meist im Zusammenhang des verwandten Myelin- und Lymphozyten-assoziierten Proteins MAL (Stand Juli 2002). Diese recht geringe Publikationsanzahl ist vor allem auf die schwierige Zugänglichkeit des Proteins zurückzuführen, zumal es sich um ein Transmembranprotein ohne größere, außerhalb der Membran liegende, Domänen handelt, was zum Beispiel die Gewinnung eines geeigneten Antikörpers lange Zeit schwierig gestaltete. Erst mit der Entstehung neuer molekularbiologischer Techniken und den Fortschritten in den Biowissenschaften war es möglich, dieses Molekül genauer zu charakterisieren.

Plasmolipin wird zur Gruppe der Proteolipide gerechnet, die von Lees und Folch 1951 in ihren Studien über die Sulfatide des Rattengehirns zum ersten Mal beschrieben wurden (Folch und Lees, 1951). Diese Bestandteile des Myelins waren nach ihrer Präparation zunächst in organischen Lösungsmitteln (Chloroform/Methanol/Wasser) löslich, nach einer Trocknung und Extraktion aber nicht mehr. Erst nach einer Delipidierung kann das Apoprotein durch Lösungsmittelaustausch unter N_2 in eine wasserlösliche Form überführt werden (Fischer *et al.*, 1994). Eine neuere Definition beschreibt die Proteolipide vereinfachend als Proteine, die einen Lipid-Anteil als Teil ihrer primären Struktur aufweisen (Schlesinger, 1981). Die Mitglieder dieser Familie finden sich als integrale Bestandteile vieler Membranen wie zum Beispiel der Plasmamembran, der Membran des Sarcoplasmatischen Retikulums (Shamoo and Ryan, 1975) oder der Membran von Mitochondrien (MacLennan *et al.*, 1973). Obwohl sie einen großen Prozentsatz der Membranproteine ausmachen, ist kaum etwas über ihre biologische Funktion bekannt.

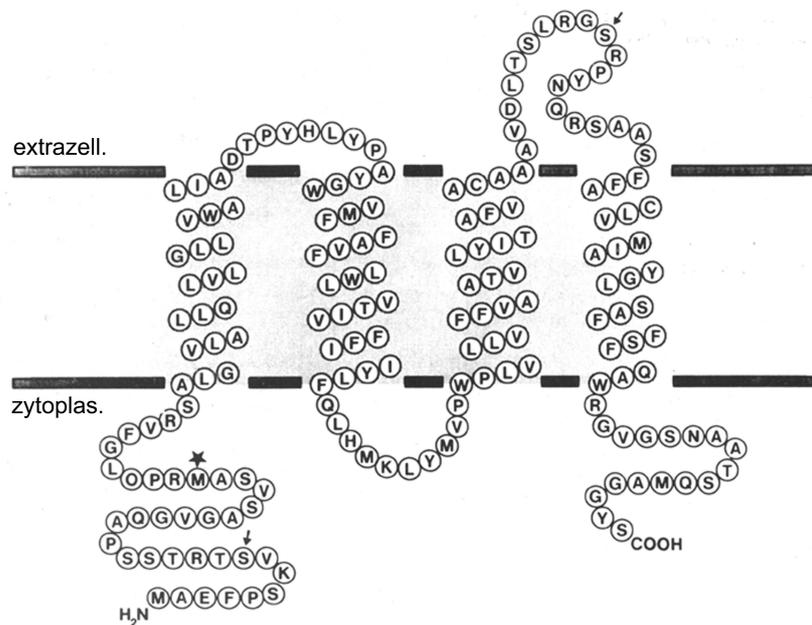


Abbildung 2: Topografisches Modell von Plasmolipin

Das Plasmolipin-Protein besitzt vier hydrophobe Bereiche mit α -Helix Struktur, bei denen es sich um Transmembrandomänen handeln könnte. N- und C-Terminus liegen auf der zytosolischen Seite. Mögliche Phosphorylierungsstellen sind mit Pfeilen gekennzeichnet (Ser9 und Ser130); der Stern markiert ein Methionin, das zunächst als N-Terminus des Proteins beschrieben worden war (Fischer und Sapirstein, 1994); bei den Buchstaben handelt es sich um die Kürzel für die verschiedenen Aminosäuren. Abbildung modifiziert nach Gillen *et al.* (1996); extrazell. extrazelluläre Seite der Zelle, zytoplas. zytoplasmatische Seite der Zelle.

Plasmolipin wurde ursprünglich aus der Niere der Ratte isoliert und zunächst als Plasmamembran Proteolipid Protein (PM-PLP) bezeichnet. Eine erste Charakterisierung erwies sich im Laufe nachfolgender Publikationen als unzuverlässig, da zum Beispiel zwei verschiedene Untereinheiten beschrieben wurden, deren Molekulargewichte variierten (Tosteson und Sapirstein, 1981; Shea *et al.*, 1986; Sapirstein *et al.*, 1992a). Die Klonierung der Plasmolipin cDNA (Gillen *et al.*, 1996) ergab schließlich eine kodierende Region von 546 Nukleotiden und somit ein Protein von 182 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 20 kDa. Eine Analyse der Fluoreszenz-Emissionsspektren, des Zirkulardichroismus in verschiedenen Lösungsmitteln sowie der Aminosäurezusammensetzung führte zu einem topografischen Modell (Abb. 2, Fischer *et al.*, 1994) mit zytosolischem N- und C-Terminus, vier hydrophoben Transmembransegmenten mit α -Helix-Struktur und sehr kurzen, außerhalb der Membran liegenden Schleifen. Die Zugabe von aufgereinigtem PM-

PLP der Niere zu Lipid-Bilayern ließ den Schluss zu, dass Plasmolipin spannungsabhängige Kationenkanäle bilden kann, die vor allem K^+ -Ionen permeabel sein sollen (Tosteson und Sapirstein, 1981). Unterstützt wurde diese Vermutung durch Untersuchungen zur Quartärstruktur von Plasmolipin, bei denen stöchiometrische Bindungsstudien mit einem Naphtalensulfanat-Derivat durchgeführt wurden. Nach diesen Ergebnissen könnte Plasmolipin entweder als Dimer oder als Hexamer aus drei Dimeren vorliegen, wobei dies einem weit verbreiteten Motiv der K^+ -Kanäle entspräche (Sapirstein und Rounds, 1983). Ein direkter Nachweis dieser Kanal-Hypothese steht allerdings noch aus.

Expressionsstudien zeigten das Vorhandensein von PM-PLP in neuralem Gewebe, synaptischer Plasmamembran und glialen Mikrosomen (Fischer und Sapirstein, 1986), neuronalen und glialen Zellen in primären Zellkulturen der Ratte (Shea *et al.*, 1986), ummantelten Vesikeln aus Kälberhirn (Sapirstein *et al.*, 1992c) sowie in Myelin aus dem Hirn der Maus (Cochary *et al.*, 1990). Der PM-PLP Komplex soll dabei im rauhen Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und über den Golgi-Apparat und Mikrotubuli ohne posttranslationale Prozessierung in die Plasmamembran transportiert werden (Fischer und Sapirstein, 1986; Shea *et al.*, 1986). Auch diese Daten widersprechen sich zum Teil, da zum Beispiel die untersuchte synaptische Plasmamembran aus dem Hirn des Huhn stammte (Fischer und Sapirstein, 1986), während eine spätere Publikation eine phylogenetische Beschränkung des nun Plasmolipin genannten Proteins auf das PNS und ZNS der Säugetiere postulierte (Sapirstein *et al.*, 1991). Eine weitere Studie der Gruppe um Sapirstein schränkte zudem das Vorhandensein von Plasmolipin im Cerebellum auf gliale Zellen ein; Plasmolipin sollte demnach über eine Translokation aufgrund von endozytotischen Prozessen an der Periaxolemma/Axolemma-Grenze in neurale Zellen aufgenommen werden (Sapirstein *et al.*, 1992b). Weitere Expressionsstudien führten zu der Einordnung Plasmolipins als Myelinprotein, da es in der Plasmamembran von Schwannzellen des Ischiasnervs (Cochary *et al.*, 1990) sowie in kultivierten Oligodendrozyten (Fischer *et al.*, 1991) nachgewiesen werden konnte. Interessant ist dabei vor allem die zeitliche Korrelation zwischen der Plasmolipin-Expression und der Myelinentwicklung: Die Bildung von Myelin in der Ratte zum Beispiel setzt kurz nach der Geburt ein und ist innerhalb der folgenden drei bis vier Wochen abgeschlossen.

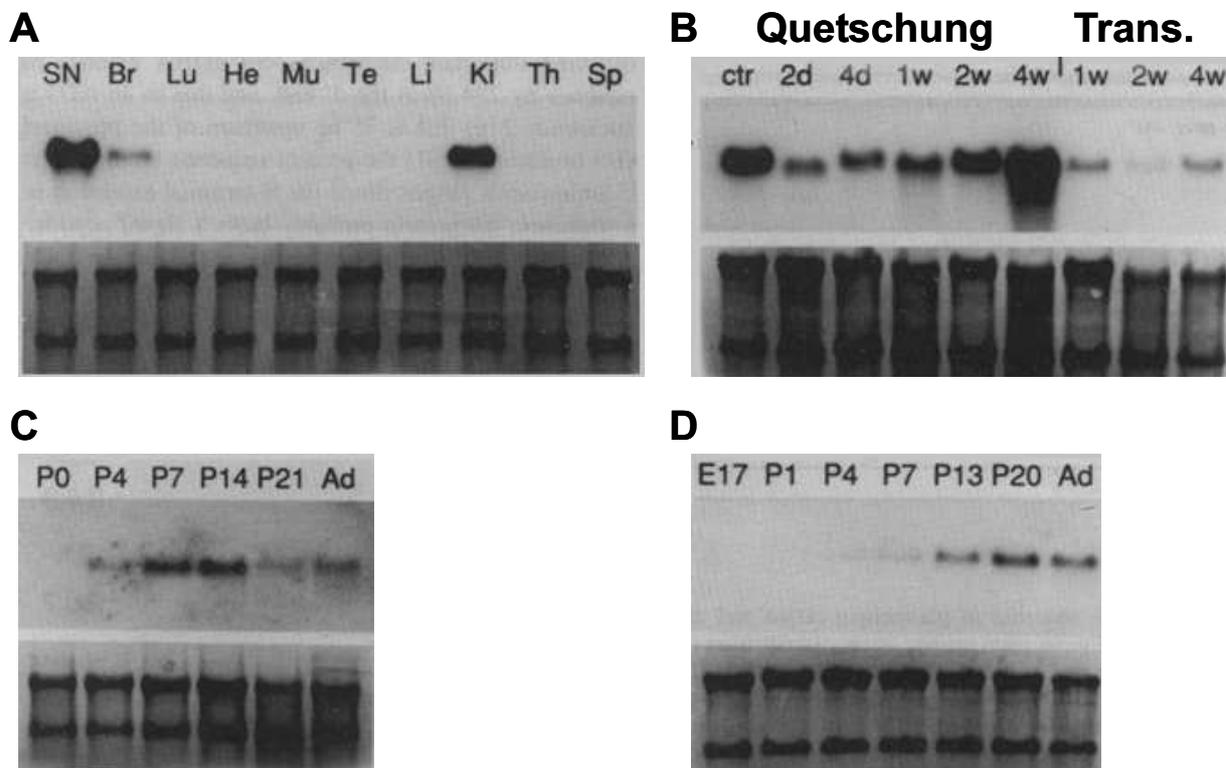


Abbildung 3: Northern Blot Analyse der Expression von Plasmolipin in Gewebe (**A**), nach Läsion des Ischiasnervs (**B**) und während der Entwicklung (**C**, **D**) der Ratte

A Je zehn μg RNA aus dem Ischiasnerv (SN), dem Gehirn (Br), der Lunge (Lu), dem Herz (He), dem Skelettmuskel (Mu), der Testis (Te), der Leber (Li), der Niere (Ki), dem Thymus (Th) und der Milz (Sp) der Ratte wurden mit einer Plasmolipin spezifischen, radioaktiv markierten cDNA-Sonde hybridisiert. Plasmolipin konnte auf RNA-Ebene nur im Ischiasnerv, im Gehirn sowie in der Niere detektiert werden.

B Der Ischiasnerv der Ratte wurde gequetscht (Quetschung) oder durchtrennt (Trans.) und die RNA nach zwei oder vier Tagen (2d, 4d) sowie einer, zwei oder vier Wochen isoliert (1w, 2w, 4w; Kontrolltier ctr). Die RNA wurde mit der bereits erwähnten Plasmolipin spezifischen Sonde hybridisiert. Beschreibung siehe Text.

C Die RNA aus dem Ischiasnerv von neugeborenen Ratten (P0) sowie 4, 7, 14 und 21 Tage alten (P4, P7, P14, P21) oder adulten (ad) Ratten wurde isoliert und wie unter **A** beschrieben hybridisiert. Beschreibung siehe Text.

D Die RNA aus dem Gehirn von Ratten des Alters E17, P1, P4, P13, P20 sowie von adulten Tieren wurde isoliert und wie unter **A** beschrieben hybridisiert. Beschreibung siehe Text. Modifiziert nach Gillen *et al.* (1996).

Die Expression von Plasmolipin im PNS der Ratte ist parallel dazu ab Tag P4 detektierbar, steigt bis zum Tag P14 rapide an und fällt dann auf ein relativ niedriges Niveau im adulten Alter zurück (Abb. 3B). Ein ähnlicher Verlauf findet sich im ZNS, allerdings mit einem etwas späteren Einsetzen an Tag P7 und einem Maximum an Tag P20 (Abb. 3D; Gillen *et al.*, 1996). Noch deutlicher wird diese Korrelation bei der Nervenregeneration, nachdem Ischiasnerven der Ratte mit einer Pinzette gequetscht wurden (Abb. 3C; Gillen *et al.*, 1996). In den nachfolgenden De- und Regenerationsprozessen (siehe oben) kommt es innerhalb der ersten zwei Tage zu einer Dedifferenzierung der Schwanzzelle und daher zu einer Demyelinisierung der Axone. Im Zuge der beginnenden Erholung des gequetschten Nervs differenzieren die Zellen wieder und myelinisieren die Axone innerhalb der nächsten vier Wochen erneut. Während dieser De- und Remyelinisierung nimmt die Expressionsstärke des Plasmolipins zunächst stark ab, um dann aber bis zur vierten Woche nach dem Eingriff sogar über den Ausgangswert hinaus zu steigen. Andere Myelinge zeigen dagegen während der Entwicklung und auch in Regenerationsexperimenten keinen Rückgang der Expression im adulten Alter bzw. nach einer Remyelinisierung, sondern bleiben konstant hoch exprimiert; ein Umstand, der daraufhin weist, dass Plasmolipin eine Funktion im Aufbau der Markscheide besitzen könnte.

1.4 Ziele

Ziele dieser Arbeit waren, die Aufgabe des Plasmolipins im Nervensystem besser zu charakterisieren und die biologische Funktion dieses Proteins zu untersuchen. Eine Möglichkeit, dies zu erreichen, besteht darin, die Menge des in einer Zelle vorhandenen Proteins zu verändern und die möglichen Folgen der Veränderungen zu studieren. Das kann im Tiermodell oder in der Zellkultur mit Hilfe einer Erhöhung oder einer Reduktion der Proteinmenge durch einen Eingriff auf der RNA-, DNA- oder der Proteinebene untersucht werden. Folgende Aufgabenstellungen sind dabei in Angriff genommen worden:

1. Reduktion der Plasmolipin mRNA-Menge mit Hilfe der RNA Interferenz (RNA_i)
Kurze doppelsträngige, sogenannte short interfering RNAs (siRNA) setzen in eukaryotischen Zellen einen Prozess in Gang, der zu einer Degradation von solchen (m)RNAs führt, die homolog zur siRNA-Sequenz sind (Hannon, 2002). Dieser als

RNA Interferenz (RNA_i) bezeichnete Vorgang sollte über zwei Strategien erreicht werden:

- (a) Transfektion von Schwanzzellen mit kurzen doppelsträngigen RNAs
- (b) Transfektion von Schwanzzellen mit einem Vektor, dessen Transkription zu einem kurzen Oligomer mit Haarnadel-Struktur führt (= short hairpin RNA, shRNA)

In beiden Fällen sollte die Reduktion der Plasmolipin-Expression auf RNA- und Proteinebene nachgewiesen und die Folgen auf Morphologie, Proteinverteilung, Vitalität und Adhäsion der Zellen sowie auf die Expression ausgewählter anderer Gene untersucht werden.

2. Generierung von Plasmolipin überexprimierenden Mausmutanten

Die Plasmolipin-cDNA der Maus sollte - unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors - in transgenen Mäusen spezifisch in Schwanzzellen überexprimiert sowie ein möglicher Phänotyp studiert werden. Hierzu waren mehrere voneinander unabhängige Mutantenlinien vorgesehen.

3. Generierung Plasmolipin defizienter Mausmutanten (Knock-out Mäuse)

Das Plasmolipin-Gen sollte konstitutionell durch homologe Rekombination in Mäusen ausgeschaltet sowie ein möglicher Phänotyp studiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Medien und Reagenzien

20xSSC	3 M NaCl, 300 mM Natrium-Citrat pH 7.0
Church Puffer	7 % SDS, 500 mM Natrium-Phosphatpuffer pH 7.0
Church Waschpuffer	0.1 % SDS, 40 mM Natrium-Phosphatpuffer pH 7.0
Denaturierungslösung	500 mM NaOH, 1.5 M NaCl
DMEM ES-Zellkultur	GibcoBRL # 41965-039
DMEM SC-Zellkultur	GibcoBRL # 31966-021
Einfriermedium	45 % EF-DMEM, 45 % FCS, 10 % DMSO
HEPES-DMEM	GibcoBRL # 22320-022
LB-Medium	0.5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, 1 % Pepton
LB-Platte	0.5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, 1 % Pepton, 1.2 % Agar
Lysepuffer (TNES)	50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 % SDS, 20mg/ml Proteinase K
MEF	DMEM, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 % Penicillin/ Streptomycin (10^5 U/ml)
MES	DMEM, 15 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 % Penicillin/ Streptomycin (10^5 U/ml), 0.1 mM β -Mercaptoethanol, 1:2500 LIF (10^7 U/ml)
Neutralisierungslösung	1 M Tris-HCl pH 8, 1.5 M NaCl
RNA-Transfektionsmedium	DMEM, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 2 μ M Forskolin
SC-Medium	DMEM, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 % Penicillin / Streptomycin (10^5 U/ml), 2 μ M Forskolin
SOC	2 % Trypton, 0.5 % Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM Glucose
TE Puffer	100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl
TNES	50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 % SDS

Alle nicht aufgeführten oder gekennzeichneten Chemikalien wurden von den Firmen GibcoBRL, Merck, PAA, Roth und Sigma bezogen, die verwendeten Enzyme von der Firma Roche und Invitrogen.

2.2 DNA

2.2.1 DNA-Isolation

2.2.1.1 Bakterien-Suspensionen

Plasmid-DNA aus Bakterien-Suspensionen wurden mit Hilfe des QIAprep Spin Mini-prep Kits (Qiagen) isoliert und in einer Endkonzentration von $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ in LiCrosolv-Wasser (Merck) gelöst.

2.2.1.2 Genomische DNA

Genomische DNA aus eukaryotischen Zellen der Zellkultur oder aus Schwanzspitzenbiopsien wurde mit einem Verfahren nach Hogan und Kollegen (Hogan *et al.*, 1986) gewonnen. Zellen oder Gewebe wurden für eine Stunde bis über Nacht in TNES Puffer mit $20 \mu\text{g}$ je μl frisch angesetzter Proteinase K bei 55°C geschüttelt, für eine Stunde bei 37°C mit RNase A ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) inkubiert und nachfolgend mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) sowie Chloroform extrahiert. Nach einer ethanolischen Fällung wurden die Pellets getrocknet und in einer entsprechenden Menge LiChrosolv-Wasser gelöst. Die Konzentrationen wurden spektralphotometrisch bestimmt.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCRs wurden in Standard-PCR-Reaktionen mit dem AmpliTaq-System (Applied Biosystems) nach folgendem Schema durchgeführt:

5 μl	10fach Puffer	initiale Denaturierung	2 min	95°C
4 μl	dNTP (2.5 mM je)	25 bis 45 Zyklen		
3 μl	MgCl ₂ (25 mM)	Denaturierung	30s	92°C
20 μl	ddH ₂ O	Annealing	30s	48°C
5 μl	Primer 1 (20 pmol/ μl)			bis 60°C
5 μl	Primer 2 (20 pmol/ μl)	Elongation	45 bis 120s	72°C
5 μl	DMSO	terminale Elongation	10 min	72°C
0.5 μl	Taq (5 U/ μl)			
20ng	zu amplifizierende DNA oder 1 μl ddH ₂ O			

Die PCR-Amplifikationsprodukte wurden gelelektrophoretisch in 0.8 bis 1.2 %igen TAE-Agarosegelen aufgetrennt, fotografiert und gegebenenfalls ausgeschnitten sowie mittels des QiaexII Kits (Qiagen) oder der Ultrafree-DA Säulchen (Millipore) aufgereinigt. Für PCR-Produkte, die zu einer Klonierung verwendet werden sollten, wurde zusätzlich zur

AmpliTaq eine gleiche Anzahl an Aktivitätseinheiten der *Pfu*-Polymerase (Invitrogen) mit Exonukleaseaktivität hinzu gegeben. Schwer zu amplifizierende DNA-Fragmente konnten zumeist mit dem HotStar-System (Qiagen) nach folgendem Schema amplifiziert werden:

5 μ l	10fach Puffer	initiale Denaturierung	15 min	95°C
4 μ l	dNTP (2.5 mM je)	25 bis 45 Zyklen		
10 μ l	Q-Solution	Denaturierung	30s	92°C
20 μ l	ddH ₂ O	Annealing	30s	48°C
5 μ l	Primer 1 (20 pmol/ μ l)			bis 60°C
5 μ l	Primer 2 (20 pmol/ μ l)	Elongation	45 bis 120s	72°C
0.25 μ l	Taq (5 U/ μ l)	terminale Elongation	10 min	72°C
20ng	zu amplifizierende DNA oder 1 μ l ddH ₂ O			

2.2.3 Klonierung

2.2.3.1 Dephosphorylierung

Mittels Restriktionsenzymen geschnittene Vektoren wurden mit einer Alkalischen Phosphatase (Shrimp Alkali Phosphatase, SAP; Roche) nach Herstellerangaben mit 1 U SAP je pmol DNA-Enden dephosphoryliert, wobei die Anzahl an pmol Enden durch die Formel $\frac{\mu\text{g}}{\text{kb}} \text{ DNA} * 3.04$ ermittelt wurde. Die SAP wurde nach der Inkubation durch Erwärmen auf 65°C für 15 min irreversibel denaturiert.

2.2.3.2 Ligation

PCR-Produkte, die mit einer TA-Überhänge produzierenden DNA-Polymerase erzeugt wurden, wurden nach Herstellerangaben mit Hilfe des TOPO Klonierungssystems (Invitrogen) in den pCR-Vektor kloniert; solche, die mit einer nicht TA-Überhänge produzierenden DNA-Polymerase generiert wurden, mit Hilfe des Zero Blunt Systems (Invitrogen) in den pZero-Vektor. Restriktionsfragmente wurden in entsprechend geschnittenen und dephosphorylierten Vektoren über den T4 Rapid DNA Ligation Kit (Roche) kloniert. Dabei wurden 400 bis 800 ng DNA-Fragment und 20 bis 40 ng Vektor verwendet.

2.2.3.3 Transformation mittels Hitzeschock

TOP 10 *E. coli* Kulturen (Invitrogen) wurden auf Eis aufgetaut; 1 bis 4 μl Ligationsansatz wurden hinzugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Das Reaktionsgefäß wurde für 45s auf 42°C erwärmt, für 2 min auf Eis abgekühlt und mit 200 μl SOC aufgefüllt. Nach einer Inkubation bei 37°C für 1 h wurden die Ansätze auf LB-Platten mit einem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht in feuchter Atmosphäre bei 37°C gelagert. Einzelne Kolonien wurden mit einem Zahnstocher in 5 bis 50 ml LB-Medium, versetzt mit geeignetem Antibiotikum, überführt und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Ein Teil der Bakteriensuspension wurde mit einem Volumen Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren. Der restliche Teil wurde mit dem QIAprep Spin Plasmid Prep Kit weiterverarbeitet und die gewonnene Plasmid-DNA mit 50 μl Elutionspuffer eluiert. Zur Überprüfung der Plasmide wurden diese mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten und gelelektrophoretisch aufgetrennt sowie zum Teil sequenziert.

2.2.4 Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurde der ABI 310 Genetic Analyzer zusammen mit dem BigDye Terminator System (Applied Biosystems) verwendet. Die zu sequenzierende DNA wurde zusätzlich zur gewöhnlichen Aufreinigung noch einmal durch Zugabe von $\frac{1}{10}$ Volumen NaAc und einem Volumen absolutem Ethanol gefällt, für 25 min bei 14.000 Upm in einer Eppendorf 5417C Tischzentrifuge bei Raumtemperatur abzentrifugiert, mit 70 %igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in einem adäquaten Volumen Wasser gelöst. Eine typische Sequenzierreaktion erfolgte nach dem Schema:

1.5 μl	Primer (5 pmol/ μl)	initiale Denaturierung	2 min	95°C
1 μl	DMSO	24 Zyklen		
7 μl	Sequenzier-Mix	Denaturierung	30s	92°C
1 μg	DNA	Annealing	30s	54°C
ad 20 μl	ddH ₂ O	Elongation	4 min	60°C

Nicht eingebaute Nukleotide wurden über DyeEx-Säulchen (Qiagen) entfernt. Fünfzehn μl des Sequenzieransatzes wurden mit 15 μl TSR (template suppression reagent, Applied Biosystems) vermischt, für 2 min bei 92°C denaturiert und im ABI 310 elektrophoretisch

in POP6 Polymer (Applied Biosystems) aufgetrennt sowie detektiert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Programme Sequencing Analysis 2.1.2 (Applied Biosystems), Sequencher (Gene Codes) sowie den BLASTN Suchdiensten des Internets.

2.2.5 Southern Blot Analyse

2.2.5.1 Gelelektrophorese

Zehn bis fünfzehn μg der zu untersuchenden genomischen DNA wurde mit geeigneten Restriktionsenzymen wie oben beschrieben geschnitten und in 0.8 %igen TAE-Agarosegelen mit 10 V/cm für 5 h elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde zusammen mit einem Lineal fotografiert oder mittels einer Kamera aufgenommen und für 5 min in 0.25 M HCl bei Raumtemperatur leicht schüttelnd inkubiert, um große DNA-Fragmente chemisch zu fragmentieren und ihre Überführung auf eine Nylon-Membran zu erleichtern. Die HCl-Lösung wurde durch eine Denaturierungslösung ausgetauscht und diese nach 30 min durch eine Neutralisierungslösung. Nach weiteren 30 min wurde das Gel in 10xSSC überführt und schließlich in einem Standard-Kapillarblot über Nacht auf eine Nylon-Membran (Hybond) übertragen. Die Membran wurde am nächsten Tag markiert, gesäubert und in einem UV-Crosslinker (Stratagene) nach Hersteller-Angaben bestrahlt, um die DNA kovalent an die Membran zu binden.

2.2.5.2 Hybridisierung

Eine geeignete Sonde wurde mittels PCR generiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und über das QiaexII Kit (Qiagen) aufgereinigt. Etwa 400 ng Probe wurden durch Einbau von [^{32}P]dCTP (Hartman Analytic) über Ready-to-go-beads (Pharmacia) nach Hersteller-Angaben mit mindestens 10^9 cpm/ μg Probe radioaktiv markiert. Der Filter wurde für 4h bei 68°C in Church Puffer mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ denaturiertem Lachs-Sperma vorhybridisiert, mit der Sonde unter den gleichen Bedingungen über Nacht hybridisiert und anschließend in Church Waschpuffer für 5 min bei Raumtemperatur sowie dreimal für 30 min bei 68°C gewaschen. Autoradiographische Signale wurden über das BAS Screening System (Fuji) detektiert.

2.2.5.3 Filterhybridisierung

Auf die angeimpften LB-Platten wurden Nylon-Rundfilter (C/P Lift, Biorad) aufgebracht, markiert, umgedreht auf neue LB-Platten gelegt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Filter für 15 min auf mit Denaturierungslösung getränkten Whatman-Filter überführt, dann für 15 min auf mit Neutralisierungslösung getränkten Whatman-Filter und schließlich für 15 min auf mit 10xSSC getränkten Whatman-Filter. Die Membrane wurden gesäubert und in einem UV-Crosslinker (Stratagene) nach Hersteller-Angaben bestrahlt. Hybridisierung und Auswertung erfolgte wie oben beschrieben. Detektierte Kolonien konnten auf den Original-Platten lokalisiert, isoliert und sequenziert werden.

2.3 RNA

2.3.1 RNA-Isolierung aus dem Ischiasnerv der Ratte

Alle zur RNA-Isolierung verwendeten Lösungen wurden mit ddH₂O_{DEPC} angesetzt; alle entnommenen Proben wurden direkt auf Trockeneis überführt sowie jede RNA wie auch cDNA so lange wie möglich bei -20°C gelagert. Die Ischiasnerven 7 Tage alter Ratten wurden entnommen und die RNA aus diesen mit Hilfe des RNeasy Prep Systems (Qiagen) isoliert. Zusätzlich erfolgte ein DNase-Inkubation mit 10 U DNase (Roche) und 10 U RNasin (Pharmacia) in 10 mM MgCl₂ bei Raumtemperatur für 1h. Die RNA wurde über eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion aufgereinigt und über Nacht bei -20°C durch Zugabe von 1/10 Volumen Natrium Acetat und zwei Volumen absolutem Ethanol gefällt. Nach einer einstündigen Zentrifugation bei 14.000 Upm und 4°C in einer Haereus Tischzentrifuge wurde das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 µl ddH₂O_{DEPC} gelöst.

2.3.2 Reverse Transkription (RT) und RT-PCR

Die RNA muss vor einer PCR in einer Reversen Transkription in cDNA umgeschrieben werden. Hierbei wurde die Reverse Transkriptase Superscript II (GibcoBRL) wie folgt verwendet:

1 μ g	total RNA	10 min	Raumtemperatur
3 μ l	dNTP (2.5 mM je dNTP)	1h	42°C
1 μ l	Oligo(dT) (50 μ M)	5 min	99°C
2 μ l	DTT	Lagerung	-20°C
10 U	RNasin		
1 U	Superscript II		
ad 19 μ l	ddH ₂ O _{DEPC}		

Jeweils 2 μ l der cDNA wurden in wie oben beschriebenen PCRs eingesetzt.

2.3.3 Quantitative PCR (Q-PCR)

Die zu untersuchenden Zellen wurden 1 d, 3 d oder 7 d unter normalen Kulturbedingungen gehalten und die RNA anschließend mit Hilfe des RNeasy-Systems (Qiagen) isoliert und in 30 μ l RNase-freiem Wasser eluiert. Standardmäßig wurde der gesamte Ansatz in einer wie oben beschriebenen RT in cDNA umgeschrieben und auf 250 μ l mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Die quantitative PCR erfolgte mit Gen-spezifischen Primern in einem GeneAmp 5700 mittels des SybrGreen-Systems (Applied Biosystems), wobei als Referenz das Gen der Glyceraldehydphosphat-Dehydrogenase (rGAPDH) bzw. der Ornithin-Decarboxylase (rODC) diente.

2.4 Proteine

2.4.1 Protein-Isolation

Die betreffenden Zellen wurden mit wenig Trypsin von den Kulturgefäßen abgelöst, die Reaktion mit der gleichen Menge FCS gestoppt und die Zellsuspension abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde einmal mit 500 μ l PBS gewaschen, erneut abzentrifugiert und schließlich in 50 μ l PBS aufgenommen. Ein Abbau der Proteine wurde durch Zugabe von Proteinase-Inhibitoren unterbunden (1 μ g/ml Pepstatin, 2 mM Pefablock, 1 μ g/ml

Leupeptin, 5 mM EDTA). Durch mehrfaches Aufziehen der Suspension in eine Spritze mit einer 0.6x30 mm Nadel wurden die Zellen homogenisiert und für 2 h bei 4°C mit 15.000xg pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet mit den Membranfraktionen in 30 μ l PBS mit Proteinase-Inhibitoren gelöst.

2.4.2 Western Blot Analyse

Jeweils 30 μ l Membranfraktion bzw. Überstand wurden mit SDS-Probenpuffer (Endkonzentration: 2 % SDS, 10 % Glycerol, 60 mM Tris-HCl pH 6.8, 1 % Bromphenolblau, 100 mM DTT) gemischt, für 5 min bei 95°C denaturiert und auf einem 15 %igem Polyacrylamid-Gel nach der Methode von Laemmli (1970) in einer SE 250 Mighty Small Gelapparatur (Hoefer, 10x8 cm Gelformat) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden in einer Semidry-Blot-Apparatur (2117 Multiphor, Pharmacia) mit 0.8 mA/cm² auf eine Nitrocellulose-Membran (Amersham-Pharmacia) übertragen. Das Gel wurde nach dem Blotten mit Coomassie Blau zur optischen Überprüfung der Rest-Proteinmengen gefärbt. Die NC wurde zur Absättigung freier Bindungsstellen in TBS mit 3 % Milchpulver/1 % BSA über Nacht bei 4°C inkubiert, dreimal 20 min mit 0.05 % Tween/TBS gewaschen und für 1 h mit dem 1. Antikörper bei Raumtemperatur in TBS inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 0.05 % Tween/TBS wurde für 1h der Peroxidase-gekoppelte 2. Antikörper zur Blot-Membran gegeben, zweimal mit 0.05 % Tween/TBS und ein weiteres mal mit TBS gewaschen und die gebildeten Immunkomplexe mit Hilfe des ECL-Systems (Amersham) detektiert.

2.5 Zellkultur

2.5.1 Zellkultur von Fibroblasten der Maus

2.5.1.1 Präparation

Föten im Alter von 13 Tagen nach der Verpaarung der Eltern wurden freigelegt und gut in PBS gewaschen. Der Eingeweidesack mit Herz und Leber wurden mit einer Pinzette entfernt. Im Anschluss wurden die Föten mit einer Pinzette grob zerkleinert und durch eine Spritze mit einer 0.6x30 mm Nadel in ein 50 ml Reaktionsgefäß zerdrückt. Nach Zugabe von sterilisierten Glasperlen, einem Rührfisch und 10 ml Trypsin-EDTA

mit 100 μ l DNase (8 mg/ml, Roche) wurde die Suspension bei 37°C auf einem Rührgerät gerührt, wobei zweimal nach jeweils 30 min 10 ml Trypsin-EDTA/DNase hinzugegeben wurde. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und 10 min bei 1400 Umdrehungen/min in einer Hettich Rotanta/R zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml MEF resuspendiert und mit 10 ml MEF je zwei verwendeten Föten verdünnt. Je 10 ml Zellsuspension wurden auf eine Zellkulturschale (\varnothing 17 cm) gegeben und unter Standardbedingungen (37°C, 10 % CO₂) gehalten. Der Mediumwechsel erfolgte alle 24 h. Fibroblasten mit einem Neomycin-Resistenzgen wurden freundlicherweise von Prof. Rütter, Düsseldorf, zur Verfügung gestellt.

2.5.1.2 Passagieren und Einfrieren

Nach drei Tagen wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 5 min mit 5 ml Trypsin bei 37°C inkubiert. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 5 ml MEF inaktiviert. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei 1400 Umdrehungen/min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml MEF resuspendiert, mit 50 ml MEF verdünnt und auf 5 Zellkulturschalen (\varnothing 10 cm) verteilt. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie wie oben beschrieben abtrypsiniert, in 1 ml kaltem Einfrier-MEF resuspendiert und mit je 6 ml kaltem Einfrier-MEF verdünnt. Je 1 ml Zellsuspension wurde in Kryo-Einfrierröhrchen verteilt, zunächst über Nacht bei -20°C gelagert und dann in einen Stickstofftank überführt.

2.5.1.3 Auftauen

Die Zellen eines Kryo-Röhrchens wurden mit 1 ml vorgewärmtem MEF angetaut und rasch bei 37°C aufgetaut. Sobald kein gefrorenes Medium mehr sichtbar war, wurden die Zellen in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit 9 ml MEF überführt und 10 min bei 1400 Umdrehungen/min abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml MEF resuspendiert, mit 30 ml MEF verdünnt, auf drei Zellkulturschalen (\varnothing 10 cm) verteilt und unter Standardbedingungen gehalten.

2.5.1.4 Mitomycin C Behandlung

Fibroblasten dienen als Adhäsions- und Ernährungshilfe für Embryonale Stammzellen und müssen mittels Mitomycin C Teilungs-inaktiviert werden. Zellkulturschalen mit Fibroblasten wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 5 ml MEF mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Mitomycin C 4 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und wie oben beschrieben abtrypsiniert, zentrifugiert, in 1 ml MEF resuspendiert, in einer Thoma-Zellzählkammer gezählt und in einer adäquaten Zellzahl ausplattiert.

2.5.2 Embryonale Stammzellen

2.5.2.1 Auftauen, Passagieren und Einfrieren

Die verwendeten Embryonale Stammzellen (ES) der Linie E14.1 wurden freundlicherweise von Prof. Rütther, Düsseldorf, zur Verfügung gestellt. Eingefrorene ES wurden durch Zugabe von 1 ml vorgewärmten MES angetaut und rasch bei 37°C aufgetaut. Sobald kein gefrorenes Medium mehr sichtbar war, wurden die Zellen in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit 9 ml MES überführt und 10 min bei 800 Umdrehungen/min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml MES resuspendiert und auf eine Zellkulturschale (\varnothing 10 cm) gegeben, welche mit Mitomycin C inaktivierten Fibroblasten bewachsen war. Der Mediumwechsel mit MES erfolgt alle 24 h. Das weitere Passagieren und Einfrieren erfolgte mit MES wie oben beschrieben. Eine Passage erfolgte immer dann, wenn die einzelnen ES-Kolonien eine mittelgroße Ausdehnung hatten, aber noch relativ weit voneinander entfernt waren.

2.5.2.2 Elektroporation

Fünf mit ES bewachsene Zellkulturschalen (\varnothing 10 cm) wurden abtrypsiniert, die Zellen abzentrifugiert und die Zellzahl in einer Thoma-Kammer bestimmt. Von der erhaltenen Zellzahl wurde die Anzahl der Fibroblasten abgezogen. Je zu transfizierenden Vektor wurden 5×10^6 ES in 15 ml Reaktionsgefäße überführt sowie 5×10^5 ES für den Kontrollvektor und die gleiche Anzahl für eine Leerkontrolle. Die Zellen wurden erneut für 10 min bei 800 Umdrehungen/min abzentrifugiert und in 800 μl PBS aufgenommen. In Elektroporationsküvetten wurde je 25 μg linearisierter Vektor oder 5 μg linearisierter Kontrollvektor vorgelegt, eine Küvette dient als Leerkontrolle. Die ES wurden hinzugegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Elektroporation erfolgte nach Standardeinstellungen.

Die Zellen wurden mit 10 ml MES zweimal kurz resuspendiert und auf Zellkulturschalen (\varnothing 10 cm) gegeben, die mit Mitomycin C inaktivierten, Neomycin-resistenten Fibroblasten bewachsen waren. Insgesamt wurden die mit dem Vektor elektroporierten Zellen auf 10 Platten verteilt und der Kontrollvektor sowie die Leerkontrolle auf jeweils eine.

2.5.2.3 Selektion und Vereinzelnung

In den ersten zwei Tagen nach der Elektroporation erfolgte jeweils nach 24 h ein Mediumwechsel mit MES, in den weiteren zwölf Tagen mit MES und 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 als Neomycin-Derivat. Einen Tag vor dem Zeitpunkt der Vereinzelnung wurden mit Mitomycin C behandelten Fibroblasten auf eine entsprechende Anzahl an Zellkultur-Platten mit 96 Vertiefungen ausplattiert. Die selektionierten ES wurden zweimal mit PBS gewaschen und schließlich in PBS inkubiert. Der Fibroblastenrasen um eine einzelne ES Kolonien wurde mit einer Pipettenspitze an einer 200 μl Pipette gelöst und die gesamte Kolonie in 50 μl Trypsin-EDTA überführt, 7 min bei 37°C inkubiert und nach Zugabe von 100 μl MES auf jeweils eine Vertiefung dreier Zellkultur-Platten mit 96 Vertiefungen verteilt. Jeweils nach 24 h wurde das Medium gewechselt, in den ersten drei Tagen mit 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418. Wenn die ES Kolonien eine ausreichende Dichte aufwiesen, wurden zwei Kulturplatten wie unter 2.5.1.2 beschrieben eingefroren und die dritte Platte zur Charakterisierung der ES-Kolonien verwendet.

2.5.2.4 Charakterisierung von ES-Kolonien

ES-Zellen wurden in Zellkultur-Platten mit 96 Vertiefungen bis zur Konfluenz gehalten. Kam es vier Tage hintereinander über Nacht zu einem Farbumschlag des Medium-Indikators, wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und über Nacht bei 60°C in einer feuchten Atmosphäre mit jeweils 50 μl Lysepuffer pro Vertiefung inkubiert. Nach Zugabe von 100 μl NaCl/absoluter Ethanol wurde die Kulturschale für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, so dass sich die DNA am Gefäßgrund ansammelte. Der Überstand wurde durch vorsichtiges Umdrehen der Zellkulturplatte abgegossen, die DNA dreimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und durch Zugabe von 25 μl ddH₂O für 20 min bei 65°C in einer feuchten Atmosphäre gelöst. Die Restriktion mit einem entsprechenden Restriktionsenzym erfolgte durch Zugabe von 10 μl Enzymmix (3.5 μl 10fach

Puffer, 50 U Enzym, ad 10 μl ddH₂O) und über Nacht Inkubation bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre.

2.5.3 Zellkultur von Schwanzzellen der Ratte

Schwanzzellen der Ratte wurden freundlicherweise von Frau Brigida Ziegler zur Verfügung gestellt. Die Präparation der Ratten Schwanzzellen erfolgte nach Brockes *et al.* (1979). Die Ischiasnerven von sechs adulten Ratten wurden herauspräpariert, gesäubert und mit Trypsin sowie Collagenase für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch 0.7 mm sowie 0.4 mm Kanülen trituiert, durch 60 μm Gaze filtriert und in zwei T25er Flaschen mit Medium ohne Forskolin ausplattiert. Nach 24 h wurde zum Medium AraC hinzugegeben (10 μM), welches als Mitose-Inhibitor das Absterben der schnell proliferierenden Fibroblasten bewirkt. Nach sieben bis acht Tagen wurden die Zellen passagiert und eine erste Komplementlyse mit Komplement extrahiert aus Kaninchen durchgeführt. Die Zellen wurden in Proliferationsmedium mit 2 μM Forskolin und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ GGF gehalten, erneut passagiert und einer weiteren Komplementlyse unterzogen. Die erhaltenen Schwanzzellen wurden weiter passagiert, eingefroren oder für die beschriebenen Versuche eingesetzt.

2.5.3.1 PDL-Beschichtung der Zellkulturgefäße

Damit Schwanzzellen an Zellkulturgefäßen adhäreren, müssen diese mit Poly(D)-Lysin (PDL, Sigma) beschichtet sein. Hierzu wurde PDL 1:1000 in PBS verdünnt (Endkonzentration 0.1 mg/ml) und die Zellkulturgefäße für 30 min bei 37°C mit dieser PDL-Verdünnung inkubiert. Die Gefäße wurden daraufhin dreimal mit PBS gewaschen und mit einer ausreichenden, vorgewärmten Menge an SC-Medium befüllt.

2.5.3.2 Auftauen, Passagieren und Einfrieren

Das Auftauen, Passagieren und Einfrieren erfolgte wie unter 2.5.1.2 und 2.5.1.3 beschrieben.

2.5.4 Zellkultur von MDCK-Zellen

MDCK-Zellen wurden von der *European Collection of Cell Cultures* (ECACC, GB) bezogen und auf unbeschichteten Kultur-Flaschen in SC-Medium ohne Forskolin wie Schwanzzellen gehalten.

2.5.5 Überexpression von Plasmolipin in Schwanzzellen aus der Ratte und in MDCK-Zellen

Die Plasmolipin-cDNA aus der Ratte wurde in einen pIRES2-EGFP-Vektor (BD Bioscience/Clontech) kloniert; das verwendete Konstrukt erhielt die Bezeichnung pIPla. Als Kontrollvektor diente der unveränderte pIRES2-Vektor. Zur Transfektion der pIRES-Konstrukte wurden 24 h vor der Transfektion jeweils 10.000 Ratten Schwanzzellen auf PDL-beschichtete Glasplättchen (\varnothing 13 mm) ausplattiert. Je Glasplättchen wurden 0.5 μ g pIRES bzw. pIPla in 20 μ l HEPES-DMEM sowie in einem weiteren Reaktionsgefäß 3 μ l Fugene (Roche) in 80 μ l HEPES-DMEM gemischt, 10 min inkubiert, vereinigt und weitere 10 min inkubiert, bevor die Suspension zu den Zellen hinzugegeben wurde. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 4 % PFA für 15 min fixiert, dreimal mit PBS gewaschen und über Nacht mit dem α Pla4-Antikörper (1:300 in PBS) inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem Cy3-Antikörper (1:1000 in PBS) für 1 h. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen, kurz mit DAPI inkubiert, erneut mit PBS gewaschen und schließlich mit Fluoromount auf Objektträger eingebettet.

2.5.6 Anreicherung von Plasmolipin überexprimierenden Schwanzzellen

Eine Anreicherung der pIPla-transfizierten Zellen erfolgte mit Hilfe des MACS Systems (Mylteni), bei dem der CD14.1-Vektor zusammen mit dem pIRES-Vektor ko-transfiziert wird. CD14 exprimierende Zellen können dann durch α CD14-Antikörper, die mit magnetischen Kügelchen versehen sind, erkannt und durch einen Magneten von den übrigen Zellen abgetrennt werden. Zur Transfektion der pIRES-Konstrukte wurden 24 h vor der Transfektion jeweils 1 bis 1.5 Mio Ratten Schwanzzellen auf PDL-beschichtete Platten (\varnothing 17 cm) ausplattiert. Je 15 μ g pIRES bzw. pIPla wurden in 200 μ l HEPES-DMEM sowie in einem weiteren Reaktionsgefäß 54 μ l Fugene (Roche) in 1.8 ml HEPES-DMEM

gemischt, 10 min inkubiert, vereinigt und weitere 10 min inkubiert, bevor die Suspension zu den Zellen hinzugegeben wurde. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 1.5 ml Trypsin abgelöst. Diese Reaktion wurde nach 2 min mit 300 μ l FCS gestoppt, und 200 μ l CD14 Beads wurden hinzugegeben. Die Suspension wurde 15 min geschwenkt und mit 500 μ l PBE (PBS mit 0.5 % BSA und 5 mM EDTA) auf eine MACS-Säule gegeben. Die durch ein Magnetfeld zurückgehaltenen CD14 positiven Zellen wurden viermal mit PBE gewaschen und schließlich mit 500 μ l PBE außerhalb des Magneten eluiert, um entweder für weitere Versuche ausplattiert oder für eine RNA- bzw. Proteinpräparation verarbeitet zu werden.

2.6 RNA Interferenz (RNA_i)

RNA Oligomere mit der Zusammensetzung N₁₉dTdT wurden entsprechend der Plasmaplipin cDNA- Sequenz der Ratte ausgesucht und von der Firma Dharmacon Research Inc. (USA) bezogen. Hierbei wurde automatisch ein jeweils komplementärer RNA-Strang synthetisiert. Es kamen 2 verschiedene RNA-Paare zum Einsatz:

rPla1 _{sense}	GUUGUAUAUGGUGCCCUGGdTdT
rPla1 _{antisense}	dTdTCAACAUAUACCACGGGACC
rPla2 _{sense}	CCAGCGCUCGGCUGCCUCUdTdT
rPla2 _{antisense}	dTdTGGUCGCGAGCCGACGGAGA

Die Oligomere wurden nach Hersteller-Angaben deprotektiert, entsalzt und in einer Endkonzentration von 3 μ g/ μ l in RNase freiem Wasser gelöst. Zur Bildung von Doppelsträngen wurden jeweils 150 μ g senseRNA mit 150 μ g des komplementären RNA-Oligomers in einem Hybridisierungspuffer (Dharmacon, USA) vermischt, für 1 min bei 90°C denaturiert und dann für 1 h bei 37°C inkubiert (nach Elbashir *et al.*, 2001).

2.6.1 Transfektion von siRNAs mittels Oligofectamine

Für eine erfolgreiche Transfektion mit RNA Oligomeren ist eine relativ geringe Zelldichte mit einer Konfluenz von ca. 60 % notwendig. Die zu transfizierenden Zellen wurden jeweils

am Vortag abtrypsiniert, pelletiert und gezählt. Für eine PDL-beschichtete Reaktionsplatte mit sechs Vertiefungen wurden pro Vertiefung 10.000 Zellen verwendet, die bis zum nächsten Tag in SC-Medium gehalten wurden. Vor der eigentlichen Transfektion wurde das Medium durch 800 μl RNA-Transfektionsmedium ohne Antibiotika ausgetauscht. Je Vertiefung wurden 11 μl OptiMEM (Invitrogen) mit 4 μl Oligofectamine (Invitrogen) für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde 1.6 μg RNA (doppelsträngig, sense Strang oder antisense Strang) in 175 μl OptiMEM vorgelegt und zum verdünnten Oligofectamine hinzu gegeben. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz zu den Zellen gegeben und nach 24 h durch neues SC-Medium ausgetauscht.

2.6.2 Expression von shRNA mittels pSUPER-Konstrukt

Der pSUPER-Vektor (freundlicherweise überlassen von Dr. Reuben Agami, The Netherlands Cancer Institute) ist ein auf dem pBluescript KS (Clontech) basierender Expressionsvektor mit H1-RNA Promotor (Abb. 4; Brummelkamp *et al.*, 2002).

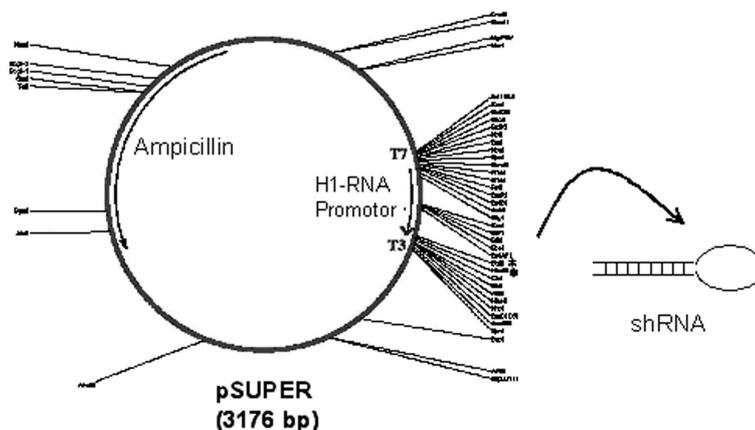


Abbildung 4: Vektorkarte des pSUPER-Plasmids

In den pBluescript-Vektor (Clontech) wurde ein Polymerase III-Promotor eingebracht (Promotor des Histons H1). Oligomere der Sequenz GATCCCC N₁₉^{sense} ttcaagaga N₁₉^{antisense} TTTTGGAAA können in eine *Bgl*III- sowie eine *Hind*III-Schnittstelle inkloniert und exprimiert werden. Die entstehenden RNA-Oligomere bilden aufgrund der beiden gegenläufigen identischen Sequenzen eine Haarnadel-Struktur aus. Modifiziert nach Brummelkamp *et al.* (2002).

In eine *BglII*- und eine *HindIII*-Schnittstelle können synthetische 64nt DNA-Oligomere folgender Sequenz inkloniert werden:

GATCCCC N₁₉^{sense} ttcaagaga N₁₉^{antisense} TTTTTGGAAA.

Mit Hilfe dieses Vektors können Zellen stabil transfiziert und bei einer Ko-Transfektion mit CD14 exprimierenden Vektoren auch angereichert werden. Für die Untersuchung an Plasmolipin wurde die bereits beim rPla1 RNA-Oligomer verwendete Sequenz GUUGU-AUAUGGUGCCCUGG eingesetzt; der modifizierte Vektor wird im Folgenden als pSPla bezeichnet. Als Kontrollvektor wurde der unveränderte pSUPER verwendet. Die weitere Versuchsdurchführung ist identisch mit der für die pIRES-Konstrukte.

2.7 Indirekte Bestimmung der Adhäsion

Sterile Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (MaxiSorb, Nunc) wurden mit 100 μ l Laminin oder Fibronectin (20 μ g/ml in PBS) je Vertiefung versehen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach einer Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch Inkubation mit 1 % BSA wurde dreimal mit PBS gewaschen. Eine Reihe von Vertiefungen wurde als Kontrolle nur mit Medium befüllt, während die äußeren Reihen zur Kontrolle gar nicht befüllt wurden. Transfizierte bzw. unbehandelte Ratten Schwanzzellen wurden in einer Dichte von 10.000 Zellen je Vertiefung in SC-Medium ausgesät und für 3 h unter normalen Bedingungen gehalten. Um nicht adhärierende Zellen abzulösen, wurde die Platte 15 min bei 200 Upm geschüttelt und das Medium durch 100 μ l frisches ersetzt. Für den Test wurden PMS-Stammlösung (Phenazinmethosulfat, Elektronenkoppler, 920 μ g/ml in PBS) und MTS-Stammlösung [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-Tetrazolium, 2 mg/ml in PBS] im Verhältnis 1:20 vermischt und zu je 20 μ l auf die Vertiefungen verteilt. Nach einer dreistündigen Inkubation erfolgte die stündliche Auswertung mit einem ELISA-Plattenlesegerät bei einer OD von 490 nm.

2.8 Untersuchung der Apoptose mit dem TUNEL-Assay

Mit RNA-Oligomeren transfizierte Ratten Schwanzzellen wurden einen Tag nach der Transfektion abtrypsiniert, mit einer Zellzahl von 15.000 je Vertiefung auf LabTeks (Nalge Nunc Inc.) ausplattiert und ein bis drei Tage in SC-Medium gehalten; mit pIRES- oder pSUPER-Konstrukten transfizierte Zellen wurden direkt nach der Anreicherung auf Lab-

Teks ausplattiert. Zur Fixierung der Zellen wurden die Zellen zunächst dreimal mit PBS gewaschen, dann für 1 h mit 2 % PFA/PBS fixiert und erneut dreimal mit PBS gewaschen. Um die Zellen zu permeabilisieren, wurden sie für 2 min mit Permeabilisierungspuffer (0,1 % Natrium-Citrat, 0,1 % Triton X-100 in PBS) auf Eis inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen und für 1 h mit dem TUNEL-Reaktionsmix (Roche) bei 37°C im Dunkeln gehalten. Nach zweimaligem Waschen mit Blockierungspuffer (0,1 % Triton X-100, 0,5 % BSA in PBS) und weiteren drei Waschvorgängen mit PBS erfolgte eine Kernfärbung mit DAPI, ein kurzes Waschen in PBS und das Einbetten in Fluoromount (Southern Biotechnology Associates). Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenz-Mikroskop der Firma Nikon, wobei je Gesichtsfeld die DAPI-gefärbten Zellkerne bzw. die angefärbten apoptotischen Zellen gezählt wurden.

2.9 Bestimmung der Zellproliferation

Je 10.000 Ratten Schwanzzellen wurden in eine Vertiefung eines LabTeks ausplattiert und 24 h unter normalen Bedingungen gehalten. Die Zellen wurden mit 10 mM BrdU für 16 h inkubiert, mit kaltem Methanol für 10 min fixiert und mit PBS gewaschen. Nach einer Denaturierung mit 2 N HCl für 60 min bei 37°C erfolgte eine Neutralisierung mit 0.1 M Borat-Puffer, pH 8.5. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 60 min mit 6 µg/ml αBromodesoxyuridin Antikörper in PBS mit 0.1 % BSA inkubiert. Die Zellen wurden mehrfach mit PBS gewaschen, 60 min mit αMaus Cy3-Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert, erneut mehrfach mit PBS gewaschen und kurz mit DAPI oder SybrGreen (Applied Biosystems) inkubiert. Nach mehrfachem Waschen mit PBS wurden die Zellen in Fluoromount eingebettet, für 24 h kalt gestellt und anschließend wie der Apoptose-Assay ausgewertet.

2.10 Durchmusterung einer genomischen Maus DNA Bibliothek

Eine genomische Maus 129/SvevTACfBr P1 Bibliothek, bestehend aus 414750 Klone mit einer mittleren Insert-Größe von 146.6 kb, konnte vom Ressourcen Zentrum/Primär Datenbank (RZPD) des Deutschen Humanen Genom Projekts bezogen werden. Als Sonde diente das PCR-Produkt P3M5 aus der Plasmolipin cDNA der Ratte, welches den Bereich zwischen den Nukleotiden 372 und 1476 umfasst und mit [³²P]dCTP über Ready-to-go-

beads (Pharmacia) radioaktiv markiert wurde. Die Filter wurden für 1h bei 68°C in Church-Puffer und 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ denaturierter Lachs-Sperma DNA (Stratagene) vorhybridisiert, mit der radioaktiv markierten Sonde unter den gleichen Bedingungen über Nacht hybridisiert und in Church-Waschpuffer für 5 min bei Raumtemperatur sowie dreimal für 30 min bei 68°C gewaschen. Autoradiographische Signale wurden durch 48 h Exposition von Röntgen-Filmen (Kodak) bei -70°C detektiert und den Filterkoordinaten der jeweiligen P1 Klone zugeordnet.

2.11 Tiere

Die in dieser Arbeit verwendeten Tiere wurden in der Tierversuchsanlage Düsseldorf (TVA) gehalten und/oder aus dieser bezogen. Die Behandlung der Tiere erfolgte entsprechend des gültigen Tierschutzgesetzes.

3 Ergebnisse

3.1 Veränderung der Plasmolipin-Expression in Zellkultur

3.1.1 Reduktion der Plasmolipin-Expression über die RNA Interferenz (RNA_i)

Parallel zu Untersuchungen an Plasmolipin im Tiermodell wurden Versuche an Schwanzzellen in Zellkultur durchgeführt. Die Haltung dieser Zellen ist in der AG Molekulare Neurobiologie etabliert und gut charakterisiert, so dass eine Adaption an die neuen Versuchsbedingungen leicht zu bewerkstelligen war. Eine Möglichkeit, die Menge an Plasmolipin *in vitro* zu verändern und nachfolgende Auswirkungen zu studieren, ist die Verminderung der Plasmolipin RNA-Konzentration in den Zellen über die RNA Interferenz (RNA_i). Dies sollte mit Hilfe zweier Strategien erreicht werden:

1. Transfektion der Zellen mit kurzen, doppelsträngigen RNAs (short interfering RNAs, siRNAs)
2. Transfektion der Zellen mit einem Vektor, dessen Transkription zu einem kurzen Oligomer mit Haarnadel-Struktur führt. Die Verwendung des „MACS“-Systems ermöglicht eine Anreicherung transfizierter Zellen

3.1.2 Die Transfektion von Schwanzzellen der Ratte mit doppelsträngiger RNA führt zu einer verminderten Plasmolipin mRNA-Expression und zu einer verminderten Proteinmenge

Zwei Paare von doppelsträngigen RNA-Oligomeren (dsRNA) wurden nach den allgemein verwendeten Kriterien für siRNAs konzipiert (Arbeitsanweisung nach der Internetseite von Dr. T.Tuschl, Arbeitsgruppe Kombinatorische Biochemie, MPI für biophysikalische Chemie; Elbashir *et al.*, 2002):

rPla1	GUUGUAUAUGGUGCCCUGGdTdT
rPla2	CCAGCGCUCGGCUGCCUCUdTdT

Diese RNA-Oligomere wurden nach Hersteller-Angaben zu einem doppelsträngigen Oligomer zusammengeführt und im Spektralphotometer vermessen. Die Transfektion von

Schwanzzellen der Ratte erfolgte mittels Oligofectamine in DMEM ohne Antibiotika, wobei zusätzlich zur Transfektion mit dsRNA auch Kontrollansätze mit dem jeweiligen sense Oligomer, dem antisense Oligomer oder nur mit Oligofectamine durchgeführt wurden. Die Zellen sahen in allen Fällen auch mehrere Tage nach der Transfektion vital aus. Um zu überprüfen, ob die Transfektion mit dsRNA tatsächlich zu einer Reduktion der Plasmolipin-Expression führt, wurde die RNA-Expression über eine quantitative PCR bestimmt. Die RNA der einzelnen Ansätze wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und in einer sogenannten Q-PCR eingesetzt. Zum Ausgleich der Schwankungen zwischen den eingesetzten RNA-Mengen wurde zudem eine Q-PCR für die Referenzgene rGAPDH und/oder rODC durchgeführt, auf deren Werte die Expression anderer Gene normiert wurden, bevor ein Vergleich der einzelnen Zellpopulationen (Kontrollzellen sense rPla1, sense rPla2; Plasmolipin supprimierte Zellen ds rPla1, ds rPla2, as Pla1) untereinander stattfand.

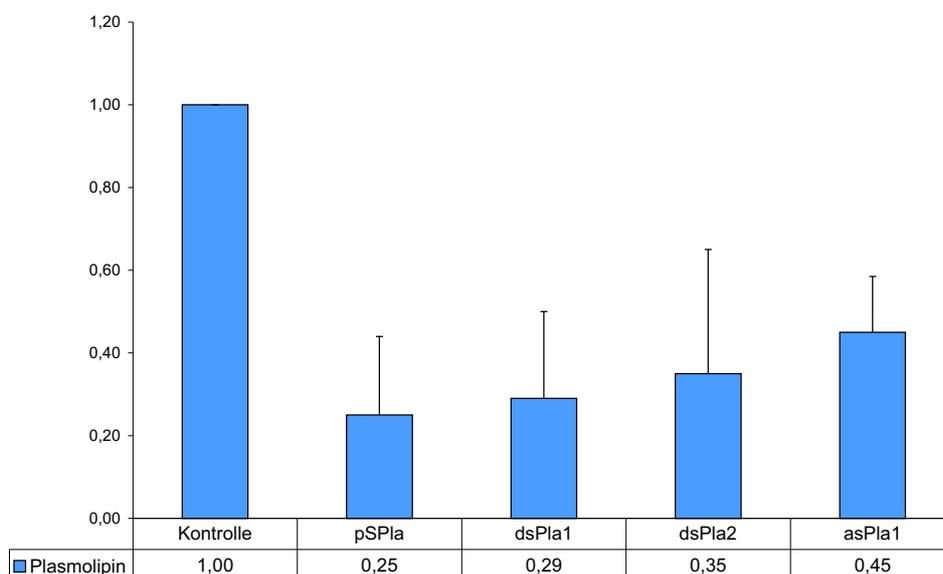


Abbildung 5: Expression von Plasmolipin in Plasmolipin supprimierten Schwanzzellen. Schwanzzellen, die mit dem RNA-Oligomer „antisense rPla1“ (asPla1) transfiziert wurden, zeigten in einer Q-PCR im Vergleich zu den Kontrollen eine reduzierte Plasmolipin-Expression von insgesamt ca. 45 %. Die Transfektion mit den doppelsträngigen RNA-Oligomeren dsPla1 und dsPla2 führte zu einem Rückgang der Plasmolipin-Expression auf ca. 30 % und die Anreicherung von pSPla-transfizierten Zellen zu einer noch geringeren Expression von ca. 25 % (in allen Fällen signifikant mit $p < 0.01$). Alle gezeigten Daten sind auf die Kontrollzellen normiert und stellen relative Werte dar.

Der Vergleich der Zustände „dsRNA“, „sense RNA“ und „antisense RNA“ mit der Kontrollsituation Oligofectamine zeigte für beide verwendeten RNA-Sequenzen rPla1 und rPla2, dass die Expression der Plasmolipin-RNA im Zustand „sense RNA“ unverändert blieb, während der Zustand „antisense RNA“ verminderte Werte auf bis zu 45 % aufwies (Abb. 5).

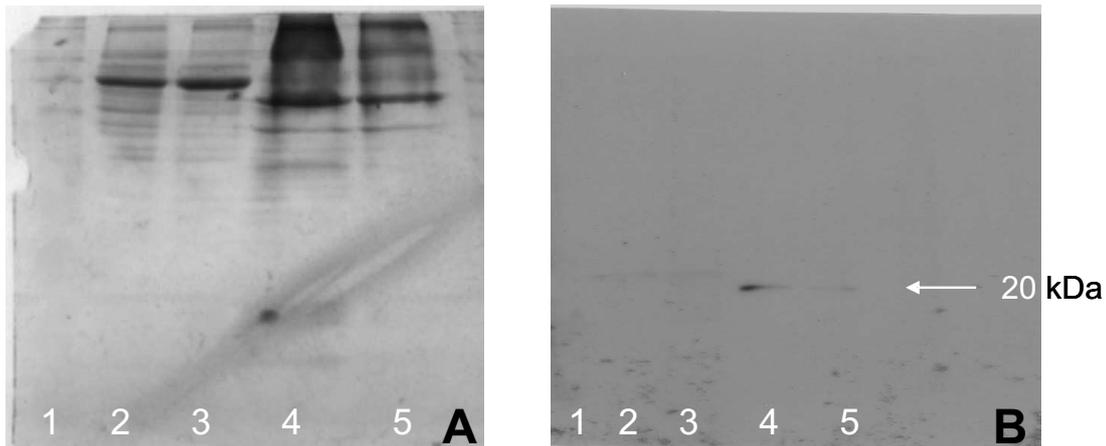


Abbildung 6: Western Blot Analyse von Schwanzzellen nach Transfektion mit RNA-Oligomeren

Jeweils 1.5 Mio Schwanzzellen wurden mit sense Pla1-RNA oder doppelsträngigen Pla1-Duplexen transfiziert, nach 48 h abtrysiniert und geschert. Die Suspension wurde abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet mit den Membranfragmenten in 30 μ l Puffer aufgenommen. Nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung der Proben in einem 15 %igen SDS-Gel wurden das Gel auf eine Nylon-Membran geblottet. Für **A** und **B**: Spur 1 Marker, Spur 2 Überstand sense rPla1, Spur 3 Überstand ds rPla1, Spur 4 Pellet sense rPla1, Spur 5 Pellet ds rPla1. Der Pfeil gibt die Laufhöhe von Proteinen mit 20 kDa Molekulargewicht an.

A Coomassie-Färbung eines Gels nach dem Blotten. Die aufgetragenen Überstände und Pellets zeigen zueinander ungefähr gleiche Proteinmengen.

B Western Blot Analyse des selben Gels unter Verwendung des Antikörpers α Pla4. Im Pellet der mit sense Pla1 RNA transfizierten Zellen lässt sich eine distinkte Bande in der Laufhöhe von 20 kDa detektieren; im Pellet der Plasmolipin supprimierten Zellen ebenfalls, allerdings schwächer.

Die Expression in Zellen, die mit doppelsträngiger RNA der Duplexe dsPla1 bzw. dsPla2 transfiziert wurden, lag durchschnittlich bei 0.29 bzw. 0.35 der Ausgangswerte und ist damit signifikant reduziert. Diese Reduktion konnte bei der Verwendung beider Referenzgene (GAPDH und ODC, gezeigte Daten beziehen sich immer auf GAPDH) nachgewiesen werden. Es stellte sich die Frage, ob die Reduktion der RNA-Expression auch zu einer Reduktion der Proteinmenge führt. Daher wurden die Zellen zwei Tage nach Transfektion

einer Western Blot Analyse unterzogen, wobei gleichzeitig mit einem Teil der Zellen eine Überprüfung durch eine quantitative PCR stattfand. Der Plasmolipin-Gehalt in Schwanzzellen der Zellkultur ist gering, so dass sich eine genaue Analyse als schwierig gestaltet und bislang auch noch nicht beschrieben worden ist. Bei der Verwendung des Antikörpers α Pla4 und sehr langen Expositionszeiten von über 10 min zeigte sich, dass zwei Tagen nach der Transfektion eine Abnahme der Plasmolipin-Proteinmenge erkennbar wurde (Abb. 6).

3.1.3 Die Transfektion mit shRNA kodierenden pSUPER-Konstrukten führt ebenfalls zu einer verminderten Plasmolipin-Expression

Eine weitere Möglichkeit zur Induktion von RNA_i-Prozessen ist die Verwendung von spezifischen Vektoren mit RNA-Polymerase III-Promotoren. Diese Promotoren erlauben eine Transkription kurzer RNAs in jedem (eukaryotischen) Zelltyp ohne Polyadenylierung des Transkripts (Brummelkamp *et al.*, 2002). Mit Hilfe dieses Vektors können Zellen stabil transfiziert werden. Klontiert man die gewünschte Sequenz invertiert repetitiv hintereinander (Abb. 4), so kann sie als kurzes RNA-Oligomer exprimiert werden, das sich aufgrund der komplementären Sequenzen zu einer Haarnadel-ähnlichen Struktur (short hairpin RNA, shRNA) faltet. Diese shRNAs werden vermutlich ebenso prozessiert wie doppelsträngige RNA und induzieren daher RNA_i.

Im Falle des Plasmolipins wurde die Basenfolge, die bereits dem doppelsträngigen RNA-Duplex dsPla1 zugrunde lag, als invertiert repetitive Sequenz in den pSUPER-Vektor kloniert. Im Folgenden wird dieses pSUPER-Konstrukt als pSPla bezeichnet. Die Ko-Transfektion von Schwanzzellen der Ratte mit den Vektoren pSUPER oder pSPla zusammen mit dem CD14.1-Vektor ermöglichte eine Anreicherung von Zellen über das MACS-System. Je Experiment konnten 15-20 % aller eingesetzten Zellen isoliert werden (200.000 von 1.5 Mio), was in etwa den erwarteten Werten aus anderen Experimenten entspricht (Angaben nach Dr. Patrick Küry, AG Molekulare Neurobiologie). Der Nachweis der Expressionsreduktion erfolgte wie oben beschrieben über eine quantitative PCR. Hierbei lag die Plasmolipin-Expression der mit pSPla transfizierten Schwanzzellen im Durchschnitt bei unter 25 % im Vergleich zu den Zellen, die mit dem unveränderten pSUPER-Vektor behandelt worden waren; in einzelnen Versuchen konnten sogar Werte von unter 1 % ge-

messen werden (Abb. 5). In allen weiteren Versuchen fanden nur solche Zellpopulationen Verwendung, deren Suppression über Q-PCR bestätigt wurde.

3.1.4 Überexpression von Plasmolipin

Zur Überexpression von Plasmolipin wurde der kodierende Bereich der entsprechenden Ratten cDNA in den pIRES2-EGFP-Vektor inkloniert. Im folgenden wird dieses pIRES-Konstrukt als pIPla bezeichnet. Die Transfektion von Schwanzzellen sowie die Anreicherung transfizierter Zellen erfolgte wie für das pSPla-Konstrukt beschrieben.

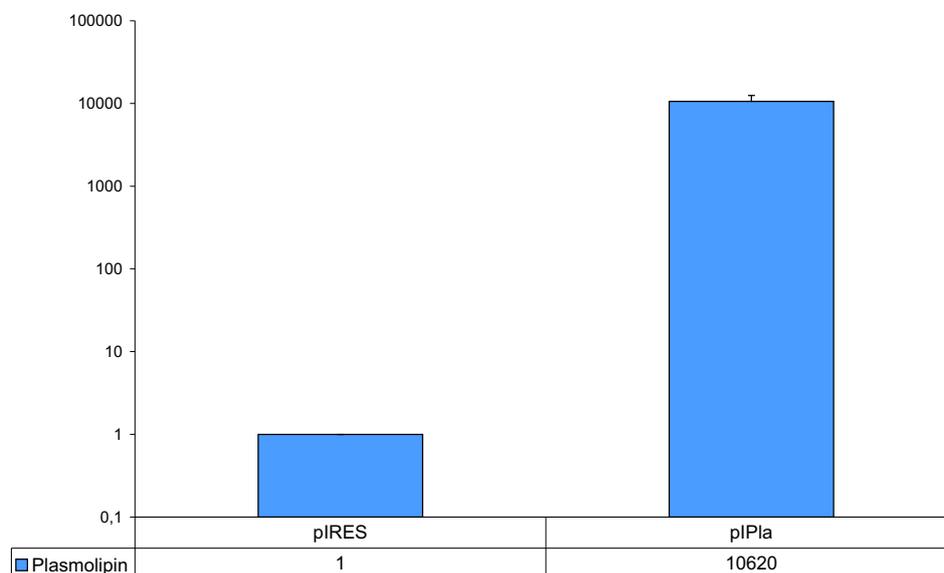


Abbildung 7: Überexpression von Plasmolipin in Schwanzzellen

Schwanzzellen wurden mit dem pIPla- oder dem pIRES-Vektor transfiziert und transfizierte Zellen über das MACS-System angereichert. Die Plasmolipin-Überexpression wurde in einer Q-PCR gemessen. Die mit pIPla-Vektoren transfizierten Zellen zeigten im Durchschnitt eine rund 10.000mal höhere Plasmolipin-Expression als die Kontrollzellen (signifikant mit $p < 0.01$).

Die Überprüfung der Expressionseffizienz des pIPla über eine quantitative PCR ergab, dass die mit pIPla-transfizierten Zellen eine rund 10.000mal höhere Menge an Plasmolipin-mRNA aufweisen als unbehandelte Zellen oder solche, die nur mit pIRES transfiziert worden sind (Abb. 7). Die Zellen beider Zellpopulationen (pIRES, pIPla) sahen bei visuellen Kontrollen vital aus.

3.1.5 Einfluss der Plasmolipin mRNA-Expression auf die Zellmorphologie

Zur Überprüfung der Morphologie wurden Plasmolipin supprimierte Schwanzzellen der Ratte auf Glasplättchen von 13mm Durchmesser ausplattiert, wie oben beschrieben mit RNA-Oligomeren transfiziert und mit α Pla4 als 1. Antikörper sowie Cy3 als 2. Antikörper immunzytochemisch angefärbt. Ebenso wurde mit Plasmolipin überexprimierenden Schwanzzellen und MDCK-Zellen verfahren.

Es ist anzumerken, dass die Zellmorphologie von Schwanzzellen in Zellkultur unter subkonfluenten Bedingungen zwar zum größten Teil einem Haupttyp entspricht, aber auch bis zu einem gewissen Grad variabel ist, da die äußere Form gerade bei Schwanzzellen zum Beispiel entsprechend der vorhandenen Zell-Zellkontakte etwas variieren kann. Die im folgenden beschriebenen Veränderungen stellen daher vielmehr eine Tendenz dar und keinen ausschließlichen Zelltyp, der auf die gesamte Zellpopulation zutrifft.

Unbehandelte Schwanzzellen der Ratte sind von schmaler, länglicher Gestalt mit langen Ausläufern an beiden Enden (Abb. 8A). Das Zytoplasma ist bei solchen Zellen kaum erkennbar und auch granuläre Strukturen sind so gut wie nicht sichtbar. Zum Teil können auch Zellen mit einem Delta-förmigen Zellkörper mit längeren Fortsätzen gefunden werden. Diese Morphologie änderte sich auch unter dem Einfluss von Oligofectamine, einzelsträngiger RNA-Oligomeren oder dem pSUPER-Vektor nicht. Zellen, in denen die Plasmolipin-Expression reduziert wurde, waren dagegen flächiger und weniger spindelförmig. Die Zellränder schienen etwas unebenmässiger zu sein und die Ausläufer verkürzt (Abb. 8C). Damit einher ging eine Veränderung der immunzytochemischen Anfärbung in der Zelle: In unbehandelten Zellen und solchen, die mit Oligofectamine, einzelsträngigen Oligomeren oder dem pSUPER-Vektor behandelt wurden, fand sich eine gleichmäßige, intensive Anfärbung des Plasmolipin-Proteins in kleinen, distinkten Partikeln (Abb. 8B). Besonders intensiv war eine Struktur nahe des Zellkerns angefärbt, dessen Aussehen ähnlich dem des Golgi-Apparates oder des rauhen Endoplasmatische Retikulum ist. Bei den Plasmolipin supprimierten Zellen blieb diese Struktur weiterhin gefärbt, die Gesamtfärbung reduzierte sich dagegen sehr stark.

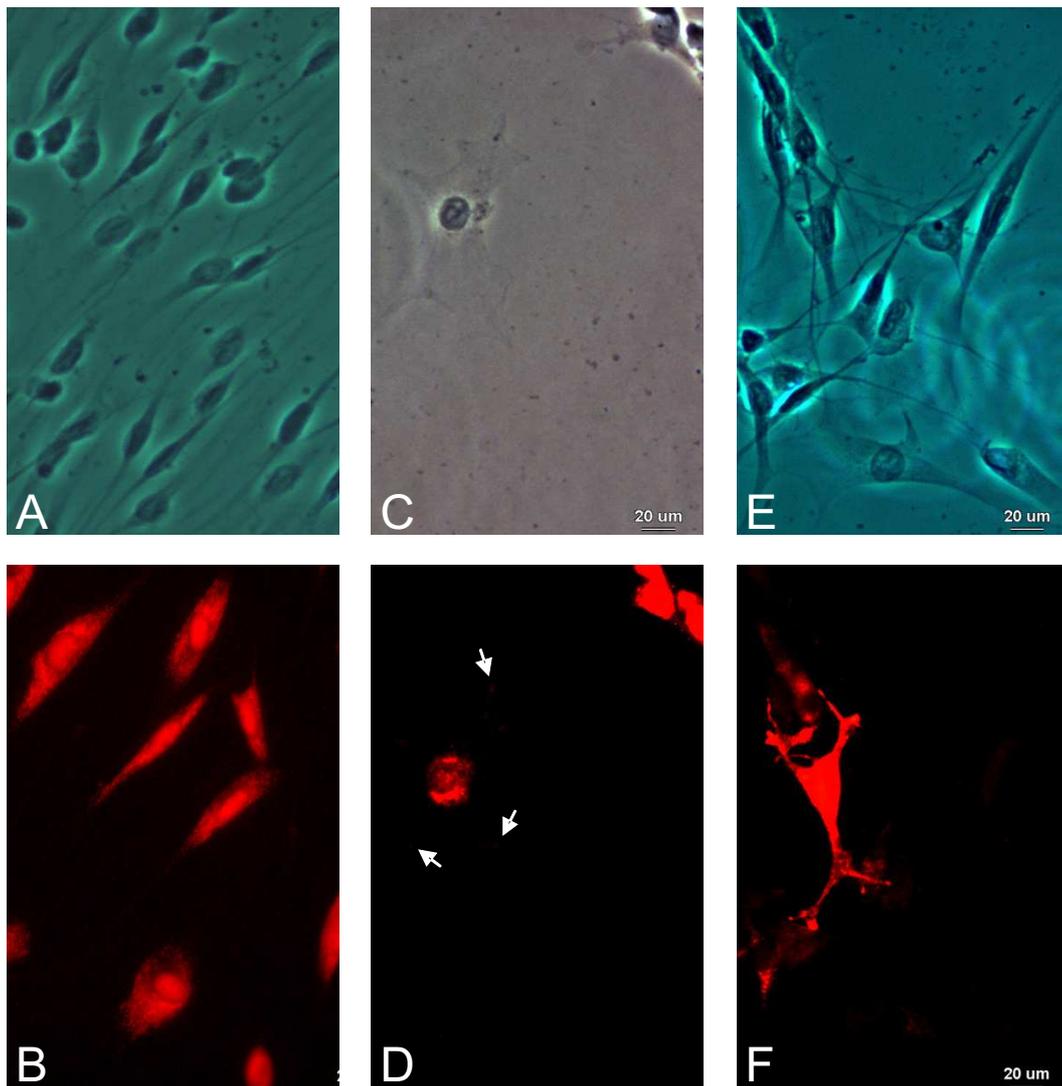


Abbildung 8: Zellmorphologie von Schwannzellen mit veränderter Plasmolipin-Expression
A, B Unbehandelte Schwannzellen der Ratte im Durchlicht und immunzytochemische Anfärbung des Plasmolipins. Die Zellen sind größtenteils spindelförmig, haben lange bipolare Ausläufer und sind gleichmäßig gefärbt (Aufnahme: 20fach, Antikörper α Pla4).
C, D Plasmolipin supprimierte Schwannzelle im Durchlicht und immunzytochemische Anfärbung des Plasmolipins. Plasmolipin reduzierte Zellen sind im Allgemeinen flächiger und haben nur kurze Fortsätze. Sie zeigen nur im Bereich um den Zellkern eine stärkere Anfärbung, einzelne angefärbte Membranbereiche sind mit Pfeilen markiert (Aufnahme: 20fach, Antikörper α Pla4).
E, F Plasmolipin überexprimierende Schwannzellen im Durchlicht und mit immunzytochemische Anfärbung des Plasmolipins. Die in **F** deutlich zu erkennende Plasmolipin überexprimierende Zelle weist gegabelte Fortsätze mit kugelförmigen Endungen auf. Bei den umliegenden Zellen handelt es sich um unveränderte oder schwach überexprimierende Schwannzellen, deren Färbung aufgrund der kurzen Aufnahmezeit kaum sichtbar ist. (Aufnahme: 20fach, Antikörper α Pla4).

Die Verteilung der distinkten Partikel wirkte grobkörniger und vereinzelter, in den Ausläufern fehlten sie vollständig (Abb. 8D). In allen untersuchten Fällen schienen die DAPI-gefärbten Zellkerne intakt. Die Überexpression von Plasmolipin in Schwannzellen rief eine deutliche Veränderung der Zellmorphologie hervor. Diese Zellen waren zumeist nicht spindelförmig, sondern bildeten längliche Filopodien aus, die sich meist gabelten und in runden Strukturen endeten (Abb. 8E). Zudem fand sich im Zytoplasma häufig größere Ansammlungen von granulären Strukturen. Die immunzytochemische Färbung war sehr intensiv, so dass meist die gesamte Zelle fluoreszierte (Abb. 8F).

Auch die Plasmolipin überexprimierenden MDCK-Zellen zeigten eine abweichende Zellform: Unbehandelte Zellen hatten kaum Ausläufer, aber glatte Ränder (Abb. 9A). Die immunzytochemische Anfärbung des Plasmolipins mittels α Pla4, der gegen das Protein der Ratte gerichtet ist, gelang nur sehr schwach (Abb. 9B). Überexprimierende MDCK-Zellen dagegen bildeten zum Teil längere Filopodien aus und zeigten vor allem kleine Ausläufer an der Zellrändern (Abb. 9C). Deutlich waren vermehrt granuläre Strukturen im Zytoplasma auszumachen. Auch hier war die immunzytochemische Färbung des exogenen Proteins sehr intensiv (Abb. 9D).

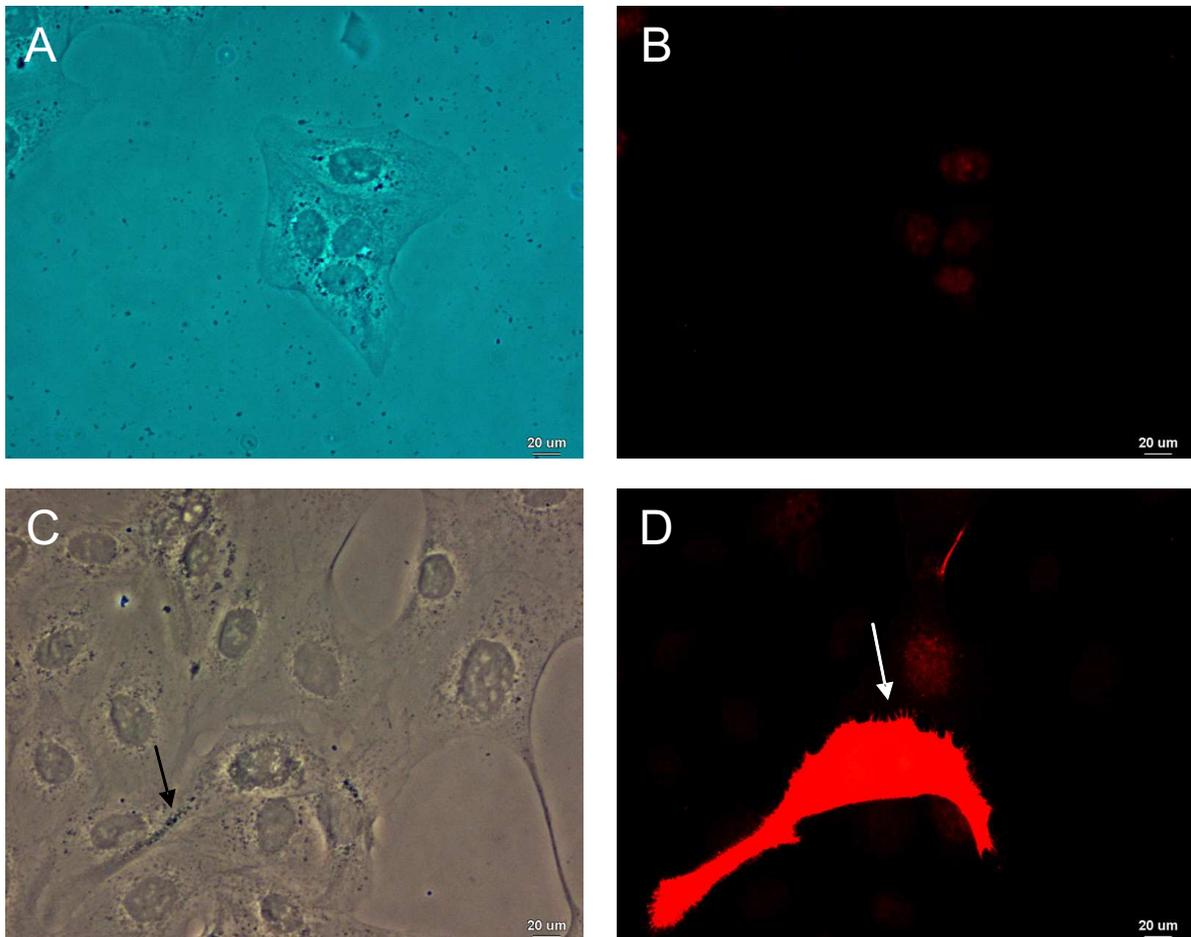


Abbildung 9: Zellmorphologie von Plasmolipin überexprimierenden MDCK-Zellen

A, B Unbehandelte MDCK-Zellen im Durchlicht und immunzytochemische Anfärbung des Plasmolipins. Die Zellen liegen eng aneinander und haben kaum Zellfortsätze. Sie zeigen nur im Zellkern eine schwache Anfärbung (Aufnahme: 20fach, Antikörper α Pla4).

C, D Plasmolipin überexprimierende MDCK-Zellen im Durchlicht und mit immunzytochemische Anfärbung des Plasmolipins. Die in **D** deutlich zu erkennende Plasmolipin überexprimierende Zelle weist einen starken Saum aus kurzen Filopodien auf (weißer Pfeil). Im Durchlicht lassen sich deutlich granuläre Strukturen im Zellinneren ausmachen (schwarzer Pfeil). Bei den umliegenden Zellen handelt es sich um unveränderte Zellen (Aufnahme: 20fach, Antikörper α Pla4).

3.1.6 Eine Verminderung der Plasmalipin mRNA-Expression führt nicht zu vermehrter Apoptose

Um die Apoptose der verwendeten Zellpopulationen zu bestimmen, wurde ein TUNEL-Assay verwendet. Bei Schwanzzellen in der Zellkultur finden sich häufig unterschiedliche Apoptoseraten zwischen verschiedenen Versuchen, während es bei Zellen eines Experimentes keine Unterschiede gibt. Die Zellen reagieren auf kleine Veränderungen in der Behandlung und den Inkubationsbedingungen oder auch auf die Anzahl der bereits durchlaufenen Passagen. Die einzelnen Experimente lassen sich daher am besten nicht zusammen darstellen, sondern sollten dahingehend betrachtet werden, ob die Tendenzen in den einzelnen Assays gleich sind. In allen durchgeführten Apoptose-Assays konnten dabei keine Unterschiede in den gemessenen Apoptosewerten bei den gleichzeitig untersuchten Zellpopulationen festgestellt werden (siehe Abb. 10). Wurden Schwanzzellen über 24 h mit Staurosporin (10 nM Endkonzentration, induziert Apoptose) inkubiert, waren etwa 90 % aller Zellen apoptotisch.

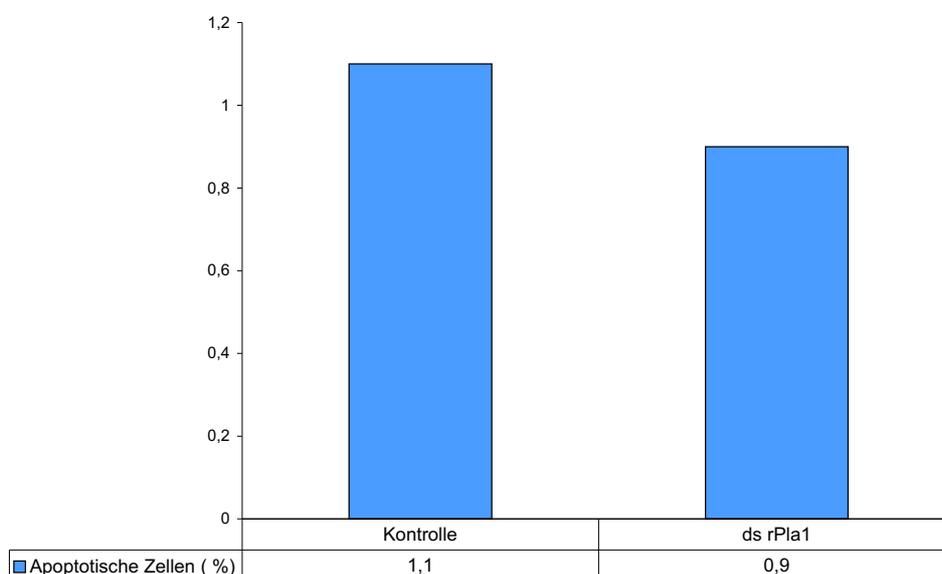


Abbildung 10: Apoptose von Schwanzzellen mit reduzierter Plasmalipin-Expression
Unbehandelte Schwanzzellen und Plasmalipin reduzierte Zellen (dsPla1-Oligomer) wurden auf LabTeks ausplattiert (10.000 Zellen je Feld), über Nacht unter normalen Bedingungen inkubiert und schließlich auf apoptotische Zellen mit dem TUNEL-Assay untersucht. Beide Zellpopulationen zeigten in etwa dieselbe Anzahl apoptotischer Zellen, in diesem repräsentativen Fall ca. 1 % aller Zellen.

Die Apoptoseraten der Zellen, die mit Oligofectamine oder sense Pla1 RNA transfiziert wurden, unterschieden sich nicht von denen, die mit doppelsträngiger dsPla1 RNA oder antisense Pla1 RNA transfiziert wurden. Ebenso verhält es sich mit den pSUPER- und pSPla-transfizierten Zellen, die ebenfalls nahezu gleiche Apoptosewerte aufweisen.

3.1.7 Eine Verminderung der Plasmolipin mRNA-Expression führt nicht zu einer veränderten Proliferation

Ein weiterer Parameter zur Bestimmung der Vitalität der untersuchten Zellen ist die Proliferation. Die Zellteilungsrate kann durch eine Inkubation der Zellen mit BrdU und die Detektion des BrdU-Einbaus in replizierte genomische DNA gemessen werden. Für die Zellteilungsrate gilt wie für die Apoptose eine relativ große Varianz zwischen den Versuchen, so dass es sinnvoll erscheint, jedes Experiment einzeln zu betrachten und die ermittelten Tendenzen miteinander zu vergleichen (siehe Abb. 11). Zur Überprüfung des Proliferations-Assays wurden unbehandelte MDCK-Zellen in einem ähnlich durchgeführten Test eingesetzt und zeigten eine Proliferation von ca. 60 %.

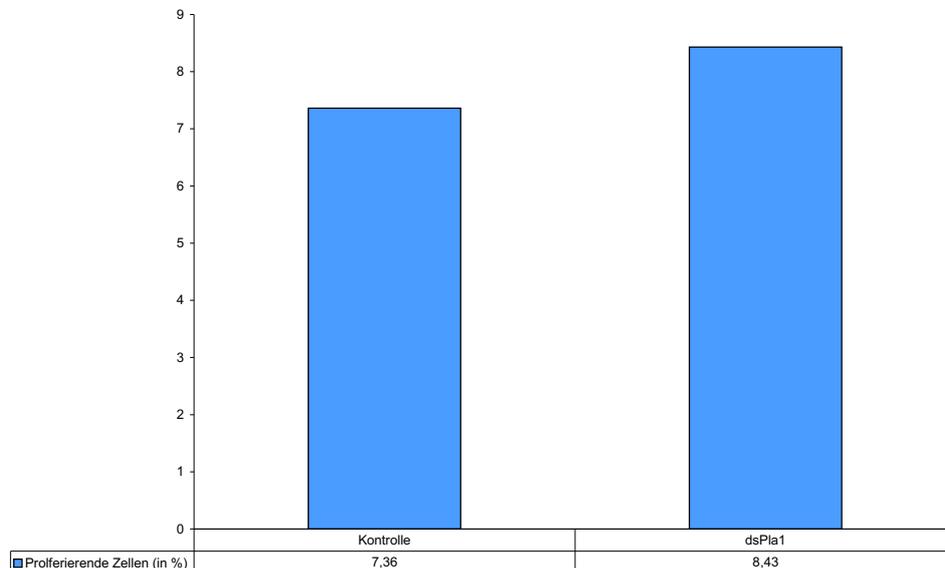


Abbildung 11: Proliferation von Schwanzzellen mit supprimierter Plasmolipin-Expression Unbehandelte Schwanzzellen und Plasmolipin reduzierte Zellen (dsPla1-Oligomer) wurden auf LabTeks ausplattiert (10.000 Zellen je Feld), für 16 h mit BrdU (10 mM Endkonzentration) inkubiert und das in replizierte DNA eingebaute BrdU detektiert. Beide Zellpopulationen zeigten in etwa dieselbe Anzahl proliferierender Zellen, in diesem repräsentativen Versuch ca. 8 %.

In allen Fällen zeigte sich dabei kein Unterschied in der Proliferation der Kontrollzellen (Oligofectamine, sense Pla1 RNA, pSUPER-Vektor) und der Plasmolipin supprimierter Zellen (doppelsträngige dsPla1 RNA, pSPla-Vektor). Diese Zellpopulationen proliferierten bei der gleichen Behandlung jeweils nahezu identisch.

3.1.8 Eine Verminderung der Plasmolipin mRNA-Expression führt zu einer leicht verringerten Adhäsion auf Fibronectin und zu einer leicht erhöhten Adhäsion auf Laminin

Um ein Maß für die Adhäsion von Zellen zu erhalten, wurde ein modifizierter Proliferations-Assay (Promega) durchgeführt, bei dem Zellen in Suspension auf einen mit Laminin oder mit Fibronectin beschichteten Untergrund gegeben und für einen Zeitraum von 3 h inkubiert wurden. Nach dem Ablösen nicht-adhärirter Zellen durch Schütteln (15 min) wurden die Zellen gewaschen und mit einer Farbstofflösung versehen.

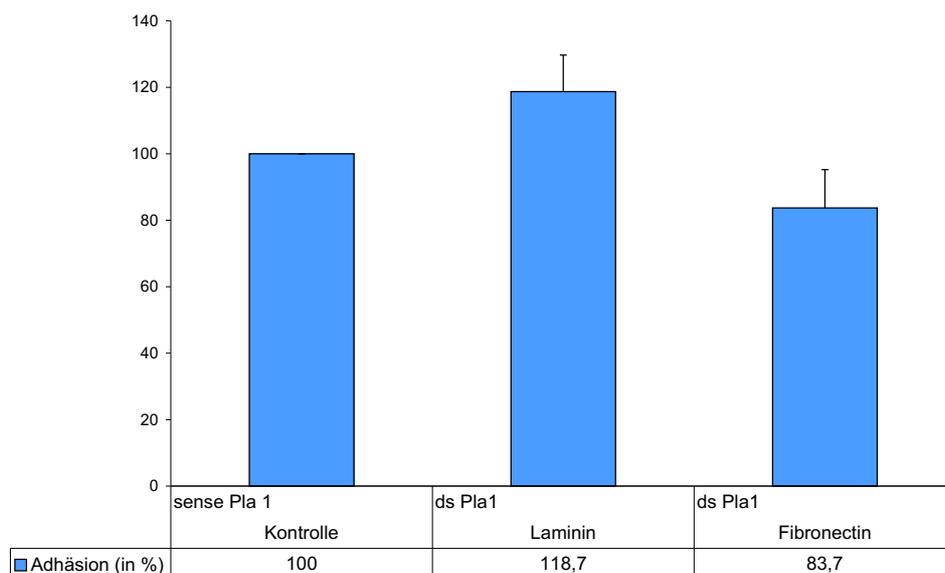


Abbildung 12: Adhäsion von Schwanzzellen mit veränderter Plasmolipin-Expression auf Laminin und Fibronectin

Unbehandelte und Plasmolipin reduzierte Schwanzzellen (ds rPla1) wurden auf mit Laminin oder Fibronectin beschichteten Untergrund gegeben, nach 3 h gewaschen und die Adhäsion der intakten Zellen gemessen (siehe Text). Plasmolipin supprimierte Zellen haften rund 20 % besser auf Laminin und rund 20 % schlechter auf Fibronectin als die Kontrollzellen (signifikant mit $p < 0.05$).

Dieser gelbliche Farbstoff wird von den intakten und adhärenen Zellen aufgenommen und in einen hellbraunen Farbstoff umgesetzt, der in einem ELISA-Plattenauswertegerät gemessen werden kann. Die Absorption dient dann als indirektes Maß für die Adhäsion. Eine direkte Messung der Adhäsion ist nur schwer möglich; im folgenden ist daher mit Adhäsion der Wert gemeint, der sich aus der Messung des umgesetzten Farbstoffes in linearer Abhängigkeit von der Zellzahl auf einem definierten Substrat ergibt.

Als Kontrolle dienten unbehandelte oder mit sense RNA transfizierte Schwannzellen, deren Adhäsion nach Abzug der Werte der Mediumkontrolle als 100 % definiert wurde (Abb. 12). Schwannzellen, die mit sense RNA-Oligomeren transfiziert wurden, zeigen kein abweichendes Verhalten und adhären im selben Ausmaß auf den getesteten Beschichtungen wie unbehandelte Zellen. Schwannzellen, deren Plasmolipin-Expression mittels dsPla1 reduziert wurde, zeigen dagegen ein abweichendes Verhalten: Im Durchschnitt haften sie um 20 % schlechter auf Fibronectin als unbehandelte Zellen oder solche, die mit sense Pla1 Oligomeren transfiziert wurden. Im Gegensatz dazu liegt die Adhäsion der dsPla1 Zellpopulation auf Laminin um rund 20 % über den Werten der Kontrollzellen. Das Aussehen der Zellen wurde in allen Fällen unter dem Mikroskop überprüft und erschien normal. Zudem wurde aus einem Teil der Zellpopulationen RNA isoliert und die Plasmolipin-Expression über eine Q-PCR überprüft.

3.1.9 Eine Änderung der Plasmolipin mRNA-Expression führt zu einer Veränderung der Expression anderer Myelogene

Zusätzlich zu Plasmolipin wurde die Expression weiterer Gene in den transfizierten Schwannzellen der Ratte über eine quantitative PCR gemessen. Die relativen Veränderungen der Plasmolipin supprimierten Zellen (doppelsträngige RNA, pSPla-Vektor) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen deckten sich tendenziell sehr gut, allerdings waren die Ergebnisse bei den mit pSUPER-Konstrukten behandelten Zellen am eindeutigsten und werden im Folgenden exemplarisch vorgestellt. Die Expression einiger ausgewählter Gene wurde auch nach einer Überexpression von Plasmolipin mittels des pIPla-Konstrukts bestimmt.

Um zu überprüfen, ob die gemessenen Änderungen auf den spezifischen Einfluss der veränderten Plasmolipin-Expression zurückzuführen ist, wurden als Kontrollen unbehandelte Zellen, mit unveränderten Original-Vektoren transfizierte Zellen sowie zwei verschiedene Referenzgene (GAPDH und ODC) verwendet.

3.1.9.1 P0 und PMP22

Bei der Untersuchung der klassischen Myelinge P0 und PMP22 stellte sich heraus, dass beide in Schwanzzellen mit supprimierter Plasmolipin-Expression ebenfalls in einem ähnlichen Ausmaß reduziert exprimiert wurden (Abb. 13). Die Expression des im PNS-Myelin dominierenden Proteins P0 sank um mehr als ein Drittel auf 60 %, während PMP22 etwas weniger stark reguliert, aber auch nur noch zu 75 % des Referenzwertes unbehandelter Zellen exprimiert wird.

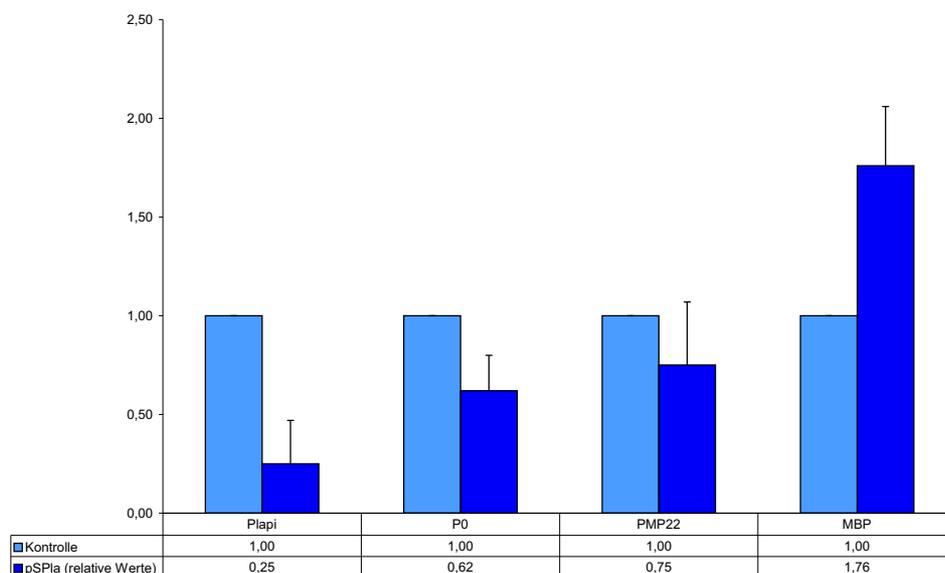


Abbildung 13: Expression von PMP22, P0 und MBP in Schwanzzellen mit supprimierter Plasmolipin-Expression

Die Expression der Gene Plasmolipin, PMP22, P0 und MBP in unbehandelten und Plasmolipin reduzierten Schwanzzellen wurde über eine Q-PCR ermittelt. Die gemessenen Werte wurden auf die der unbehandelten Kontrollzellen normiert. Die Abnahme der Expression von Plasmolipin in Plasmolipin reduzierten Zellen ist signifikant mit $p < 0.01$; die Abnahme der Expression von P0 und MBP ist signifikant mit $p < 0.05$.

3.1.9.2 MBP und MAL

Im Vergleich mit P0 und PMP22 zeigt das ebenfalls zu den klassischen Myelingenen zählende MBP eine zu diesen reziproke Regulation. In Zellen, die eine reduzierte Plasmolipin-Expression aufweisen, steigt die Expression von MBP um mehr als die Hälfte des Referenzwertes an, so dass eine erhöhte mRNA-Menge von ca. 170 % erreicht wird (Abb. 13).

Eine noch deutlichere Steigerung der Expression erfährt MAL, welches mit Plasmolipin zu einer Proteinfamilie gezählt wird. Die gemessene mRNA-Menge liegt um mehr als das $2\frac{1}{2}$ fache über den Werten von Schwanzzellen, die nur mit dem pSUPER-Vektor transfiziert wurden (Abb. 14). Wurde Plasmolipin mittels pIPla-Vektor überexprimiert, sank die Expression des MAL-Gens um ca. 20 % auf ca. 80 % des Wertes der Kontrollzellen ab.

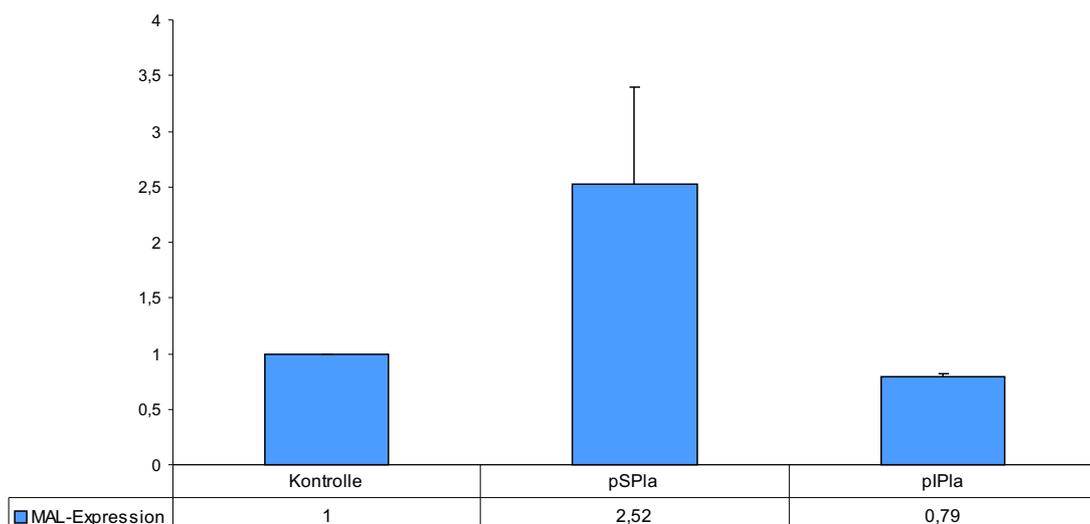


Abbildung 14: Expression von MAL in Schwanzzellen mit veränderter Expression von Plasmolipin

Die Expression von MAL in unbehandelten, Plasmolipin reduzierten (pSPla) und Plasmolipin überexprimierenden (pIPla) Schwanzzellen wurde über eine Q-PCR ermittelt. Die gemessenen Werte wurden auf die der unbehandelten Kontrollzellen normiert (relative Werte). Die Zunahme der Expression von MAL in Plasmolipin reduzierten Zellen ist signifikant mit $p < 0.05$; die Abnahme der Expression von MAL in Plasmolipin überexprimierenden Zellen ist signifikant mit $p < 0.01$.

3.1.9.3 Integrin-Untereinheit α_6

Aufgrund der veränderten Adhäsionseigenschaften der pSP1a-Zellen wurde auch die Expression einiger der in Schwanzzellen vorkommenden α -Untereinheiten der Integrine untersucht. Für die α_2 -Untereinheit konnten trotz mehrerer getesteter Primer-Paare keine Amplifikationsprodukte in einer quantitativen PCR detektiert werden.

Die α_6 -Untereinheit wies eine starke Regulation sowohl bei einer Überexpression als auch bei einer reduzierten Expression von Plasmolipin auf (Abb. 15). Wurde die Plasmolipin-Menge reduziert, stieg die Expression von α_6 um ein Fünftel auf ca. 120 % der Werte der Kontrollzellen an. Bei einer Überexpression von Plasmolipin dagegen sank die α_6 -mRNA Menge um etwa ein Viertel auf nur noch 77 % des Referenzwertes.

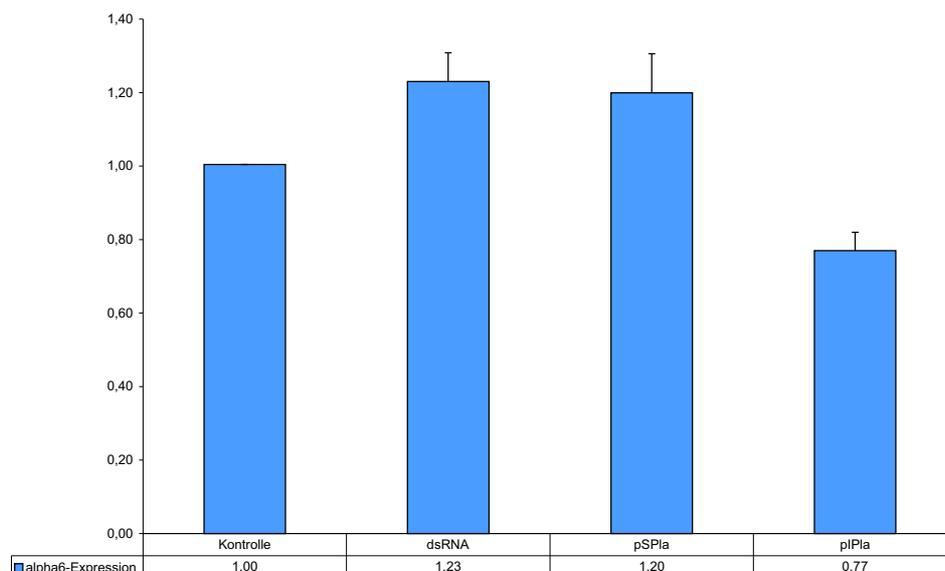


Abbildung 15: Expression der α_6 -Integrin Untereinheit in Schwanzzellen mit veränderter Plasmolipin-Expression

Die Expression der α_6 -Integrin Untereinheit (rITGA6) in unbehandelten, Plasmolipin reduzierten (pSP1a) und Plasmolipin überexprimierenden (pIPl1a) Schwanzzellen wurde über eine Q-PCR ermittelt. Die gemessenen Werte wurden auf die der unbehandelten Kontrollzellen normiert (relative Werte). Alle dargestellten Veränderungen in der Expression sind signifikant mit $p < 0.01$.

3.2 Plasmolipin überexprimierende Mausmutanten

3.2.1 Generierung transgener Mäuse

Die Plasmolipin-cDNA wurde über eine RT-PCR aus der RNA vom Ischiasnerv einer adulten Maus gewonnen (Sequenz siehe Anhang) und hinter eine Hämagglutinin-kodierende DNA-Sequenz kloniert, so dass eine spätere Detektion von exogenem Plasmolipin möglich ist. Dieses Fragment wurde über einen Shuttle-Vektor in den SCE-Vektor inkloniert (Abb. 16). Sowohl Shuttle-Vektor als auch SCE-Vektor wurden freundlicherweise von Dr. Dies Meijer, Universität Rotterdam, zur Verfügung gestellt.

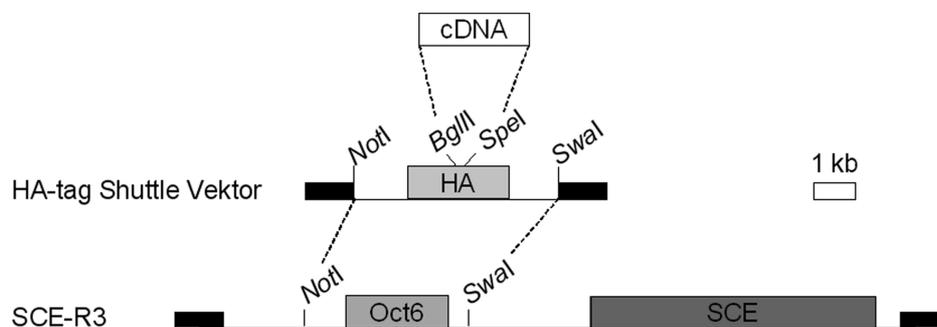


Abbildung 16: Konstruktion des TgN(mPlaSCE)-Vektors

Die cDNA des zu untersuchenden Gens wird in einen Shuttle Vektor kloniert, der zusätzlich eine Hämagglutinin-Gruppe kodiert (HA-Tag). Diese Kasette kann in den eigentlichen SCE-Vektor mit der Enhancer-Region SCE inkloniert werden. Dabei wird die ursprüngliche Oct-6 cDNA ersetzt.

Für die Generierung transgener Mäuse ist ein Antrag auf Genehmigung eines Versuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes notwendig, der mit der Aktenzeichennummer 50.05.230-3-94/01 und der Projektnummer G/94/2001 genehmigt wurde (Leiter des Versuchsvorhabens: M. Hamacher, Stellvertretender Leiter des Versuchsvorhabens: Dr. F. Bosse). Die Bereitstellung des transgenen Tierlabors und die weitere Haltung der Tiere übernahm die Tierversuchsanlage Düsseldorf; die Erzeugung scheinsschwangerer Mäuse sowie die Manipulation der Oocyten wurden von Dr. Theil und Prof. Rütter, Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, im Rahmen einer Kooperation durchgeführt.

Zwei Injektionstermine führten zu drei Würfen mit insgesamt 13 Tieren der Bezeichnung B6C3F1-TgN(mPlaSCE)1HWM bis B6C3F1-TgN(mPlaSCE)13HWM. Im Alter von drei Wochen wurden Schwanzspitzenbiopsien entnommen und aus diesen DNA isoliert. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR, in der als sense Primer ein Oligomer aus der Hämagglutinin-DNA-Sequenz verwendet wurde und als antisense Primer ein Oligomer aus der cDNA von Plasmolipin. Eine Amplifizierung endogener genomischer Sequenzen sollte mit dieser Strategie vermieden werden. Die Integrität der DNA wurde über eine PCR mit etablierten Primern gegen das beta-Aktin der Maus überprüft. Die Tiere TgN(mPlaSCE)1, TgN(mPlaSCE)2, TgN(mPlaSCE)5, TgN(mPlaSCE)8 und TgN(mPlaSCE)11 zeigten ein Amplifikationsprodukt gesuchter Größe (Abb. 17) und wurden mit C57Bl6 Mäusen verpaart, da bei diesem Stamm kaum Auffälligkeiten bei transgenen (Myelin-) Mutanten beobachtet wurden (Angaben Prof. Nave, Max-Planck-Institut für Experimentale Medizin, Göttingen).



Abbildung 17: PCR-Charakterisierung der TgN(mPlaSCE)-Gründertiere
DNA aus Schwanzspitzenbiopsien der F0-Tiere wurde isoliert und in einer PCR eingesetzt, bei der ein Primer aus der SCE-Vektorsequenz sowie ein Primer aus der cDNA von Plasmolipin verwendet wurde. Als Kontrollen wurde zusätzlich der SCE-Vektor (P, 20fg/ μ l), DNA aus einer Wildtyp-Maus (N) sowie Wasser (L) verwendet. Die Tiere TgN(mPlaSCE)1, 2, 5, 8 und 11 zeigen ein Amplifikationsprodukt, das im Falle der Maus TgN(mPlaSCE)5 in dieser Aufnahme kaum zu erkennen ist. Die verwendeten genomischen DNA-Proben waren in einer PCR mit Aktin-Primern positiv.

3.2.2 Etablierung unabhängiger transgener Mauslinien

Die Verpaarung der Tiere verlief ohne Schwierigkeiten und führte zu insgesamt 119 F1-Tieren, von denen aber nur 15 Mäuse als positiv in einer PCR gegen die Vektorsequenz des Schwanzzellen Enhancers detektiert werden konnten (12 %, genaue Aufschlüsselung siehe Tab. 1). Dabei handelte es sich um drei Nachfahren der Maus TgN(mPlaSCE)1, zwei Nachfahren der Maus TgN(mPlaSCE)2, zwei Nachfahren der Maus TgN(mPlaSCE)5, vier Nachfahren der Maus TgN(mPlaSCE)8 und vier Nachfahren der Maus TgN(mPlaSCE)11. Die transgenen F1-Tiere erschienen unauffällig und vital; es konnten keine Ausfälle bei dem Gebrauch der Hinterbeine oder in der Lokomotion festgestellt werden. Weitere Verhaltenstests wurden nicht durchgeführt.

Diese F1-Tiere wurden ebenfalls mit C57Bl6-Mäusen verpaart und die resultierenden F2-Tiere erneut mittels PCR genotypisiert. Von 187 Mäusen konnten dabei nur 12 Tiere als positiv detektiert werden (6,5 %, genaue Aufschlüsselung siehe Tab. 1). Auch diese Tiere schienen unauffällig zu sein. Tote oder eingeschränkt lebensfähige Jungtiere wurden in einem normalen Ausmaß vorgefunden: sechs von 306 Tieren verstarben, zwei Jungtiere waren deutlich kleiner als die übrigen. Eine eingehendere Charakterisierung der Plasmolipin überexprimierenden Mäuse in einem zukünftigen Projekt soll klären, wie diese geringe Penetranz zustande kommt und welche Auswirkungen die Überexpression von Plasmolipin während der Entwicklung haben kann.

F0-Tier	Nachkommen F1, davon transgen	Nachkommen F2, davon transgen
1	27/3	35/1
2	16/2	27/2
5	38/2	16/0
8	21/4	46/3
11	17/4	63/6

Tabelle 1: Zuchtschema der transgenen Mauslinien TgN(mPlaSCE)1, 2, 5, 8, 11

3.3 Plasmolipin defiziente Mausmutante

3.3.1 Durchmusterung einer genomischen P1 Maus-Bank

Um die biologische Funktion des Plasmolipin-Proteins zu untersuchen, sollte eine Plasmolipin defiziente Mausmutante hergestellt werden. Da nur die cDNA Sequenzen von Maus und Ratte bekannt waren, musste zu diesem Zweck die genomische Struktur des Plasmolipin-Gens der Maus ermittelt werden. Hierzu wurde eine genomische 129/Svev-TACfBr P1 Maus-Bank (RPCI21, Nr. 711), die vom Ressourcen Zentrum/Primär Datenbank (RZPD) des Deutschen Humanen Genomprojekt bezogen werden konnte, mit der radioaktiv markierten cDNA-Sonde P3M5 aus der vollständigen kodierenden Region des Plasmolipins der Maus durchmustert. Diese P1 Bank besteht aus 414750 Klonen mit einer durchschnittlichen Insertgröße von 146.6 kb und repräsentiert das Genom der Maus 12.6fach. Insgesamt konnten 13 unabhängige Klone positiv detektiert und ebenfalls vom RZPD bezogen werden. Die DNA der Klone wurde isoliert und mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* oder *BamHI* geschnitten sowie einer Southern Blot Analyse unterzogen. Bei der Verwendung der cDNA-Sonde P3M5 zeigten alle Klone ein identisches Schnittmuster, so dass der Klon RPCIP711E01102 für das weitere Vorgehen ausgewählt wurde. Dieser Klon wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* oder *BamHI* geschnitten und in den entsprechend geschnittenen pBluescript-Vektor inkloniert.

Die mit diesen Vektoren transformierten *E.coli* Zellen wurden auf LB^{Amp}-Platten ausgestrichen, über Nacht bei 37°C inkubiert und die entstandenen Kolonien durch kurzes Auflegen einer Nylon⁺-Membran auf diese übertragen. Nach kurzer Denaturierung der Zellen wurde die Membran in einer Filterhybridisierung mit der cDNA-Sonde P3M5 radioaktiv hybridisiert. Positiv detektierte Kolonien wurden vereinzelt und mit der sogenannten Primer-Walking-Methode sequenziert. Hierbei sequenziert man zunächst mit bekannten Primern aus der Vektorsequenz und verwendet im nächsten Schritt neue Primer aus dem Bereich der entschlüsselten Insertsequenz usw., bis die Nukleotidreihenfolge des Klons aus beiden Richtungen überlappend komplett bekannt ist. Zusätzlich zu den Vektor-Primern konnten in diesem Fall einige Primer verwendet werden, die aus der cDNA-Sequenz bereits bekannt waren. Eine Liste der verwendeten Primer befindet sich im Anhang. Die gewon-

nen Daten wurden mittels der Analyse-Software Sequencher (Gene Codes) ausgewertet und mit bekannten Datenbanken verglichen. Es gelang, mehrere in ihrer Sequenz überlappende Klone zu finden, die die kodierende Region des Plasmolipin-Gens vollständig beinhalten. Ein nicht-kodierender Bereich des Gens konnte mit Hilfe einer PCR aus dem PAC Klon amplifiziert und ebenfalls sequenziert werden. Zur Bestimmung der Exon-Intron Grenzen wurde die ermittelte Nukleotidfolge mit dem Programm SpliceView des Institute of Advanced Biomedical Technologies (ITBA, Italy; <http://125.itba.mi.cnr.it/webgegene/wwwspliceview.html>) analysiert und mögliche Bereiche mit der GT/AG Regel verglichen. Die Sequenz des Plasmolipin-Gens der Maus wurde - bis auf ein 200 bp großes Fragment mit repetitive Elementen aus dem ersten Intron - der EMBL Datenbank übermittelt und erhielt die Zugangsnummern AJ298129 und AJ298130 (siehe Anhang).

3.3.2 Genomische Struktur des Plasmolipin-Gens der Maus

Das Plasmolipin-Gen der Maus erstreckt sich über eine Länge von 19 kb und besteht aus vier Exonen (Abb. 18), wobei das Start-Codon ATG in Exon I und das Polyadenylierungssignal in Exon IV zu finden ist.

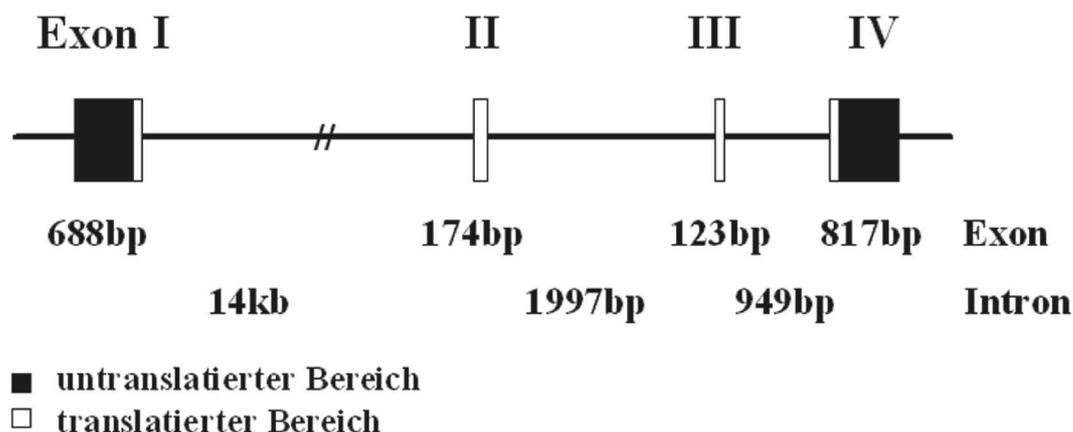


Abbildung 18: Genomische Struktur des Plasmolipin-Gens der Maus

Das Plasmolipin-Gen der Maus umfasst ca. 19 kb und besteht aus vier Exonen. Auffällig ist ein mit 14 kb sehr großes Intron I. Exone sind als Kästen dargestellt, wobei die untranslatierten Bereiche schwarz und die translatierten Bereiche weiß gezeichnet sind. Die Abbildung ist nicht maßstabsgerecht abgebildet.

Um den Transkriptionsstartpunkt genauer einzugrenzen, wurde eine Analyse der Bindungsmotive mit Hilfe des WWW Signal Scans der National Institutes of Healths NIH durchgeführt (<http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/signal>). Zwei TATA-Boxen 541 bp und 644 bp 5'-seitig des Start-Codons konnten gefunden werden, was auf einen Transkriptionsstartpunkt etwa 510 bp 5'-seitig des Start-Codons schließen lässt. Zudem wurden verschiedene GC-Boxen sowie mögliche Bindungsstellen für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren wie Myogenin, MAZ, Pit-1, Oct-1 und Oct-2 ermittelt, die aber nicht weiter charakterisiert wurden. Insgesamt ähnelt die genomische Struktur dieses Gens mit vier Exonen und einem sehr großen Intron I stark dem Aufbau des MAL-Gens (Alonso und Weissman, 1987).

3.3.3 Generierung und Detektion von Plasmolipin defizienten ES-Kolonien

Bei der Generierung defizienter Mäuse können zwei Strategien angewendet werden:

1. Das Gen wird in allen Zellen bereits zu Beginn der Embryonalentwicklung konstitutional ausgeschaltet, so dass alle Zellen des adulten Tieres heterozygot nur ein Allel aufweisen.
2. Das Gen wird über das Cre-lox-System konditionell nur in bestimmten Zellen zu einer bestimmten Zeit eliminiert.

Da zwar das Expressionsmuster von Plasmolipin bekannt war, aber nichts über eine mögliche Funktion, schien es ratsamer, (zunächst) eine konstitutionelle Mausmutante zu generieren. Das entsprechende DNA-Konstrukt muss einen positiven Selektionsmarker zwischen möglichst großen, nicht-kodierenden Fragmenten aus dem 5'- und dem 3'-Bereich des Gens umfassen. In diesem Fall wurde ein Neomycin-Resistenzgen zwischen ein 2 kb Fragment aus dem 5'-Bereich vor dem Start-Codon und einem 3.4 kb Fragment mit dem nicht-kodierenden Exon IV kloniert (Konstrukt PE12, Abb. 19). Die Sequenzierung des Inserts stellte die Vollständigkeit des Konstrukts sicher. Embryonale Stammzellen des Typs E14.1 wurden auf einem Fibroblasten-Zellrasen kultiviert und nach Standardprotokollen mit dem linearisierten Vektor elektroporiert. In insgesamt drei unabhängigen Versuchsreihen wurden elektroporierte und unbehandelte ES-Zellen mit Neomycin für 14 Tage selektioniert. Unbehandelte Zellen starben innerhalb dieser Zeit ab, während sich

auf den übrigen Platten Kolonien bildeten. Es folgte eine Vereinzlung von insgesamt 1274 ES-Kolonien, die in Trypsin in Einzel-Zellen gelöst und auf drei verschiedene Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen verteilt wurden. Nach einer Anwachsphase von mehreren Tagen wurden zwei der Platten für spätere Versuche bei -80°C eingefroren, während die DNA der Kolonien der dritten Platte isoliert wurde.

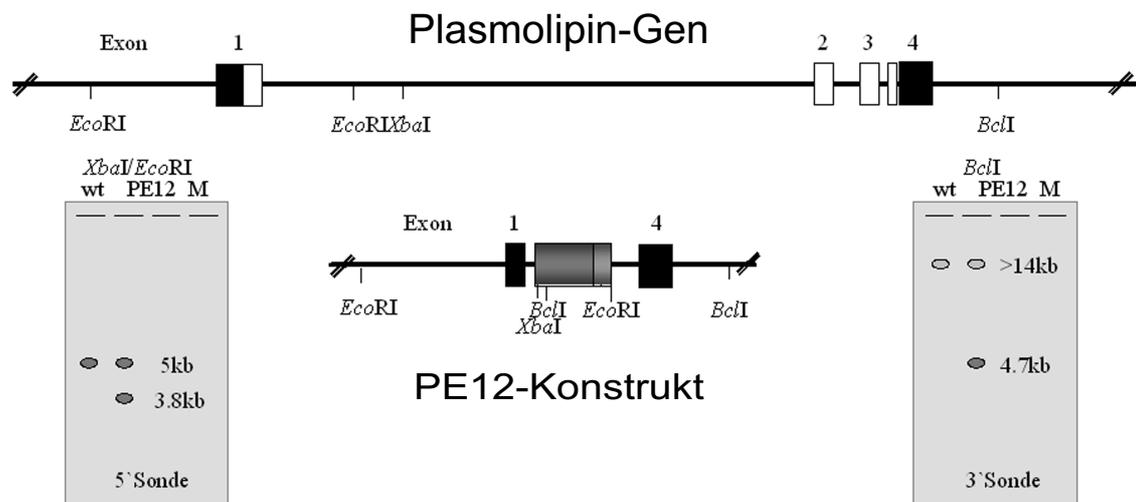


Abbildung 19: Schema zur Charakterisierung von Plasmolipin defizienten ES-Zellen. Heterozygote ES-Zellen sollten nach erfolgreicher Elektroporation ein intaktes Allel des Plasmolipin-Gens sowie das verwendete Konstrukt PE12 auf dem entsprechenden zweiten Chromosom besitzen. Zur Überprüfung, ob das Konstrukt richtig in den Gen-*locus* inseriert ist, kann eine Southern Blot Analyse durchgeführt werden. Hierbei wird die genomische DNA der Zellen mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran geblottet. Bei der Verwendung einer geeigneten cDNA-Sonde sollten Wildtyp-Zellen nur ein Fragment (des ursprünglichen Gens) zeigen, heterozygote Zellen aber zwei Fragmente (zusätzlich das des Konstrukts). Diese Überprüfung ist für beide Enden des Gens durchzuführen: In diesem Fall für die 5'-Seite mittels der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *XbaI* sowie einer cDNA-Sonde aus dem 5'-Bereich des Gens; für die 3'-Seite mittels des Restriktionsenzym *BclI* sowie einer cDNA-Sonde aus dem 3'-Bereich des Gens.

Exone sind als Kästen dargestellt, wobei die untranslatierten Bereiche des Plasmolipin-Gens schwarz und die translatierten Bereiche weiß gezeichnet sind. Das im PE12-Konstrukt enthaltene Neomycin-Resistenzgen mit eigenem Promotor ist grau gehalten. Die dargestellten DNA-Fragmente sind nicht maßstabsgerecht abgebildet. wt Wildtyp, PE12 Konstrukt, M Marker.

Die Überprüfung der Restriktionsschnittmuster für den 5'- sowie 3'-Bereich des Gens in einer Southern Blot Analyse zeigte in allen Fällen nur die Fragmente des unveränderten endogenen Plasmolipin-Gens (Abb. 20A, B). Ein weiteres Fragment der gesuchten Größe von 3.8 kb bzw. 4.7 kb konnte - auch in einer zweiten Analyse und in einer anschließenden PCR - nicht detektiert werden. Ein weiterer Versuch zur Generierung Plasmolipin defizienter Mäuse erschien auch nach Rücksprache mit dem Zentrallabor für transgene Tiere des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums nicht zweckmäßig.

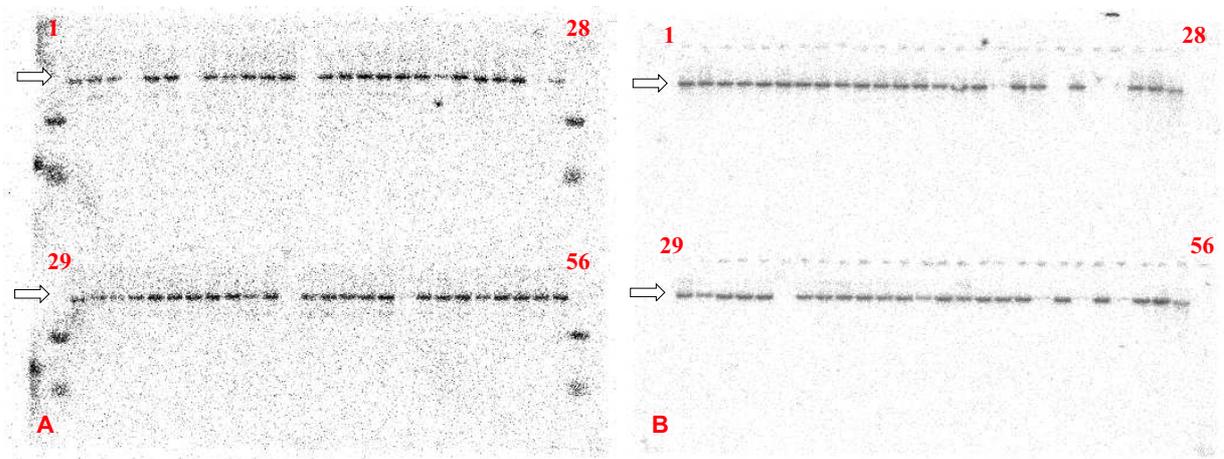


Abbildung 20: Southern Blot Analyse von ES-Zellen nach Neomycin-Selektion

A Überprüfung der 5'-Seite mittels der Restriktionsemzyme *EcoRI* und *XbaI* sowie einer cDNA-Sonde aus dem 5'-Bereich des Plasmolipin-Gens. Die Pfeile markieren die Laufhöhe von Fragmenten mit 5 kb Größe. Es sind nur die DNA-Fragmente des unveränderten Gens zu sehen.

B Überprüfung der 3'-Seite mittels des Restriktionsemzyms *BclI* sowie einer cDNA-Sonde aus dem 3'-Bereich des Gens. Die Pfeile markieren die Laufhöhe von Fragmenten mit 4.7 kb Größe. Auch in diesem Fall sind nur die DNA-Fragmente des unveränderten Gens zu sehen.

1-56 aufgetragene Proben, wobei 1, 28, 29 und 56 jeweils den DNA-Standard markiert. Die übrigen DNA-Proben der ES-Zellen sind aus Übersichtsgründen nicht explizit nummeriert dargestellt. Die in den Spuren des DNA-Standards zu findenden Banden sind unspezifisch.

3.4 Plasmolipin und das Bardet-Biedl Syndrom

Die Daten zur chromosomalen Struktur des Plasmolipin-Gens der Maus konnten zusammen mit weiteren Daten aus der AG Molekulare Neurobiologie veröffentlicht werden (Hamacher *et al.*, 2001). Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Plasmolipin-Protein bei der Ratte nicht nur in der Niere und im Nervensystem zu finden ist, sondern auch in einer Vielzahl weiterer Organe wie zum Beispiel Lunge, Thymus, Ovarien, Herzmuskel und verschiedenen Drüsen, nicht aber in der Retina, im Pankreas oder in der Leber (Arbeiten von U. Pippirs, AG Molekulare Neurobiologie). Weiterhin gelang es unter Verwendung der Sequenzinformationen im Rahmen einer Kooperation, den Gen-*locus* des humanen Plasmolipin-Gens über zwei unabhängige Methoden auf die Region Chromosom 16q13 einzugrenzen (Arbeiten von Dr. A. Köhler, Institut für Human Genetik, Giessen, und Dr. F. Bosse, AG Molekulare Neurobiologie). Dieser Bereich wurde bereits über Stammbaum-Analysen mit dem Bardet-Biedl Syndrom Typ 2 assoziiert (Kwitek-Black *et al.*, 1993).

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die biologische Funktion des Tetraspan Moleküls Plasmolipin näher zu charakterisieren und erste Hinweise zu erhalten, inwiefern es an der Bildung, der Erhaltung und dem Regenerationspotential des Myelins peripherer Nerven beteiligt ist. Frühe Arbeiten zum Thema Plasmolipin postulierten, dass Plasmolipin im Falle einer Oligomerisierung Kanäle bilden kann, die K^+ -permeabel sein und zur Regulation der Wasser-Homöostase dienen sollen (Tosteson und Sapirstein, 1981, Dr. Sapirstein, unveröffentlicht). Wichtige Erkenntnisse über die genaue Wirkungsweise oder Aufgabe im Myelin fehlten allerdings bislang weitestgehend. Die Methoden der RNA Interferenz (RNA_i) sowie neue Erkenntnisse über den Aufbau von Membranen ermöglichen nun die Entwicklung neuer Ansatzpunkte, um die physiologische Funktion des Plasmolipins besser beschreiben zu können.

4.1 Die Induktion von RNA_i ist auch in primären Zellkulturen eine einfache und effektive Methode zur spezifischen Reduktion der RNA- und Protein-Expression

Gelangt doppelsträngige RNA (dsRNA, zum Beispiel durch eine virale Infektion) in eine Zelle oder wird in dieser gebildet (zum Beispiel durch Transkription von Transposons oder kodiert als Vorläufer einer RNA mit Haarnadel-Struktur), wird sie in Fragmente von 21nt Größe geschnitten und bewirkt unter anderem die Degradierung komplementärer mRNAs, so dass keine Neu-Synthese des betreffenden Proteins stattfinden kann (Abb. 21; Elbashir *et al.*, 2001; Hannon, 2002).

Fast alle zu Beginn dieser Arbeit erschienenen Publikationen zur RNA_i beziehen sich auf Invertebraten oder sehr gut beschriebene Zelllinien wie HeLa-Zellen o.ä. (Dudley *et al.*, 2002; Harborth *et al.*, 2001); vereinzelt haben verschiedene Forschergruppen auch Maus-Oocyten oder Tiermodelle wie die Ratte verwendet (Svoboda *et al.*, 2000; McCaffrey *et al.*, 2002). Die vorliegenden Ergebnisse zählen zu den ersten, die zeigen, dass diese Methode auch bei primären Säugerzellkulturen wie den Schwanzzellen der Ratte zur Regulation eines endogenen Gens herangezogen werden kann.

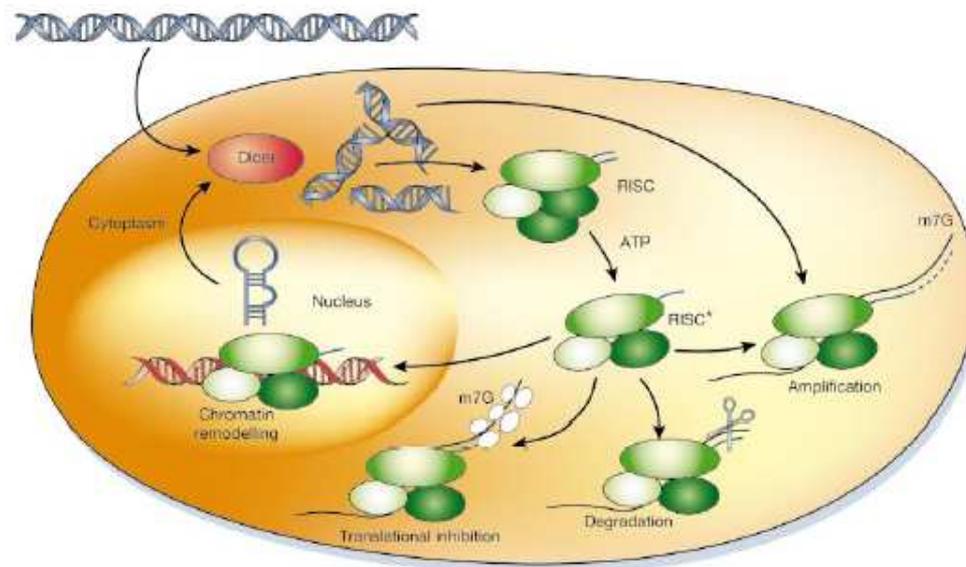


Abbildung 21: Schema zum Mechanismus der RNA_i. Doppelsträngige RNA, die von außen in die Zelle gelangt oder in dieser gebildet wird, kann von dem Protein Dicer gebunden und in kleine RNA-Fragmente (small interfering RNA, siRNA) prozessiert werden. Die RNA-Oligomere gelangen zu einem RISC genannten Protein-Komplex (RNA-induced silencing complex) und aktivieren diesen. Aktivierte RISC Komplexe können daraufhin die Degradierung komplementärer mRNAs bewirken oder ihre Translation behindern sowie wahrscheinlich auch die Expression des betreffenden Gens durch Veränderung der Struktur des Chromatins (Chromatin remodelling) unterbinden. Eine Amplifikation der siRNAs durch RNA abhängige RNA Polymerasen wird ebenfalls diskutiert. Abbildung nach Hannon (2002).

Die Transfektion von Schwanzzellen der Ratte mit RNA-Duplexen führt zu einer Reduktion der Plasmolipin-Expression auf bis zu 30 % der Werte unbehandelter Zellen. Dabei wurden mehrere Referenzgene (rGAPDH, rODC) in der quantitativen PCR verwendet, um auszuschließen, dass diese auch reguliert waren und die relativen Expressionsänderungen verfälscht berechnet wurden. Zusätzlich kamen zwei verschiedene Oligonukleotidsequenzen zum Einsatz, die mit Datenbanken abgeglichen wurden und nur homolog zur Plasmolipin-Sequenz sind. Damit sollte sicher gestellt werden, dass nur die Plasmolipin-Expression reduziert wird und die daraus resultierenden Effekte mit großer Sicherheit auf das Fehlen von Plasmolipin zurückzuführen sind. In allen Experimenten zeigten sich dabei dieselben beschriebenen Tendenzen. Die Effizienz der Transfektionen wurde in diesen Experimenten nicht bestimmt, kann aber vermutlich nicht die hohen Transfektionsraten anderer Zelltypen wie zum Beispiel 90 % bei HeLa-Zellen erreichen (Angabe Dr. T.Tuschl,

Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie). Bedenkt man, dass die Transfektionsrate für DNA-Transfektionen bei Schwanzzellen der Ratte zwischen 10-20 % liegt (Angabe Dr. P.Küry, AG Molekulare Neurobiologie), muss ein etwas geringerer Transfektionserfolg bei RNA-Duplexen im Vergleich zu den HeLa-Zellen angenommen werden. Insgesamt bestätigt sich dennoch, dass die Verwendung von siRNAs auch in der Zellkultur primärer Zellen eine wirkungsvolle Methode zur spezifischen Veränderung der Expression eines Genes darstellt. Ein ähnlicher, aber schwächerer Effekt tritt bei der Verwendung von antisense RNA-Oligomeren auf, die ebenfalls eine leicht reduzierten Expression hervorrufen können. Sie wirken vermutlich über denselben Mechanismus wie die dsRNA, indem sie an komplementäre mRNAs im Zytoplasma binden und so als RNA-Duplexe RNA_i induzieren.

Eine elegantere und effektivere Methode besteht in der Verwendung der shRNA kodierenden pSUPER-Vektoren. In den hier dargestellten Versuchen wurden Transfektionsraten von rund 10-20 % erreicht, wie man anhand des Verhältnisses zwischen transfizierten und angereicherten Zellen sehen kann (1.5 Mio zu ca. 200.000 Zellen). Aufgrund der Anreicherung transfizierter Zellen durch die Ko-Transfektion mit dem CD14.1-Vektor wird jedoch eine Zellpopulation isoliert, in der nahezu 100 % aller Zellen eine RNA_i -Induktion erfahren haben. So konnte in dieser Zellpopulation eine Plasmolipin-Expression zum Teil von unter 1 %, im Durchschnitt aber von unter 25 % des als „normal“ definierten Wertes nachgewiesen werden. Dies stellt eine sehr starke Reduktion dar, bedeutet aber nicht das völlige Fehlen der Plasmolipin-mRNA, die zu einem sehr geringen Maß immer noch transkribiert wird. Dies stimmt mit den Befunden anderer Arbeitsgruppen überein (Jacque *et al.*, 2002; Svoboda *et al.*, 2000), zumal im Zusammenhang mit RNA_i von einem „Knock-Down“ und nicht von einem „Knock-Out“ gesprochen wird. Eine derartige Änderung in der Expression sollte auch eine Veränderung in der Proteinmenge nach sich ziehen, wenn es nicht zu einer Erhöhung der Stabilität und einem langsameren Abbau des betreffenden Moleküls kommt. Im Falle des Plasmolipins führte die Abnahme der mRNA-Menge auch zu einer Reduktion der Proteinmenge, wie dies in Western Blot Analysen sowie in immunzytochemischen Untersuchungen gezeigt werden konnte.:

Färbt man unbehandelte und behandelte Schwanzzellen der Ratte immunzytochemisch an, so stellt man in den RNA_i -induzierten Schwanzzellen der Ratte eine deutlich schwäch-

ere Anfärbung fest (siehe Abb. 8). Zellfortsätze oder die Zellmembran sind kaum sichtbar, die granulären Strukturen im Zellinneren erscheinen gröber und ein Zellkern-nahes Organell tritt deutlicher hervor. Bei diesem Organell handelt es sich vermutlich um das Endoplasmatische Retikulum und/oder den Golgi-Apparat. Die Abnahme der Proteinmenge von Plasmolipin konnte über eine Western Blot Analyse für die dsRNA-transfizierten Zellen bestätigt werden (siehe Abb. 6).

4.2 Der Einfluss des Plasmolipins auf die Zelladhäsion

4.2.1 Extrazellulärmatrix und Integrine

Schwanzzellen, in denen die Plasmolipin-Menge durch die Induktion von RNA_i-Prozessen reduziert wurde, zeigten im Vergleich zu unbehandelten Zellen ein abweichendes Adhäsionsverhalten auf den Substraten Laminin und Fibronectin. Plasmolipin reduzierte Schwanzzellen verloren dabei selektiv die Fähigkeit, im selben Ausmaß wie unbehandelte Zellen auf Fibronectin zu haften (-20 %), adhärten aber verstärkt an Laminin (+20 %). Gleichzeitig führte die Reduktion der Plasmolipin-Expression zu einer Steigerung der Expression der α_6 -Integrin-Untereinheit um 20 %, während die Überexpression von Plasmolipin in einer Verringerung der α_6 -Expression um ebenfalls ca. 20 % resultierte. Es ist daher zu vermuten, dass Plasmolipin direkt oder indirekt eine Rolle bei der Entstehung des Repertoires oder der Stöchiometrie der sich auf der Zelloberfläche befindenden Integrine spielt und somit auch bei der Adhäsionsfähigkeit der Zellen an verschiedene Substrate der Extrazellulärmatrix.

In vielerlei Hinsicht spielen Adhäsion und Migration gerade für Schwanzzellen eine wichtige Rolle. Die Vorläuferzellen der Schwanzzellen, die Neuralleisten-Zellen, wandern von ihrem Ursprungsort in lateraler und ventraler Richtung zu ihrem späteren Bestimmungsort (siehe Einleitung; Anderson, 1997). Zur Orientierung interagieren die migrierenden Zellen auch mit den Komponenten der Extrazellulärmatrix wie zum Beispiel Laminin und Fibronectin. Diesen kommt auch in Regenerationsprozessen nach Nervenläsionen große Bedeutung zu, da Schwanzzellen bei der Bildung der sogenannten Büngner'schen Bänder von der Extrazellulärmatrix geleitet werden (Bunge *et al.*, 1989; Scherer, 1997) und sich

auch auswachsende Axone an den verschiedenen Komponenten orientieren (Leitinger und Hogg, 2001). Die Adhäsion von Zellen an die Extrazellulärmatrix wird dabei über Integrine vermittelt (PLOW *et al.*, 2000). Integrine sind Transmembran-Rezeptoren, bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit, von denen bislang 16 α - sowie 9 β -Untereinheiten beschrieben wurden (Meredith *et al.*, 1999). Die unterschiedliche Kombination der Untereinheiten ist ausschlaggebend für die spezifische Bindung des Heterodimers an die Liganden, wobei häufig auch mehrere verschiedene Liganden mit einem Integrin interagieren können. In Schwannzellen sind vor allem folgende Integrine von Interesse (Takeuchi *et al.*, 1994; Hsiao *et al.*, 1991; Roche *et al.*, 1997; Jaakkola *et al.*, 1993):

- $\alpha_2\beta_1$, Laminin-Rezeptor
- $\alpha_5\beta_1$, Fibronectin-Rezeptor
- $\alpha_6\beta_1$, Laminin-Rezeptor, der in einem erhöhten Maß von nicht-myelinisierenden Schwannzellen exprimiert wird (Feltri *et al.*, 1992)
- $\alpha_6\beta_4$, Laminin-5-Rezeptor, der nur von myelinisierenden Schwannzellen exprimiert wird (Feltri *et al.*, 1992, Einheber *et al.*, 1993)

Die Expression der α_6 -Integrin-Untereinheit wurde in Plasmolipin reduzierten bzw. überexprimierenden Zellen explizit untersucht und war reziprok zu Plasmolipin reguliert: Bei einer Erhöhung der Plasmolipin-Menge sank die α_6 -Menge und umgekehrt. Da die Bindung an Laminin über Rezeptoren mit der α_6 -Untereinheit zustande kommt, sollte die stärkere Adhäsion von Plasmolipin supprimierten Zellen an Laminin auf die erhöhte α_6 -Expression zurückzuführen sein. Es gibt zudem Hinweise darauf, dass die Expression der α_6 -, β_1 - und β_4 -Untereinheiten in Schwannzellen aus Schwannomen der Neurofibromatose Typ II erhöht ist (Dr. C.O. Hanemann, Ulm, unveröffentlicht). Die $\alpha_6\beta_1$ - und $\alpha_6\beta_4$ -Rezeptoren scheinen für die Differenzierung der Schwannzellen wichtig zu sein (Einheber *et al.*, 1993; Feltri *et al.*, 1992) und durch eine veränderte Expression des Tumor Suppressor Gens Merlin/Schwannomin reguliert zu werden (Trafatter *et al.*, 1993; Rouleau *et al.*, 1993). Plasmolipin scheint in entgegengesetzter Weise zu Merlin zu agieren und könnte damit ebenfalls die Expression der $\alpha_6\beta_1$ - und $\alpha_6\beta_4$ -Rezeptoren und damit die Laminin-Adhäsion regulieren.

Die α_5 -Integrin-Untereinheit des Fibronectin-Rezeptors $\alpha_5\beta_1$ ist in ihrer mRNA-Sequenz für die Ratte noch nicht bekannt und wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Es finden sich aber in der Literatur auffällige Gemeinsamkeiten im Expressionsmuster von Plasmolipin, Fibronectin und α_5 . Exemplarisch sollen hier kurz die Ergebnisse Lefcorts und Kollegen dargestellt werden, die bereits 1992 die zeitlich und räumlich eng miteinander korrelierte Expression von Fibronectin und dem Integrin $\alpha_5\beta_1$ in der Entwicklung peripherer Nerven des Huhns sowie während der Regeneration nach Nerven-Transsektion beschrieben haben (Lefcort *et al.*, 1992). Die Expression beider Proteine beginnt kurz vor der Geburt, erreicht einige Tage später ein Maximum und sinkt dann langsam ab, bis zum Zeitpunkt der vollständigen Myelinisierung nach vier Wochen nur noch eine sehr schwache Expression nachweisbar ist. Kommt es zu einer Nervenläsion und einer daraus resultierenden De- und Regeneration des Nervens, so wird die Expression beider Proteine sowohl proximal als auch distal der Läsion erneut induziert, mit einem Maximum nach einer Woche und einer sich anschließenden Reduktion auf den ursprünglichen Wert nach drei Wochen. Die Autoren schließen daraus, dass die Sekretion von Fibronectin durch Fibroblasten und Endothelzellen die Regeneration verletzter Nerven erleichtert, indem Fibronectin als Chemoattraktor zum einen die Migration der Schwannzellen in die Läsion und die Formierung des Büngner'schen Bandes induziert (Fawcett und Keynes, 1990) und zum anderen das Auswachsen der Neuriten anregt, die ebenfalls $\alpha_5\beta_1$ Rezeptoren exprimieren (Yanagida *et al.*, 1999).

Das Expressionsmuster von Plasmolipin der Ratte ist nahezu identisch mit den hier dargestellten des Fibronectins und des $\alpha_5\beta_1$ Rezeptors: Alle drei erreichen kurz nach der Geburt eine maximale Expression und sind im adulten Stadium kaum zu detektieren, werden aber nach Nervenläsionen erneut induziert. An dieser Stelle soll noch einmal betont werden, dass der Großteil anderer Myelogene auch im adulten Stadium konstant hoch exprimiert wird. Plasmolipin, $\alpha_5\beta_1$ und Fibronectin scheinen also eine Funktion zu Beginn und während der Myelinisierung zu haben, zum Beispiel bei der Initiation oder bei der Interaktion zwischen Axon, Schwannzelle und Extrazellulärmatrix. Alternativ zu dieser Annahme besteht die Möglichkeit, dass Plasmolipin ein ähnliches Expressionsmuster aufweist, weil es im Zuge einer (Re-) Myelinisierung als Membranprotein verstärkt

benötigt wird, funktionell aber nichts mit Integrinen gemeinsam hat. In diesem Fall sollte die Expression aller Proteine aber auch nach der Bildung des Myelins konstant hoch bleiben, da für die Aufrechterhaltung des Myelins ständig neue Proteine gebraucht werden würden. Wenn Plasmolipin, $\alpha_5\beta_1$ und Fibronectin aber eine Rolle bei der Initialisierung der Myelinisierung spielen, sollte die Expression nach erfolgreicher Myelinbildung auf ein niedriges Niveau zurückfallen.

4.2.2 Zellmorphologie

Eine weitere Auswirkung der RNA_i-Induktion durch Plasmolipin spezifische RNA-Duplexe besteht in einer Veränderung der am häufigsten in dieser Zellpopulation anzutreffenden Zellform von einer Spindelform zu einem flächigeren Aussehen ohne längere Fortsätze. Plasmolipin überexprimierende Schwanzzellen bilden verstärkt Filopodien aus, die darüber hinaus zum Teil verzweigt sind und am Ende kleine Blasen-Strukturen aufweisen können. Plasmolipin überexprimierende MDCK-Zellen, die im unbehandelten Zustand einen eher glatten Rand aufweisen, zeigen sehr viele kleine Ausläufer bevorzugt an den zu den Nachbarzellen gerichteten Seiten. Die Entstehung einer abweichenden Zellmorphologie setzt eine Umorganisation des Zellskelettes voraus (Weiner *et al.*, 2001), an der Plasmolipin bzw. das Fehlen dieses Proteins direkt oder indirekt beteiligt sein muss.

Unterstützt wird diese These durch den Befund, dass Plasmolipin auch direkt an Aktin-Filamente binden kann und so direkten Kontakt mit dem Zytoskelett haben könnte (Angaben Dr. Sapirstein, unveröffentlicht). Vor allem aber scheint -wie schon erwähnt - eine Expressionsänderung des Plasmolipins das stöchiometrische Verhältnis der Integrin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu verändern. Integrine übermitteln die von außen kommenden Signale ins Zellinnere und modulieren entsprechend dieser Informationen das Zytoskelett. Eine Veränderung der Integrin-Zusammensetzung auf der Zelloberfläche sollte daher auch zu einer veränderten Zellmorphologie führen.

In diesem Zusammenhang ist eine Beobachtung interessant, die wiederum an Schwanzzellen aus Schwannomen der Neurofibromatose Typ II gemacht wurden. Diese Zellen zeigen vermehrte Filopodien-Bildung und Aussprossung (Rosenbaum *et al.*, 1998; Pelton *et al.*, 1998), also eine Morphologie, die entgegengesetzt zu den Plasmolipin reduzierten Zel-

len ist, aber der Plasmolipin überexprimierender Zellen entspricht. Die betroffenen Zellen verlieren ihre Orientierung und ummanteln keine Axone, sondern gelegentlich Komponenten der Extrazellulärmatrix (Pseudomesaxon-Bildung; Giovannini *et al.*, 1999; Erlandson und Woodruff, 1982; Dickersin, 1987). Als eine mögliche Erklärung wird angenommen, dass solchen Zellen das oben beschriebenen Merlin fehlt, mit der Folge, dass sich die Menge an $\alpha_6\beta_1$ - und $\alpha_6\beta_4$ -Rezeptoren erhöht (Shaw *et al.*, 2001). Hierdurch soll es über die Aktivierung von Kinasen zu einer Umorganisation des Zytoskelettes und Ausbildung von Stress-Fibrillen kommen (Pelton *et al.*, 1998). Plasmolipin reduzierte Zellen zeigen eine verringerte α_6 -Expression, so dass die Menge an $\alpha_6\beta_1$ - und $\alpha_6\beta_4$ -Rezeptoren ebenfalls herabgesetzt sein sollte. Für Plasmolipin überexprimierende Zellen gilt eine reziproke Regulation. Sollte die Annahme zutreffen, dass eine Veränderung der $\alpha_6\beta_1/\beta_4$ -Menge die Fibrillen-Bildung beeinflusst, so sollte die Veränderung der Menge der α_6 -Integrin-Untereinheit zu einer veränderten Zytoskelett-Organisation führen und könnte daher eine Ursache für die veränderte Morphologie der in ihrer Plasmolipin-Expression veränderten Schwannzellen sein.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die veränderte Zellform der Schwannzellen besteht darin, dass die in Plasmolipin supprimierten Zellen zu findende reduzierte Menge einzelner Myelinkomponenten wie PMP22 oder P0 (siehe 4.4 und 4.5) über einen noch nicht bekannten Mechanismus zu dieser neuen Morphologie beiträgt. Da zum Beispiel das Ansteigen der PMP22-Menge zu einer sichtbaren Änderung der Zellform führt (Müller, 2000), lässt sich vermuten, dass eine Abnahme an PMP22 ebenfalls einen ähnlichen Effekt nach sich ziehen könnte. Zudem ist P0 mit einem Anteil von ca. 50 % das dominierende Protein in der Myelinmembran, so dass eine Veränderung der P0-Menge auch in einem relativ geringen Ausmaß zu einer Änderung der Zellmorphologie und des Zytoskelettes führen sollte. Dies gilt umso mehr, als P0 mit der Membran und dem Zytoskelett interagieren und so die Kompaktierung des Zytoplasmas im Myelin bewirken kann (Doyle *et al.*, 1995).

4.3 Tetraspan Moleküle und Integrine

Es stellt sich die Frage, auf welche Art und Weise Plasmolipin mit Integrinen, aber auch mit anderen Myelinkomponenten interagieren könnte. In diesem Zusammenhang ist es interessant, Parallelen mit schon bekannten Assoziationen zwischen Tetraspan Molekülen und Integrinen zu ziehen sowie den Aufbau der Zellmembran zu betrachten.

4.3.1 Lipid Rafts

Unbehandelte Schwanzzellen der Ratte zeigen unter Verwendung des Antikörpers α Pla4 eine starke Anfärbung der Zellmembran sowie des Zellinneren, wobei vor allem die Umgebung des Zellkerns intensiv hervortritt. In Schwanzzellen, deren Plasmolipin-Expression mittels RNA_i reduziert wurde, ist die Färbung weit schwächer, so dass einzelne Komponenten unterschieden werden können. Auffällig ist dabei vor allem eine Struktur in der Nähe des Zellkerns sowie granuläre Anfärbungen im Zytoplasma der Zellen, bei denen es sich um den Golgi-Apparat und Transportvesikel handeln könnten. Dies deckt sich auch mit dem früheren Befund, dass Plasmolipin in ummantelten Vesikeln der Weißen Hirnsubstanz gefunden wurde (Sapirstein *et al.*, 1992c).

Es konnte in jüngster Zeit gezeigt werden, dass sich Plasmolipin aus Myelin peripherer Nerven der Ratte ebenfalls in sogenannten Lipid Rafts nachweisen lässt (Hasse *et al.*, 2002). Lipid Rafts oder auch Cholesterol- und Galactosylceramid-reiche Membrandomänen sind kleine, dynamische Ansammlungen von Lipiden und Proteinen, die sich relativ frei in der zellulären Membran bewegen, sich aber auch zu größeren und geordneteren Plattformen zusammen finden können (Simons und Ehehalt, 2002; Simons und Toomre, 2000). Zu den Proteinen, die sich permanent in diesen Mikrodomänen befinden, gehören unter anderem Transmembranproteine wie zum Beispiel einige Integrine oder Tetraspan Moleküle. Mehrere Gruppen anderer Proteine unterliegen in dieser Hinsicht einer starken Regulation, da sie *per se* nur eine geringe Affinität zu Rafts zeigen und erst nach einer Ligandenbindung bzw. einer daraus resultierenden Konformationsänderung und/oder Oligomerisierung in diese Mikrodomänen rekrutiert werden (Harder *et al.*, 1998).

In Säugerzellen wird die Vorstufe der Cholesterols, das Ceramid, im Endoplasmatischen Retikulum (ER) gebildet, von dort zum Golgi-Apparat transportiert und zur Synthese von Sphingolipiden verwendet. Hier erfolgt auch die Bildung der Rafts-Strukturen und die Absonderung von Vesikeln für den Transport in die Plasmamembran (Brown und London, 1998). Ein eindeutiger Nachweis der Kolo-kalisation von Plasmolipin mit dem Endoplasmatischen Retikulum oder dem Golgi-Apparat steht bislang noch aus, dennoch ist es einsichtig, dass Plasmolipin als Bestandteil der Rafts am Entstehungsort der Mikro-domänen, dem Golgi-Apparat, in diese integriert und von dort über Vesikel zur Zellmembran transportiert werden sollte. Hinzuzufügen ist allerdings, dass das Vorhandensein von Rafts in Schwanzzellen der Zellkultur bislang noch nicht explizit gezeigt wurde und es sich bei den Anfärbungen um Rafts-unabhängige Strukturen handeln könnte. Nimmt man aber an, dass Plasmolipin ein integraler Bestandteil der Rafts auch in Schwanzzellen ist, könnten verschiedene Aufgaben postuliert werden, die Plasmolipin innehaben könnte:

1. Plasmolipin hat eine eigenständige, von anderen Rafts-Komponenten unabhängige Funktion
2. Plasmolipin besitzt eine Funktion in der Strukturierung der Rafts
3. Plasmolipin ist notwendig zur Proteinsortierung in Rafts und/oder zum Transport von Rafts-haltigen Vesikeln zum Bestimmungsort

Die nachfolgenden Überlegungen deuten daraufhin, dass Plasmolipin direkt oder indirekt in die Funktion von Rafts und Rafts vermittelten Signalantworten involviert sein könnte, so zum Beispiel in die Integrin vermittelte Zelladhäsion (zur Übersicht siehe Abb. 22).

4.3.2 Integrine und Tetraspan Moleküle

Plasmolipin wird nach einer neuen Einteilung als TM4SF11 ebenfalls zur Transmembran 4 Superfamilie gerechnet (TM4SF oder Tetraspanine; Porter und Hogg, 1998; EMBL: NM026385, NM015993), obwohl einige Kriterien wie ein CCG-Motiv in der Aminosäuresequenz fehlen. Andere Eigenschaften wie der topographisch Aufbau stimmen dagegen überein. Die Mitglieder der Tetraspanine kommen in allen höheren Organismen ab der Ordnung der Schwämme vor und bestehen aus einer wachsenden Anzahl von zur Zeit

über 26 Mitgliedern, die untereinander in einem „Tetraspan Web“ verbunden sind (Berditchevski, 2001). Diese Multimembran-Moleküle scheinen mit den Lipid Rafts assoziiert zu sein (Claas *et al.*, 2001) und die Fähigkeit zu besitzen, Integrine nach einer Ligandenbindung in den Mikrodomänen zusammen zu halten. Möglicherweise geschieht dies erst nach einer Oligomerisierung der Integrine durch eine laterale Aktivierung untereinander, dem sogenannten „*integrin cross talk*“ (Stewart *et al.*, 1998).

Bislang wurden vor allem auch zahlreiche Interaktionen zwischen Integrinen und Tetraspaninen beschrieben wie zum Beispiel zwischen CD151 und $\alpha_3\beta_1$ bzw. $\alpha_6\beta_1$ oder CD81 und $\alpha_4\beta_1$ (Serru *et al.*, 1999; Berditchevski und Odintsova, 1999). Es wird daher vermutet, dass Tetraspanine, aber auch andere Tetraspan Moleküle die Zelladhäsion über drei Wege beeinflussen könnte:

1. Modulation der Integrin-vermittelten Signal-Transduktion

Tetraspanine könnten Signal-Moleküle wie zum Beispiel die PKC α und bestimmte Integrine in räumliche Nähe bringen und/oder Rezeptoren mit Hilfe des „Tetraspan Webs“ aktivieren (Hemler, 1998).

2. Kompartimentierung der Zell-Oberfläche

Einige α -Untereinheiten assoziieren mit Tetraspaninen, bevor die β -Untereinheit zum Komplex hinzugefügt wird (Berditchevski *et al.*, 2001). Zudem wurden Tetraspanin Proteine in intrazellulären Vesikeln detektiert (Escola *et al.*, 1998), so dass die Vermutung nahe liegt, dass Tetraspanine an der Sortierung oder der Halbwertszeit von Integrinen beteiligt sind.

3. Modulation des intrazellulären Proteintransports

Trotz kontroverser Diskussionen sind einige Veröffentlichungen erschienen, die das Vorhandensein von Tetraspanin-Integrin-Komplexen in Rafts beschreiben (Claas *et al.*, 2000). Das Vorhandensein von Rafts-assoziierten Tetraspaninen könnte eine Erklärung liefern, warum einige Integrine erst nach einer Aktivierung in Rafts rekrutiert werden.

Es ist zu vermuten, dass Plasmolipin ebenfalls einige der beschriebenen Funktionen innehat - nicht zuletzt deshalb, weil dies nicht nur für mehrere Tetraspanine, sondern auch für einige nicht-Tetraspanin 4TM-Proteine bereits beschrieben wurde.

Ein sehr interessantes Beispiel stellt das Epitheliale Membran Protein 2 (EMP2) dar, ein Mitglied der GAS3/PMP22-Familie mit einer vermuteten Tumor-Suppressor-Aktivität (Wadehra *et al.*, 2002). EMP2 ist assoziiert mit β_1 -Integrinen, konnte aber nur mit dem $\alpha_6\beta_1$ -Rezeptor, aber nicht mit dem $\alpha_5\beta_1$ -Rezeptor kolokalisiert werden. Im Falle einer Überexpression wurde eine erhöhte Menge an $\alpha_6\beta_1$ und damit einhergehend eine erhöhte Adhäsion auf Laminin nachgewiesen, während gleichzeitig $\alpha_5\beta_1$ reduziert exprimiert wurde und die Adhäsion auf Fibronectin abnahm. Wurde die EMP2-Expression über ein spezifisches Ribozym reduziert, kehrten sich die Folgen um: Es kam zu einer erniedrigten $\alpha_6\beta_1$ -Expression und einer erniedrigten Bindung an Laminin, während die Menge an $\alpha_5\beta_1$ zunahm und dementsprechend die Bindung an Fibronectin. Die Autoren schlossen daraus, dass EMP2 und eventuell andere Mitglieder der GAS3/PMP22-Familie ähnlich wie Tetraspanine die Fähigkeit zur Interaktion mit Integrinen besitzen, darüber hinaus Einfluss nehmen auf das Repertoire der auf der Zelloberfläche vorhandenen oder aktiven Rezeptoren und letztendlich eine physiologische Rolle in der Zellproliferation, Adhäsion und Migration spielen. Die Expressionsänderung des 4TM Proteins Plasmolipin führt in einem ähnlichen Ausmaß zu einer Veränderung der Adhäsionseigenschaften von Schwannzellen der Ratte an Fibronectin und Laminin. Dies und weitere Ähnlichkeiten mit PMP22 und mit dem im folgenden beschriebenen MAL führen zu der Frage, ob Plasmolipin nicht eine vergleichbare biologische Aufgabe besitzt. In Anlehnung an die Erkenntnisse über EMP2 lässt sich folgende Hypothese aufstellen:

Plasmolipin wird im Golgi-Apparat in Rafts eingebaut und könnte direkt oder indirekt noch zu bestimmte Rafts-Komponenten (vermutlich $\alpha_5\beta_1$ - oder $\alpha_4\beta_1$ - Integrine) in diese Mikrodomänen rekrutieren. Diese Assoziation könnte auch die bevorzugte Bildung bestimmter Heterodimere und/oder die Proteinsortierung beeinflussen (Berditchevski *et al.*, 2001; Wadehra *et al.*, 2002). Die Bildung oder Rekrutierung der α_6 -Integrine könnte vermindert werden, indem zum Beispiel die Expression durch einen Rückkopplungsmechanismus reduziert wird. Die Plasmolipin-Komplexe gelangen so über Vesikel in die Plas-

Plasmalipin in der Plasmamembran und ermöglichen wie oben beschrieben die Rafts vermittelten Zellfunktionen wie zum Beispiel die Adhäsion an Fibronectin. Denkbar ist auch, dass sich Plasmolipin ohne Assoziationspartner in den Rafts befindet und erst nach einer Aktivierung bzw. einer Aktivierung der Interaktionspartner mit diesen einen Komplex eingeht und so funktionell zusammengehörende Proteine in räumlicher Nähe akkumuliert. Einer solchen Funktion käme große Bedeutung während der Entwicklung und in Regenerationsprozessen zu.

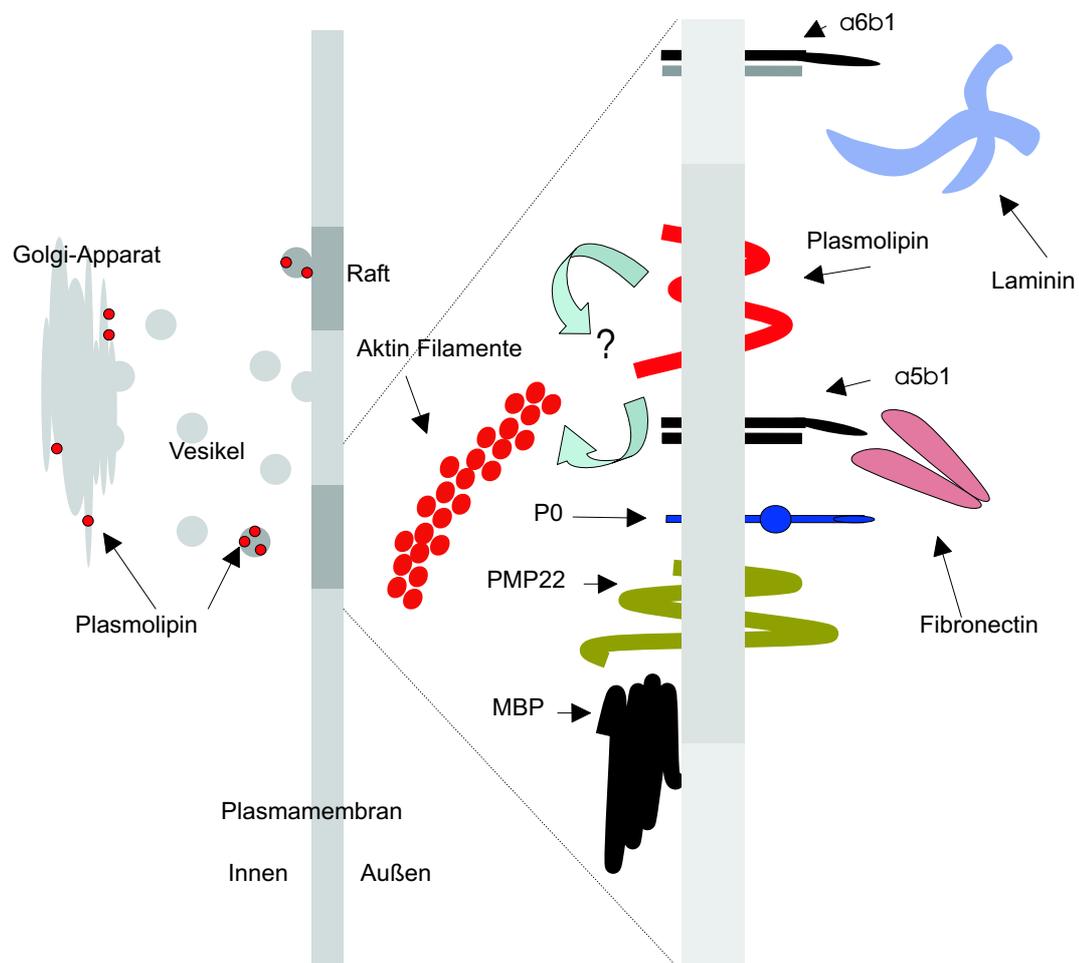


Abbildung 22: Modell zur Verteilung von Plasmolipin in der Zellmembran

Plasmolipin gelangt im Golgi-Apparat oder im Endoplasmatischen Retikulum in die Lipid Rafts und könnte dort eine Funktion in der Proteinsortierung anderer Rafts-Komponenten besitzen. Über Vesikel gelangt Plasmolipin in die Zellmembran, in der es zusammen mit anderen Rafts-Komponenten wie P0 oder PMP22 assoziiert sein könnte. Auch eine Interaktion mit Integrinen wie zum Beispiel dem aktivierten Fibronectin-Rezeptor $\alpha_5\beta_1$ oder direkt mit Aktin-Filamenten (durch ein Fragezeichen markiert) ist denkbar. Die Abbildung ist nicht maßstabsgerecht.

Diese Art der Modulation der Adhäsion über Veränderungen der Integrin-Rezeptor Antwort wird bereits für einige Myelin assoziierte Proteine diskutiert. In Oligodendrozyten konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass das 4TM Proteolipid Protein (PLP) mit α_V -Integrinen interagieren und eine Neurotransmitter vermittelte Signal-Transduktion sowie infolgedessen die Fibronectin-Bindung beeinflussen kann (Gudz *et al.*, 2002). Interessanterweise wurde PLP zunächst als Ionophore beschrieben (Diaz *et al.*, 1990), die Natrium abhängige Ströme in künstlichen Membranen hervorrufen kann (Ting-Beall *et al.*, 1979). Dies ist eine Parallele zu Plasmolipin, dessen biologische Funktion als die eines Kalium-Kanals beschrieben worden ist (Sapirstein und Rounds, 1983). Simons und Kollegen konnten am Beispiel des PLPs in Oligodendrozyten zeigen, dass für die richtige apikale Sortierung der Myelin-Komponenten die Funktionstüchtigkeit von spezialisierten Lipid Rafts-Domänen, den CHAPS-unlöslichen Membranfraktionen, notwendig ist (Simons *et al.*, 2000). An der Verschmelzung von Rafts zu größeren Funktionseinheiten sollen dabei auch zytosolische Komponenten wie zum Beispiel das Membran-assoziierte MBP eine Rolle spielen.

Plasmolipin zeigt eine enge zeitliche und räumliche Korrelation mit Myelinisierungsprozessen, bei denen Adhäsionsprozesse (zum Beispiel bei der Ummantelung der Axone durch die Schwannzellen) und der koordinierte Zusammenbau der Myelin-Bestandteile im Vordergrund stehen. Sollte Plasmolipin an diesen Vorgängen beteiligt sein, müsste eine Expressionsänderung des Plasmolipins wie bei EMP2 zu einer Expressionsänderung von anderen Rafts-Molekülen führen. Dies ist auch der Fall, wie im nächsten Abschnitt erläutert wird.

4.4 Der Einfluss des Plasmolipins auf andere Myelिंगene

Die Reduktion der Plasmolipin-Expression über siRNAs führt zu Veränderungen in der Expression anderer an der Bildung von Myelin beteiligten Gene, obwohl die Auswirkungen des RNA_i sehr spezifisch nur den Abbau der Plasmolipin-mRNA bewirkt. Es ist daher unwahrscheinlich, dass dies auf die Mechanismen der RNA_i selbst zurückzuführen ist.

In Plasmolipin supprimierten Schwannzellen der Ratte stellt man neben des sehr starken Rückganges der Plasmolipin-mRNA Menge eine gleichzeitige Reduktion der in Rafts vorkommenden Membranproteine P0 und PMP22 fest, wohingegen die Expression des MBP

stark und die des 4TM Proteins MAL sehr stark ansteigt. Anzumerken ist dabei allerdings, dass die Ergebnisse sich nur auf RNA beziehen, ohne dass die Reduktion bislang auf Proteinebene untersucht wurde.

Die Expressionsänderung des Plasmolipin-Gens scheint also eine Veränderung des stöchiometrischen Verhältnisses der Rafts-Komponenten nach sich zu ziehen, wobei die Art der Rückkopplung und die zugrunde liegenden Mechanismen nur spekulativ sein können. Plasmolipin könnte an der apikalen Proteinsortierung beteiligt sein und bei einer Störung einen fehlerhaften Transport in die Plasmamembran verursachen, der eine veränderte Rafts-Zusammensetzung und eine veränderte Signalantwort bedingt. Das Fehlen von Plasmolipin könnte auch zu einer verringerten Stabilität der Rafts und/oder veränderten Halbwertszeiten einiger Rafts-assoziierten Proteine wie PMP22 oder P0 führen. Bei beiden Möglichkeiten müsste ein Rückkopplungsmechanismus postuliert werden, der die veränderte Stöchiometrie der Zellmembran in ein verändertes Expressionsmuster umsetzt. Andere, nicht in Rafts vorkommende Proteine sollten nicht betroffen sein oder nur dann, wenn sie eine Rolle für die Integrität der Mikrodomänen spielen, wie dies zum Beispiel bei MBP der Fall ist. MBP wird anders als P0 oder PMP22 nicht im Endoplasmatischen Retikulum oder im Golgi-Apparat synthetisiert, sondern erst an der Plasmamembran translatiert, mit der es nur über einen kurzen Membran-Anker verbunden ist (Colman *et al.*, 1982; Trapp *et al.*, 1987; Griffiths *et al.*, 1989). Wie oben bereits erwähnt, soll MBP an der Funktion der CHAPS-unlöslichen Membranfraktionen beteiligt sein (Simons *et al.*, 2000). Wenn die Zusammensetzung dieser spezialisierten Rafts durch eine veränderte Plasmolipin-Menge gestört sein sollte, könnte die leichte Erhöhung der MBP-Expression einen Mechanismus darstellen, eine etwaige erschwerte Bildung dieser Membrandomänen zu ermöglichen. Dies wäre ein weiteres Indiz dafür, dass Plasmolipin an der Proteinsortierung oder der Bildung von Rafts beteiligt sein könnte. Eine andere Erklärungsmöglichkeit für die erhöhte MBP-Expression könnte darin liegen, dass die Membranfläche an Nicht-Rafts-Bereichen aufgrund einer etwaig gestörten Rafts-Bildung im Vergleich zu unbehandelten Zellen größer geworden und der Bedarf an Nicht-Rafts Membranproteinen angestiegen sein könnte. Für die Klärung dieser Frage sind Untersuchungen zur Rafts-Bildung in diesen Zellpopulationen notwendig.

Das 4TM-Protein MAL wurde in den Plasmolipin supprimierten Zellen ähnlich wie MBP in verstärktem Maß exprimiert. Da MAL und Plasmolipin verwandte Proteine darstellen und vermutlich Gemeinsamkeiten haben könnten, soll MAL zunächst eingehender betrachtet werden.

4.5 Ähnlichkeiten zwischen Plasmolipin und MAL

Das Myelin und Lymphozyten Protein MAL (auch VIP17/MVP17) wurde 1987 in einer cDNA-Bank gefunden, die aus der RNA später Stadien von humanen T-Zellen gewonnen wurde. Diese cDNA kodiert ein Protein mit einem Molekulargewicht von 16.7 kDa und vier möglichen TM (Alonso und Weissman, 1987). Die Entschlüsselung der genomischen Struktur des humanen MALs zeigte, dass dieses Gen aus vier Exonen besteht, die jeweils eine TM und einen Teil der außerhalb der Membran liegenden Bereiche kodieren (Rancano *et al.*, 1994). Auffällig ist weiterhin ein mit 14 kb sehr großes Intron I.

Wie der Name bereits andeutet, wurde MAL auch im Myelin von ZNS und PNS gefunden, in denen es parallel zur Myelinisierung zunehmend exprimiert wird (Frank, 2000). Weiterhin findet sich MAL in epithelialen Zellen zum Beispiel der Niere oder der Schilddrüse und zwar ausschließlich in Vesikeln und in der apikalen Membran. Hier ist MAL ebenfalls mit Rafts assoziiert (Zacchetti *et al.*, 1995). Untersuchungen mit ektopisch exprimiertem MAL in Insekten-Zellen zeigten, dass MAL an der Bildung vesikulärer Strukturen im *trans*-Golgi Netzwerk beteiligt ist, zwischen Golgi-Apparat und Plasmamembran zu zirkulieren scheint und somit an der Rafts-vermittelten Proteinsortierung für die apikale Zellmembran beteiligt sein könnte (Puertollano *et al.*, 1997).

Es ist früh darauf hingewiesen worden, dass MAL und Plasmolipin aufgrund einer Vielzahl an ähnlichen Eigenschaften einer Proteinfamilie angehören (Magyar *et al.*, 1997). Zwar beläuft sich die Aminosäure-Homologie über das gesamte Protein auf nur 27 %, doch gibt es zwischen der ersten extrazellulären Schleife und der zweiten TM in beiden Proteinen ein gemeinsames Motif der Sequenz $-(Q,Y)GWVM(F,Y)V(S,A)(V,L)-$, welches nur in der MAL-Familie vorzukommen scheint. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass neben ähnlicher Größe und Struktur noch weitere Faktoren für eine Verwandtschaft beider Membranproteine sprechen.

Wie bereits angedeutet, finden sich beide Proteine in den Rafts apikaler Membranen von polaren Zellen sowie - im Falle des Plasmolipin hypothetisch - im *trans*-Golgi Netzwerk und den vesikulären Strukturen. Weiterhin gleichen sich die genomischen Strukturen der Gene für MAL und Plasmolipin sehr stark, da beide aus vier jeweils eine TM kodierenden Exonen bestehen und ein großes Intron I aufweisen. Hier finden sich in beiden Genen eine Vielzahl putativer Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, wobei eine eingehendere Analyse klären muss, inwieweit sich beide Gene in ihrer Genregulation unterscheiden bzw. gleichen. Für eine gekoppelte Regulation spricht neben dem Vorkommen in denselben Zelltypen auch die enge zeitliche Korrelation der Expression beider Proteine mit der Myelinisierung im PNS während der postnatalen Entwicklung (Kim *et al.*, 1995; Schaeren-Wiemers *et al.*, 1995; Gillen *et al.*, 1996). Vor allem aber führt eine Reduktion der Plasmolipin-Expression zu einem starken Anstieg der MAL-Expression, was im Gegensatz zu den meisten Myelinen wie P0 oder PMP22 steht. Es ist zu vermuten, dass die Abnahme der Plasmolipin-Proteinmenge ein stöchiometrisches Ungleichgewicht der Rafts-Zusammensetzung zur Folge haben könnte und/oder dass MAL die Aufgabe des nun nicht mehr in ausreichender Menge vorhandenen Plasmolipins übernehmen könnte, so dass es im verstärkten Maß gebildet wird. In beiden Fällen müsste die Expression von MAL kompensatorisch verstärkt werden, was zum Beispiel indirekt über Rückkopplungsmechanismen aufgrund einer möglichen andersartigen Rafts-Struktur geschehen könnte. Da MAL eine Rolle in der apikalen Proteinsortierung spielt, unterstützt dieser Kompensationsmechanismus im Umkehrschluss die Vermutung, dass Plasmolipin an ähnlichen Vorgängen beteiligt ist.

4.6 Vitalität

Im Hinblick auf die durchgeführten Adhäsions-Tests stellt sich die Frage, ob eine reduzierte Plasmolipin-Menge bei Schwanzzellen einen Einfluss auf die Vitalität der Zellen hat, d.h., ob das Fehlen von Plasmolipin das Überleben oder die Teilungsfähigkeit der Zellen verändert. Dies ist wichtig, da eine direkte Messung der Adhäsion nicht möglich ist und der angewandte Test nur eine indirekte Schlussfolgerung auf das Anhaftungsverhalten der Zellen erlaubt. Die Daten der Apoptose- und Proliferations-Assays zeigen, dass beide Pa-

parameter nur leicht verändert sind und sich nicht signifikant von den Werten unbehandelter Zellen unterscheiden. Es ist daher wahrscheinlich, dass die reduzierte Adhäsionsfähigkeit der Plasmolipin supprimierten Zellen auf das Fehlen von Plasmolipin zurückzuführen ist und nicht auf eine verringerte Vitalität, die ein Anheften und Überleben auf Fibronectin oder Laminin verschlechtern bzw. verbessern würde. Ähnliches gilt für die weiteren gemessenen Parameter wie zum Beispiel die Expressionsänderungen anderer Gene, die vermutlich nicht durch das Einsetzen der Apoptose o.ä. zu erklären sind.

4.7 Plasmolipin überexprimierende Mäuse

Eine weitere Möglichkeit, die biologische Funktion von Plasmolipin *in vivo* zu untersuchen, besteht in der Überexpression des betreffenden Gens in Mäusen. Zu diesem Zweck kloniert man das Gen oder die entsprechende cDNA in einen Vektor mit einem Promotor, der eine Expression im späteren transgenen Tier zu einem definierten Zeitpunkt und/oder in einem bestimmten Gewebe oder Zelltyp erlaubt. Zur Generierung Plasmolipin überexprimierender Mäuse sollte ein Transgen zum Einsatz kommen, das nur in Schwanzzellen aktiv ist und zusätzlich ein ähnliches Expressionsmuster aufweist wie das endogene Plasmolipin-Gen. Die Wahl fiel auf den Schwann Cell Enhancer (SCE), da dieser gut charakterisiert ist und bereits zur Generierung einer Oct-6 überexprimierenden Transgen-Maus verwendet wurde (Mandemakers *et al.*, 2000). Der SCE ist nur in Schwanzzellen aktiv, wobei die Aktivität während der Entwicklung der Maus ab dem Stadium E14 einsetzt, um den Zeitpunkt der Geburt ein Maximum besitzt und dann im zum adulten Tier bis unter die Nachweisgrenze abfällt. Darüber hinaus ist dieser Enhancer auch in Quetsch- und Transsektionsexperimenten am Ischiasnerv als reguliert gefunden worden, da die Aktivität im Zuge der Remyelinisierung verletzter Nerven erneut einsetzt (Mandemakers *et al.*, 2000). Insgesamt ähnelt das Expressionsmuster also dem des Plasmolipins, setzt zeitlich aber etwas früher an und ist in adulten Tieren inaktiv. Eine Verwendung als Enhancer zur Expression von exogenem Plasmolipin sollte daher zu einer spezifischen Überexpression in den Schwanzzellen während der Entwicklung und in Quetschexperimenten am Ischiasnerv führen, ohne dass andere Organe oder das unbehandelte adulte Tier betroffen sein sollten. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass im Falle des SCE die Klonierung einer cDNA zur

spezifischen Expression ausreichend ist, wohingegen bei anderen Expressionsstrategien wie zum Beispiel beim P0-Promotor die Klonierung des gesamten Gens als notwendig erachtet wird (Angaben Prof. Wrabetz, DIBIT, Milan). Als Unterscheidungsmöglichkeit zwischen endogenem und exogenem Plasmolipin wurden das N-terminale Ende des Proteins mit einem Hämagglutinin-Rest versehen.

Die Erzeugung transgener F0-Tiere, den sogenannten Founder-Tieren, verlief ohne Schwierigkeiten; der Anteil an Tieren mit nachgewiesenem Transgen von ca. 38 % liegt in einem erwarteten Bereich (Angaben nach Dr. T.Theil, Düsseldorf). Die Tiere verhielten sich unauffällig und zeigten auf den ersten Blick keinen veränderten Phänotyp. Die weitere Verpaarung mit C57/Bl6 Tieren verlief problemlos, und auch die Wurfgrößen schwankten mit 5-14 Tieren in einem normalen Bereich.

Um sicherzustellen, dass auftretende Veränderungen nicht auf den Insertionsort und etwaig veränderte Gene oder chromosomale Regulationsbereiche zurückzuführen sind, sollten insgesamt mindestens drei verschiedene Linien aus drei unabhängigen Gründer-Tieren gezüchtet werden. In der F1-Generation konnte das verwendete Konstrukt allerdings nur in 12 % aller Tiere nachgewiesen werden, in der F2-Generation sogar nur in rund 6 %. Diese Mäuse erschienen wie die Gründer-Tiere äußerlich betrachtet vital. Die bei den durchgeführten PCRs verwendeten Kontrollen (genomische DNA einer Wildtyp-Maus als Negativ-Kontrolle, 20 fg des SCE-Vektors vermischt mit einer genomischen DNA eines der untersuchten Tiere als Positiv-Kontrolle) sowie der Nachweis des Aktin-Gens als DNA-Überprüfung in einer separaten PCR verliefen jeweils entsprechend positiv.

Es ist noch nicht geklärt, wie diese geringe Penetranz zustande kommt. Eine Inhibition der Polymerase in der genomischen PCR ist zwar vorstellbar, aber aufgrund der Kontrollen und der etablierten Methode eher unwahrscheinlich. Bei den transgenen Tieren handelte es sich um Männchen und Weibchen, so dass zum Beispiel nachteilige Einflüsse auf die Bewegung von Spermien, die das Transgen tragen (Tiere sind heterozygot), ausgeschlossen werden können. Die Anzahl von verstorbenen Jungtieren lag in einem normalen Bereich (6 von 306 Tieren), so dass dieser Effekt nicht postnatal einsetzen kann. Es ist

eine intensivere Untersuchung vor allem während der Mausentwicklung erforderlich, um die Gründe für diese geringe Penetranz zu erklären.

Die ursprüngliche Erwartungshaltung bei der Planung und Generierung der transgenen Mäuse war, dass Plasmolipin überexprimierende Tiere vergleichbare Störungen der Myelinogenese nach sich ziehen sollte wie sie von Myelingenen wie PMP22 oder PLP bekannt sind, d.h. Demyelinisierung bestehender Myelinscheiden im PNS und daraus resultierende Abnormalitäten vor allem im Gebrauch der Extremitäten. Die Überexpression von Myelingenen wie P0, PMP22 oder PLP führen sowohl bei humanen Erbkrankheiten wie auch im Tiermodell zu einer Hypo-, De- oder Dismyelinisierungen (Müller, 2000; Bronstein, 2000; Nave, 1994). Studien von Wrabetz und Kollegen zum Beispiel zeigten, dass die Überexpression von P0 in Mäusen zu einer dosisabhängigen Hypomyelinisierung peripherer Nerven und einer unvollständigen Schwanzzell-Axon-Interaktion führt (Wrabetz *et al.*, 2000). Die Auswirkungen konnten dabei nur bei Tieren mit Expressionsraten zwischen 30-80 % über den Normal-Werten gefunden werden, während höhere Raten keinen Effekt auf die Tiere zeigten. Transgene Mäuse mit einer Überexpression von PMP22 haben ebenfalls einen dosisabhängigen Phänotyp (Müller, 2000): Fehlt ein Allel oder kommt es aufgrund einer Mutation zu einem Funktionsverlust, entsteht beim Menschen die relativ mild verlaufende HNPP (hereditäre neuropathie with pulse pressures). Die Erhöhung der Gen-Kopienzahl auf drei oder mehr Allele hat dagegen die Entstehung der Charcot-Marie-Tooth Erkrankung vom Typ 1A (CMT1A) zur Folge, die in Schwanzzellen zu einer geringen Proliferationsrate, einer erhöhten Apoptoserate, einer veränderten Zellform sowie einer schwachen Ausbildung der Myelinscheide führt. Das zusätzlich gebildete PMP22 bleibt zum großen Teil im Endoplasmatischen Retikulum stecken und verursacht eine Störung des Proteintransports zur Membran.

Die bislang durchgeführte Analyse der Plasmolipin überexprimierenden Mäuse zeigte keine der vermuteten Phänotypen wie zum Beispiel Störung des Bewegungsablaufs o.ä. Es wäre möglich, dass erst eine genauere Untersuchung Veränderungen aufdecken könnte, wenn die Überexpression nur Auswirkungen auf den molekularen Aufbau der Nerven im PNS haben sollte. Zudem könnten die Folgen einer Überexpression durch noch nicht

bekannte Mechanismen kompensiert werden, wenn zum Beispiel zwar mehr Plasmolipin-mRNA, aber nicht mehr Protein gebildet wird. Auch ein verändertes Expressionsmuster zum Beispiel von MAL wäre denkbar und könnte den Auswirkungen einer erhöhten Plasmolipin-Menge entgegen wirken. Diese Annahme ist umso wahrscheinlicher, als der Schwann Cell Enhancer nur bis zum Tag P14 aktiv ist und die Plasmolipin-Expression ab diesem Zeitpunkt wieder auf die endogene Expression absinken sollte. Zu diesem Zeitpunkt ist die Entwicklung der Nerven im PNS noch nicht vollständig abgeschlossen, so dass etwaige Veränderungen in nachfolgenden Prozessen ausgeglichen werden könnten. Diese Frage könnte durch immunhistochemische Analysen von Tieren im Alter zwischen 0-14 Tagen sowie anhand von Läsionsexperimenten beantwortet werden.

4.8 Generierung von Plasmolipin defizienten Mausmutanten

Die Generierung Plasmolipin defizienter Mausmutanten ist während dieser Arbeit nicht gelungen, obwohl in drei verschiedenen Ansätzen über 1200 ES-Kolonien untersucht wurden. Für diesen Umstand kann es mehrere Gründe geben:

- Die Deletion des Gens ist - auch heterozygot - letal für die ES-Zellen, so dass alle betroffenen Zellen absterben. Diese Möglichkeit ist eher unwahrscheinlich, zumal die Expression von Plasmolipin zeitlich erst um die Geburt herum im Nervensystem beginnt und auch Schwannzellen mit reduzierter Plasmolipin-Expression keine gesteigerte Apoptoserate *per se* zeigen. Es gibt allerdings keine Angaben darüber, ob Plasmolipin in der frühen Entwicklung bzw. in ES-Zellen nicht eine bislang unbekannt Funktion ausübt.
- Es hat keine oder nur sehr geringe homologe Rekombination statt gefunden. Diese wahrscheinlichere Erklärung kann ebenfalls verschiedene Ursachen haben:
 - Der Gen-*locus* ist zum Beispiel aufgrund von umgebenden Heterochromatin für eine homologe Rekombination schlecht oder nicht zugänglich; eine Anlagerung der homologen DNA-Bereiche und/oder der beteiligten Enzyme unterbleibt. Für diese Hypothese spricht, dass sich im Plasmolipin-Gen selbst

mehrere große Fragmente mit repetitive Fragmenten finden, die auch eine Sequenzierung schwierig bzw. in einigen Fällen nicht möglich machte.

- Das verwendete Konstrukt PE12 war für eine homologe Rekombination nicht geeignet. Die das Neomycin-Resistenzgen flankierenden Bereiche, welche homolog zum 5'- und 3'-Bereich des Plasmolipin-Gens sind, könnten mit 2 kb bzw. 3.4 kb zu kurz gewählt sein, um den Austausch eines so großen Gens zu gewährleisten, vor allem im Falle eines schwer zugänglichen Gen-Ortes.

Eine fehlende Selektion oder eine falsche Handhabung kann weitgehend ausgeschlossen werden, da die mitgeführten Kontrollen der unbehandelten ES-Zellen bzw. der mit dem PGKneo-Vektor elektroporierten ES-Zellen den Erwartungen gemäß während der G418-Behandlung starben bzw. überlebten.

Zur Überprüfung der möglichen Gründe hätte es der Klonierung eines neuen Konstrukts und/oder einer erhöhten Anzahl an untersuchten ES-Kolonien bedurft. Dies erschien nach Rücksprache mit dem Zentrallabor für transgene Tiere des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums nicht zweckmäßig.

4.9 Plasmolipin und das Bardet-Biedl Syndrom

In den letzten Jahren konnte eine Vielzahl an Mutationen in Tetraspan-Myelinen gefunden und mit erblichen Demyelinisierungs-Erkrankungen korreliert werden. So verursachen Mutationen in den Genen für das Periphere Plasmamembran Protein 22 (PMP22) oder Connexin 32 verschiedene Formen der Charcot-Marie-Tooth Erkrankungen (CMT1A, Müller, 2000; CMTX, Bergoffen *et al.*, 1993), während Veränderungen im Gen des Proteolipid Proteins (PLP) zur Pelizaeus-Merzbacher-Erkrankung führen (Hudson *et al.*, 1989). In vielen Krankheitsbildern kommt es zu einer veränderten Myelinbildung durch die Schwannzellen, was dünne Myelinscheiden und eine unvollständige Kompaktierung (Auflockerung des Myelins in einer Zwiebelschalen-Form) zur Folge hat. Die Vermutung lag nah, dass auch Plasmolipin als 4TM Molekül potentiell an der Entstehung einer neurologischen Erkrankung involviert sein könnte.

Untersuchungsreihen zur Expression von Plasmolipin zeigten, dass das Plasmolipin-Protein bei der Ratte nicht nur in Niere und Nervensystem zu finden ist, sondern auch in einer Vielzahl weiterer Organe wie zum Beispiel Lunge, Thymus, Ovarien, Herzmuskel und verschiedenen Drüsen, nicht aber in der Retina, im Pankreas oder der Leber (Arbeiten von U. Pippirs, AG Molekulare Neurobiologie, Hamacher *et al.*, 2001). Weiterhin gelang es, den Gen-*locus* des humanen Plasmolipin-Gens über zwei unabhängige Methoden auf die Region Chromosom 16q13 einzugrenzen (Arbeiten von A. Köhler, Institut für Human Genetik, Giessen, und F. Bosse, AG Molekulare Neurobiologie; Hamacher *et al.*, 2001). Dieser Bereich wurde bereits über Stammbaum-Analysen mit dem Bardet-Biedl Syndrom Typ 2 assoziiert (Kwitek-Black *et al.*, 1993).

Das Bardet-Biedl Syndrom (OMIM 209900) ist eine generische Beschreibung für eine Gruppe von klinisch und genetisch sehr heterogenen Erkrankungen, die zu retinaler Dystrophie, postaxialer Polydactyly, Hypogenitalismus, renaler Dysfunktionen und mentaler Retardierung führen können (Bardet, 1995; Biedl, 1995; Green *et al.*, 1989; Harnett *et al.*, 1988). Nicht jeder Patient zeigt dabei alle Symptome, und in betroffenen Familien ist die Ausprägung der Symptome variabel: Fast alle Patienten leiden an retinaler Dystrophie (90 %) oder an Polydactyly (70 %), aber nur 50 % entwickeln Nieren-Funktionsstörungen oder Ataxien (40 %; Beales *et al.*, 1999).

BBS ist selten, zeigt eine autosomal rezessive Vererbung und wird in sechs verschiedene Subtypen (BBS1-BBS6) eingeteilt, entsprechend der zugehörigen unabhängigen Krankheits-*loci* (Mykytyn *et al.*, 2002; Iannello *et al.*, 2002), von denen bislang drei einem bestimmten Gen zugeordnet werden konnten: der Subtyp BBS4 und das gleichnamige Gen BBS4 mit unbekannter Funktion (Mykytyn *et al.*, 2001) sowie der Subtyp BBS6 und das verursachende McKusick-Kaufman-Syndrom-Gen, das ein putatives Chaperon kodiert (Katsanis *et al.*, 2000). Der Subtyp BBS2 wurde kürzlich mit einem bislang unbekanntem Gen assoziiert, welches den Namen BBS2 erhielt (Nishimura *et al.*, 2001).

Die bemerkenswerte Heterogenität und Komplexität des BBS2 führt zu der Vermutung, dass mehr als ein Gen an der Entstehung des Syndroms beteiligt sein könnte (Hamacher *et al.*, 2001). Das humane Plasmolipin-Gen liegt auf Chromosom 16q13 in der Nähe des BBS2-Gens und wird darüber hinaus - in der Ratte - in fast allen Organen expri-

miert, die in BBS2 betroffen sind. Eine wichtige Ausnahme ist die Retina, in der kein Plasmolipin-Protein nachgewiesen werden konnte. Es ist daher wahrscheinlich, dass Plasmolipin nicht das alleinige Krankheitsgen für BBS2 ist, sondern eher ein Modifikator des BBS2-Phänotyps sein könnte, der mit dem BBS2-Protein interagiert und die Ausprägung des Syndroms entsprechend des genomischen Hintergrunds oder ähnlichem beeinflusst.

Alternativ dazu könnte Plasmolipin auch nur in einem Teil der Patienten betroffen sein, zusätzlich zu einem Gen (oder mehreren anderen Genen), welches unter anderem die Ausprägung der retinalen Dystrophie verursacht (Hamacher *et al.*, 2001). In beiden Fällen würde Plasmolipin nicht oder nur indirekt an der entstehenden Blindheit beteiligt sein, für das übrige Krankheitsbild wie zum Beispiel die renale Dysfunktion aber direkt mitverantwortlich sein.

Unterstützt wird diese Theorie einer tri-allelischen Vererbung durch Veröffentlichung von Katsanis und Kollegen, die BBS als Mendel'sche rezessive Erkrankung definieren, in der nicht nur beide Allele eines Gens mutiert sind, sondern zusätzlich mindestens ein weiteres Allel eines zweiten Gens (Katsanis *et al.*, 2001b). Erst Mutationen in allen drei Allelen führen zu einem komplexen und - je nachdem, welches Gen homozygot betroffen ist - leicht variablen Phänotyp. Diese Hypothese scheint sich für die Subtypen BBS2 und BBS4 zu bestätigen (Katsanis *et al.*, 2002; Katsanis *et al.*, 2001a), nicht aber für die Subtypen BBS1 und BBS2 (Mykytyn *et al.*, 2002; Slavotinek *et al.*, 2002).

Über eine direkte Verbindung zwischen Plasmolipin und diesem Krankheitsbild kann zur Zeit nur spekuliert werden. Eine Störung in der Proteinsortierung oder der Rafts-Bildung mit den daraus resultierenden Folgen für Adhäsion, Migration usw. lässt aber an vielfältige Möglichkeiten denken, welche Auswirkungen ein Expressionsänderung von Plasmolipin haben könnten.

4.10 Aussichten

Im Verlauf dieser Arbeit konnte nur ein Teil der sich anbietenden Fragestellungen bearbeitet werden, zumal aufgrund der vorliegenden Ergebnisse neue Aspekte zur molekularbiologischen Charakterisierung in den Vordergrund traten. Insbesondere sind folgende weiterführende Strategien bedenkenswert:

1. Tiermodelle

Die Generierung einer Plasmolipin defizienten Mausmutante könnte mit einem neuen Konstrukt wiederholt versucht und der resultierende Phänotyp analysiert werden. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass der Plasmolipin-Gen-*locus* unzugänglich für eine homologe Rekombination sein könnte. Darüber hinaus steht eine eingehendere Charakterisierung der Plasmolipin überexprimierenden TgN(mPlaSCE) Mausmutanten sowohl für den heterozygoten als auch für den homozygoten Zustand noch weitgehend aus. Hierzu gehören vor allem eingehendere Verhaltenstests zur Bestimmung von Ausfällen oder Entwicklungsverzögerungen, histologische Untersuchungen an Schnitten des Ischiasnervs von Mäusen im Alter zwischen P0 und P14 sowie elektronenmikroskopische Aufnahmen der Myelinstruktur. Interessant erscheint auch das Regenerationsverhalten der Ischiasnerven nach Quetsch-Läsionsexperimenten.

2. Untersuchungen zu möglichen Interaktionspartnern und Signaltransduktionswegen

Die Expressionsprofile der noch nicht untersuchten α -Integrin-Untereinheiten (α_2 , α_5) und weiterer angesprochener Proteine wie zum Beispiel EMP2 konnten für die Plasmolipin reduzierten oder überexprimierenden Schwanzzellen noch nicht ermittelt werden. Eine Bestimmung der Expression dieser Gene über eine quantitative PCR sollte sich aber relativ schnell etablieren lassen. Auch die Verwendung der RNA_i-Induktion über die einfach zu handhabenden pSUPER-Vektoren oder die RNA-Oligomere bietet sich an, um die biologische Funktion weiterer (Myelin-) Gene relativ schnell zu untersuchen. Verschiedene Gene können auch gleichzeitig in ihrer Expression reduziert und die Auswirkungen auf die Zelle studiert werden. Hierbei sind vor allem die Membranproteine MAL und Plasmolipin interessant, um festzustellen, welche Auswirkung das Fehlen beider Membranproteine für die apikale Proteinsortierung und die Bildung von Rafts hat. Darüber hinaus könnte die

Verwendung von DNA-Arrays (Clontech) Aufschluss geben über die differentiellen Expressionsmuster, die nach der Veränderung der Plasmolipin-Expression (pIPla, TgN(mPlaSCE) bzw. pSPla) entstehen. Regulierte Gene können dann wiederum über eine quantitative PCR genauer charakterisiert und für weitere Untersuchungen identifiziert werden.

3. Untersuchungen zum Bardet-Biedl Syndrom

Der direkte Nachweis für den Zusammenhang zwischen Plasmolipin und BBS2 steht noch aus. Laut Angaben von Prof. Sheffield (Howard Hughes Medical Institute, Miami) wurden bislang keine Mutationen im Plasmolipin-Gen von BBS2-Patienten gefunden. Eine Überprüfung der Gen-Kopienzahl oder der Expression ist allerdings noch nicht durchgeführt worden. Plasmolipin könnte aber nach der oben aufgeführten Hypothese aufgrund einer Expressionsänderung einen Effekt bei der Entstehung dieses Syndroms haben, so dass eine Überprüfung der Gen-Kopienzahl oder des Expressionsniveaus in BBS2-Patienten über eine quantitative PCR und Southern Blot Analyse interessant sein könnte. Entsprechende Nervenbiopsien und die medizinische Fachkenntnisse könnten im Rahmen einer Kooperation von Prof. Horsthemke, Essen erhalten werden.

5 Zusammenfassung

Plasmolipin ist ein Tetraspan Molekül mit bislang unbekannter Funktion. Es wird zu Beginn von Myelinisierungsprozessen im ZNS und PNS sowohl während der Nerventwicklung als auch nach Nervenläsionen exprimiert, im adulten Tier aber nur schwach. Um die physiologische Aufgabe des Plasmolipins näher zu charakterisieren, sollten die Auswirkungen einer Expressionsreduktion wie auch einer Überexpression in der Zellkultur und im Tiermodell ermittelt werden.

Durch Induktion von RNA Interferenz über doppelsträngige RNA-Oligomere oder haarnadelförmige RNAs konnte die mRNA- und Proteinmenge von Plasmolipin in Schwanzzellen der Zellkultur reduziert werden. Diese Reduktion hatte eine Veränderung der Zellmorphologie der Schwanzzellen zur Folge, die weniger spindelförmig aussahen und eine geringere Anzahl an Fortsätzen besaßen. Zudem zeigten Plasmolipin supprimierte Schwanzzellen eine reduzierte Adhäsion auf Fibronectin, aber eine erhöhte Adhäsion auf Laminin. Während sich die Apoptose- und Proliferationsraten dabei nicht änderten, wurde eine reduzierte mRNA-Expression der Myelogene P0 und PMP22, aber eine erhöhte Expression von MAL und MBP sowie der Integrin-Untereinheit α_6 beobachtet. Die Überexpression von Plasmolipin in Schwanzzellen bewirkte die Ausbildung von längeren, verzweigten Fortsätzen mit kugelförmigen Endungen. Zudem kam es zu einer Reduktion der Expression von MAL und der α_6 -Untereinheit, die daher im Vergleich zu den Plasmolipin reduzierten Zellen reziprok reguliert wurden.

Diese Ergebnisse führen zu der Vermutung, dass Plasmolipin an der apikalen Proteinsortierung und/oder der Bildung sowie Stabilität von Rafts beteiligt sein könnte. Plasmolipin könnte dabei insbesondere einen Einfluss auf das Repertoire der sich auf der Zelloberfläche befindenden Integrine und somit auch auf die Adhäsionseigenschaften der Zelle haben.

Diese Vermutungen sollten im Tiermodell überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden transgene Mausmutanten erzeugt, die Plasmolipin spezifisch in Schwanzzellen bereits in der Embryonalentwicklung überexprimieren. Die genauere Charakterisierung dieser Tiere

könnte weitere Erkenntnisse zur biologischen Funktion von Plasmolipin liefern und zudem darlegen, inwiefern Plasmolipin an der Bildung von Rafts und an der Proteinsortierung beteiligt ist. Die Generierung einer Plasmolipin defizienten Mausmutante schlug in mehreren Ansätzen fehl. Das Plasmolipin-Gen konnte chromosomal lokalisiert werden. Durch seine Position auf dem humanen Chromosom 16q13 wurde es als mögliches Kandidatengen des Bardet-Biedl Syndroms Typ II identifiziert. Die gewebsspezifische Verteilung der Proteinexpression unterstützt die Beteiligung von Plasmolipin an diesem komplexen autosomal rezessiv erblichen Fehlbildungssyndrom.

6 Literatur

Adlkofer, K., Martini, R., Aguzzi, A., Zielasek, J., Toyka, K. V., and Suter, U. (1995). Hypermyelination and demyelinating peripheral neuropathy in Pmp22- deficient mice. *Nat Genet* 11:274-280.

Alonso, M. A. and Weissman, S. M. (1987). cDNA cloning and sequence of MAL, a hydrophobic protein associated with human T-cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:1997-2001.

Anderson, D. J. (1997). Cellular and molecular biology of neural crest cell lineage determination. *Trends Genet* 13:276-280.

Anzini, P., Neuberg, D. H., Schachner, M., Nelles, E., Willecke, K., Zielasek, J., Toyka, K. V., Suter, U., and Martini, R. (1997). Structural abnormalities and deficient maintenance of peripheral nerve myelin in mice lacking the gap junction protein connexin 32. *J Neurosci* 17:4545-4551.

Arce, V., Pollock, R. A., Philippe, J. M., Pennica, D., Henderson, C. E., and deLapeyriere, O. (1998). Synergistic effects of sch. *J Neurosci* 18:1440-1448.

Bardet, G. (1995). On congenital obesity syndrome with polydactyly and retinitis pigmentosa (a contribution to the study of clinical forms of hypophyseal obesity). 1920. *Obes Res* 3:387-399.

Beales, P. L., Elcioglu, N., Woolf, A. S., Parker, D., and Flintner, F. A. (1999). New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey. *J Med Genet* 36:437-446.

Berditchevski, F. and Odintsova, E. (1999). Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling. *J Cell Biol* 146:477-492.

Berditchevski, F., Gilbert, E., Griffiths, M. R., Fitter, S., Ashman, L., and Jenner, S. J. (2001). Analysis of the CD151-alpha3beta1 integrin and CD151-tetraspanin interactions by mutagenesis. *J Biol Chem* 276:41165-41174.

Berditchevski, F. (2001). Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J Cell Sci* 114:4143-4151.

Bergoffen, J., Scherer, S. S., Wang, S., Scott, M. O., Bone, L. J., Paul, D. L., Chen, K., Lensch, M. W., Chance, P. F., and Fischbeck, K. H. (1993). Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 262:2039-2042.

Biedl, A. (1995). A pair of siblings with adiposo-genital dystrophy. 1922. *Obes Res* 3:404.

Brockes, J. P., Fields, K. L., and Raff, M. C. (1979). Studies on cultured rat Schwann cells. I. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve. *Brain Res* 165:105-118.

Bronstein, J. M. (2000). Function of tetraspan proteins in the myelin sheath. *Curr Opin Neurobiol* 10:552-557.

Brown, D. A. and London, E. Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J Membr Biol* 164, 103-114.

Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296:550-553.

Bunge, M. B., Bunge, R. P., Kleitman, N., and Dean, A. C. (1989). Role of peripheral nerve extracellular matrix in Schwann cell function and in neurite regeneration. *Dev Neurosci* 11:348-360.

Chance, P. F., Lensch, M. W., Lipe, H., Brown, R. H., Sr., Brown, R. H., Jr., and Bird, T. D. (1994). Hereditary neuralgic amyotrophy and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: two distinct genetic disorders 14. *Neurology* 44:2253-2257.

Claas, C., Stipp, C. S., and Hemler, M. E. (2001). Evaluation of prototype transmembrane 4 superfamily protein complexes and their relation to lipid rafts. *J Biol Chem* 276:7974-7984.

Cochary, E. F., Bizzozero, O. A., Sapirstein, V. S., Nolan, C. E., and Fischer, I (1990). Presence of the plasma membrane proteolipid (plasmolipin) in myelin. *J Neurochem* 55: 602-9

Colman, D. R., Kreibich, G., Frey, A. B., and Sabatini, D. D. (1982). Synthesis and incorporation of myelin polypeptides into CNS myelin. *J Cell Biol* 95:598-608.

D'Urso, D., Brophy, P. J., Staugaitis, S. M., Gillespie, C. S., Frey, A. B., Stempak, J. G., and Colman, D. R. (1990). Protein zero of peripheral nerve myelin: biosynthesis, membrane insertion, and evidence for homotypic interaction. *Neuron* 4:449-460.

Diaz, R.S., Monreal, J., Lucas, M. (1990). Calcium movements mediated by proteolipid protein and nucleotides in liposomes prepared with the endogenous lipids from brain white matter. *J Neurochem* 55:1304-9.

Dickersin, G. R. (1987). The electron microscopic spectrum of nerve sheath tumors. *Ultrastruct Pathol* 11:103-146.

Dong, Z., Brennan, A., Liu, N., Yarden, Y., Lefkowitz, G., Mirsky, R., and Jessen, K. R. (1995). Neu differentiation factor is a neuron-glia signal and regulates survival, proliferation, and maturation of rat Schwann cell precursors. *Neuron* 15:585-596.

Doyle, J. P., Stempak, J. G., Cowin, P., Colman, D. R., and D'Urso, D. (1995). Protein zero, a nervous system adhesion molecule, triggers epithelial reversion in host carcinoma cells. *J Cell Biol* 131:465-482.

Dudley, N. R., Labbe, J. C., and Goldstein, B. (2002). Using RNA interference to identify genes required for RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4191-4196.

Einheber, S., Milner, T. A., Giancotti, F., and Salzer, J. L. (1993). Axonal regulation of Schwann cell integrin expression suggests a role for alpha 6 beta 4 in myelination. *J Cell Biol* 123:1223-1236.

Elbashir, S. M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15:188-200.

Elbashir, S. M., Harborth, J., Weber, K., and Tuschl, T. (2002). Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26:199-213.

Erlandson, R. A. and Woodruff, J. M. (1982). Peripheral nerve sheath tumors: an electron microscopic study of 43 cases. *Cancer* 49:273-287.

Escola, J. M., Kleijmeer, M. J., Stoorvogel, W., Griffith, J. M., Yoshie, O., and Geuze, H. J. (1998). Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B- lymphocytes. *J Biol Chem* 273:20121-20127.

Fawcett, J. W. and Keynes, R. J. (1990). Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci* 13:43-60.

Feltri, M. L., Scherer, S. S., Wrabetz, L., Kamholz, J., and Shy, M. E. (1992). Mitogen-expanded Schwann cells retain the capacity to myelinate regenerating axons after transplantation into rat sciatic nerve. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8827-8831.

Filbin, M. T., Walsh, F. S., Trapp, B. D., Pizzey, J. A., and Tennekoon, G. I. (1990). Role of myelin P0 protein as a homophilic adhesion molecule. *Nature* 344:871-872.

Fischer, I. and Sapirstein, V. S. (1986). Characterization and biosynthesis of the plasma membrane proteolipid protein in neural tissue. *J Neurochem* 47:232-238.

Fischer, I., Cochary, E. F., Konola, J. T., and Romano-Clark, G. (1991). Expression of plasmolipin in oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 28:81-89.

Fischer, I. and Sapirstein, V. S. (1994). Molecular cloning of plasmolipin. Characterization of a novel proteolipid restricted to brain and kidney. *J Biol Chem* 269:24912-24919.

Fischer, I., Durrie, R., and Sapirstein, V. S. (1994). Plasmolipin: the other myelin proteolipid. A review of studies on its structure, expression, and function. *Neurochem Res* 19:959-966.

Folch, J. and Lees, M.B. (1951). Proteolipids, a new type of tissue lipoproteins. *J Biol Chem* 91:807-817.

Frank M. (2000) MAL, a proteolipid in glycosphingolipid enriched domains: functional implications in myelin and beyond. *Prog Neurobiol* 60, 531-544.

Garbern, J. Y., Cambi, F., Tang, X. M., Sima, A. A., Vallat, J. M., Bosch, E. P., Lewis, R., Shy, M., Sohi, J., Kraft, G., Chen, K. L., Joshi, I., Leonard, D. G., Johnson, W., Raskind, W., Dlouhy, S. R., Pratt, V., Hodes, M. E., Bird, T., and Kamholz, J. (1997). Proteolipid protein is necessary in peripheral as well as central myelin. *Neuron* 19:205-218.

Gillen, C., Gleichmann, M., Greiner-Petter, R., Zoidl, G., Kupfer, S., Bosse, F., Auer, J., and Muller, H. W. (1996). Full-length cloning, expression and cellular localization of rat plasmolipin mRNA, a proteolipid of PNS and CNS. *Eur J Neurosci* 8:405-414.

Giovannini, M., Robanus-Maandag, E., Niwa-Kawakita, M., van, d., V, Woodruff, J. M., Goutebroze, L., Merel, P., Berns, A., and Thomas, G. (1999). Schwann cell hyperplasia and tumors in transgenic mice expressing a naturally occurring mutant NF2 protein. *Genes Dev* 13:978-986.

Green, J. S., Parfrey, P. S., Harnett, J. D., Farid, N. R., Cramer, B. C., Johnson, G., Heath, O., McManamon, P. J., O'Leary, E., and Pryse-Phillips, W. (1989). The cardinal manifestations of Bardet-Biedl syndrome, a form of Laurence-Moon-Biedl syndrome. *N Engl J Med* 321:1002-1009.

Griffiths, I. R., Mitchell, L. S., McPhilemy, K., Morrison, S., Kyriakides, E., and Barrie, J. A. (1989). Expression of myelin protein genes in Schwann cells. *J Neurocytol* 18:345-352.

Gudz, T. I., Schneider, T. E., Haas, T. A., and Macklin, W. B. (2002). Myelin proteolipid protein forms a complex with integrins and may participate in integrin receptor signaling in oligodendrocytes. *J Neurosci* 22:7398-7407.

Hamacher, M., Pippirs, U., Kohler, A., Muller, H. W., and Bosse, F. (2001). Plasmolipin: genomic structure, chromosomal localization, protein expression pattern, and putative association with Bardet-Biedl syndrome. *Mamm Genome* 12:933-937.

Hannon, G. J. (2002). RNA interference. *Nature* 418:244-251.

Harborth, J., Elbashir, S. M., Bechert, K., Tuschl, T., and Weber, K. (2001). Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci* 114:4557-4565.

Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P., and Simons, K. (1998). Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* 141:929-942.

Harnett, J. D., Green, J. S., Cramer, B. C., Johnson, G., Chafe, L., McManamon, P., Farid, N. R., Pryse-Phillips, W., and Parfrey, P. S. (1988). The spectrum of renal disease in Laurence-Moon-Biedl syndrome. *N Engl J Med* 319:615-618.

Hasse, B., Bosse, F., and Muller, H. W. (2002). Proteins of peripheral myelin are associated with glycosphingolipid/cholesterol-enriched membranes. *J Neurosci Res* 69:227-232.

Hemler, M. E. (1998). Integrin associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 10:578-585.

Henderson, C. E., Phillips, H. S., Pollock, R. A., Davies, A. M., Lemeulle, C., Armanini, M., Simmons, L., Moffet, B., Vandlen, R. A., Simpson, L. C., and . (1994). GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science* 266:1062-1064.

Henion, P. D. and Weston, J. A. (1997). Timing and pattern of cell fate restrictions in the neural crest lineage. *Development* 124:4351-4359.

Hsiao, L. L., Peltonen, J., Jaakkola, S., Galnick, H., and Uitto, J. (1991). Plasticity of integrin expression by nerve-derived connective tissue cells. Human Schwann cells, perineurial cells, and fibroblasts express markedly different patterns of beta 1 integrins during nerve development, neoplasia, and in vitro. *J Clin Invest* 87:811-820.

Hudson, L. D., Puckett, C., Berndt, J., Chan, J., and Gencic, S. (1989). Mutation of the proteolipid protein gene PLP in a human X chromosome-linked myelin disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:8128-8131.

Iannello, S., Bosco, P., Cavaleri, A., Camuto, M., Milazzo, P., and Belfiore, F. (2002). A review of the literature of Bardet-Biedl disease and report of three cases associated with metabolic syndrome and diagnosed after the age of fifty. *Obes Rev* 3:123-135.

Jaakkola, S., Savunen, O., Halme, T., Uitto, J., and Peltonen, J. (1993). Basement membranes during development of human nerve: Schwann cells and perineurial cells display marked changes in their expression profiles for laminin subunits and beta 1 and beta 4 integrins. *J Neurocytol* 22:215-230.

Jacque, J. M., Triques, K., and Stevenson, M. (2002). Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 418:435-438.

Jessen, K. R. and Mirsky, R. (1992). Schwann cells: early lineage, regulation of proliferation and control of myelin formation. *Curr Opin Neurobiol* 2:575-581.

Katsanis, N., Beales, P. L., Woods, M. O., Lewis, R. A., Green, J. S., Parfrey, P. S., Ansley, S. J., Davidson, W. S., and Lupski, J. R. (2000). Mutations in MKKS cause obesity, retinal dystrophy and renal malformations associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* 26:67-70.

Katsanis, N., Lupski, J. R., and Beales, P. L. (2001a). Exploring the molecular basis of Bardet-Biedl syndrome. *Hum Mol Genet* 10:2293-2299.

Katsanis, N., Ansley, S. J., Badano, J. L., Eichers, E. R., Lewis, R. A., Hoskins, B. E., Scambler, P. J., Davidson, W. S., Beales, P. L., and Lupski, J. R. (2001b). Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder. *Science* 293:2256-2259.

Katsanis, N., Eichers, E. R., Ansley, S. J., Lewis, R. A., Kayserili, H., Hoskins, B. E., Scambler, P. J., Beales, P. L., and Lupski, J. R. (2002). BBS4 is a minor contributor to Bardet-Biedl syndrome and may also participate in triallelic inheritance. *Am J Hum Genet* 71:22-29.

Kim, T., Fiedler, K., Madison, D. L., Krueger, W. H., and Pfeiffer, S. E. (1995). Cloning and characterization of MVP17: a developmentally regulated myelin protein in oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 42:413-422.

Kotzbauer, P. T., Lampe, P. A., Heuckeroth, R. O., Golden, J. P., Creedon, D. J., Johnson, E. M., Jr., and Milbrandt, J. (1996). Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Nature* 384:467-470.

Kury, P., Bosse, F., and Muller, H. W. (2001). Transcription factors in nerve regeneration. *Prog Brain Res* 132:569-585.

Kwitek-Black, A. E., Carmi, R., Duyk, G. M., Buetow, K. H., Elbedour, K., Parvari, R., Yandava, C. N., Stone, E. M., and Sheffield, V. C. (1993). Linkage of Bardet-Biedl syndrome to chromosome 16q and evidence for non- allelic genetic heterogeneity. *Nat Genet* 5:392-396.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.

Lefcort, F., Venstrom, K., McDonald, J. A., and Reichardt, L. F. (1992). Regulation of expression of fibronectin and its receptor, alpha 5 beta 1, during development and regeneration of peripheral nerve. *Development* 116:767-782.

Leitinger, B. and Hogg, N. (1999). Integrin I domains and their function. *Biochem Soc Trans* 27:826-832.

Lobsiger, C. S., Taylor, V., and Suter, U. (2002). The early life of a Schwann cell. *Biol Chem* 383 :245-253.

MacLennan, D. H., Reithmeier, R. A., Shoshan, V., Campbell, K. P., LeBel, D., Herrmann, T. R., and Shamoo, A. E. (1980). Ion pathways in proteins of the sarcoplasmic reticulum. *Ann N Y Acad Sci* 358:138-148.

Magyar, J. P., Ebensperger, C., Schaeren-Wiemers, N., and Suter, U. (1997). Myelin and lymphocyte protein (MAL/MVP17/VIP17) and plasmolipin are members of an extended gene family. *Gene* 189:269-275.

Mandemakers, W., Zwart, R., Jaegle, M., Walbeehm, E., Visser, P., Grosveld, F., and Meijer, D. (2000). A distal Schwann cell-specific enhancer mediates axonal regulation of the Oct-6 transcription factor during peripheral nerve development and regeneration. *EMBO J* 19:2992-3003.

Martin-Belmonte, F., Arvan, P., and Alonso, M. A. (2001). MAL mediates apical transport of secretory proteins in polarized epithelial Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 276:49337-49342.

Martini, R., Mohajeri, M. H., Kasper, S., Giese, K. P., and Schachner, M. (1995a). Mice doubly deficient in the genes for P0 and myelin basic protein show that both proteins contribute to the formation of the major dense line in peripheral nerve myelin. *J Neurosci* 15:4488-4495.

Martini, R., Zielasek, J., Toyka, K. V., Giese, K. P., and Schachner, M. (1995b). Protein zero (P0)-deficient mice show myelin degeneration in peripheral nerves characteristic of inherited human neuropathies. *Nat Genet* 11:281-286.

Martini, R. and Schachner, M. (1997). Molecular bases of myelin formation as revealed by investigations on mice deficient in glial cell surface molecules. *Glia* 19:298-310.

Matsunami, N., Smith, B., Ballard, L., Lensch, M. W., Robertson, M., Albertsen, H., Hanemann, C. O., Muller, H. W., Bird, T. D., White, R., and . (1992). Peripheral myelin protein-22 gene maps in the duplication in chromosome 17p11.2 associated with Charcot-Marie-Tooth 1A. *Nat Genet* 1:176-179.

McCaffrey, A. P., Meuse, L., Pham, T. T., Conklin, D. S., Hannon, G. J., and Kay, M. A. (2002). RNA interference in adult mice. *Nature* 418:38-39.

Meredith, J. E., Jr., Winitz, S., Lewis, J. M., Hess, S., Ren, X. D., Renshaw, M. W., and Schwartz, M. A. (1996). The regulation of growth and intracellular signaling by integrins. *Endocr Rev* 17:207-220.

Meyer, D. and Birchmeier, C. (1994). Distinct isoforms of neuregulin are expressed in mesenchymal and neuronal cells during mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1064-1068.

Milbrandt, J., de Sauvage, F. J., Fahrner, T. J., Baloh, R. H., Leitner, M. L., Tansey, M. G., Lampe, P. A., Heuckeroth, R. O., Kotzbauer, P. T., Simburger, K. S., Golden, J. P., Davies, J. A., Vejsada, R., Kato, A. C., Hynes, M., Sherman, D., Nishimura, M., Wang, L. C., Vandlen, R., Moffat, B., Klein, R. D., Poulsen, K., Gray, C., Garces, A., Johnson, E. M., Jr., and . (1998). Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin. *Neuron* 20:245-253.

Mirsky, R. and Jessen, K. R. (1996). Schwann cell development, differentiation and myelination. *Curr Opin Neurobiol* 6:89-96.

Mirsky, R. and Jessen, K. R. (1999). The neurobiology of Schwann cells. *Brain Pathol* 9:293-311.

Müller, H. W. (2000). Tetraspan myelin protein PMP22 and demyelinating peripheral neuropathies: new facts and hypotheses. *Glia* 29:182-185.

Mykytyn, K., Braun, T., Carmi, R., Haider, N. B., Searby, C. C., Shastri, M., Beck, G., Wright, A. F., Iannaccone, A., Elbedour, K., Riise, R., Baldi, A., Raas-Rothschild, A., Gorman, S. W., Duhl, D. M., Jacobson, S. G., Casavant, T., Stone, E. M., and Sheffield, V. C. (2001). Identification of the gene that, when mutated, causes the human obesity syndrome BBS4. *Nat Genet* 28:188-191.

Mykytyn, K., Nishimura, D. Y., Searby, C. C., Shastri, M., Yen, H. J., Beck, J. S., Braun, T., Streb, L. M., Cornier, A. S., Cox, G. F., Fulton, A. B., Carmi, R., Luleci, G., Chandrasekharappa, S. C., Collins, F. S., Jacobson, S. G., Heckenlively, J. R., Weleber, R. G., Stone, E. M., and Sheffield, V. C. (2002). Identification of the gene (BBS1) most commonly involved in Bardet- Biedl syndrome, a complex human obesity syndrome. *Nat Genet* 31:435-438.

Nave, K. A. (1994). Neurological mouse mutants and the genes of myelin. *J Neurosci Res* 38:607-612.

Nishimura, D. Y., Searby, C. C., Carmi, R., Elbedour, K., Van Maldergem, L., Fulton, A. B., Lam, B. L., Powell, B. R., Swiderski, R. E., Bugge, K. E., Haider, N. B., Kwitek-Black, A. E., Ying, L., Duhl, D. M., Gorman, S. W., Heon, E., Iannaccone, A., Bonneau, D., Biesecker, L. G., Jacobson, S. G., Stone, E. M., and Sheffield, V. C. (2001). Positional cloning of a novel gene on chromosome 16q causing Bardet- Biedl syndrome (BBS2). *Hum Mol Genet* 10:865-874.

Pelton, P. D., Sherman, L. S., Rizvi, T. A., Marchionni, M. A., Wood, P., Friedman, R. A., and Ratner, N. (1998). Ruffling membrane, stress fiber, cell spreading and proliferation abnormalities in human Schwannoma cells. *Oncogene* 17:2195-2209.

Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J., and Smith, J. W. (2000). Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* 275:21785-21788.

Porter, J. C. and Hogg, N. (1998). Integrins take partners: cross-talk between integrins and other membrane receptors. *Trends Cell Biol* 8:390-396.

Puertollano, R., Li, S., Lisanti, M. P., and Alonso, M. A. (1997). Recombinant expression of the MAL proteolipid, a component of glycolipid-enriched membrane microdomains, induces the formation of vesicular structures in insect cells. *J Biol Chem* 272:18311-18315.

Rancano, C., Rubio, T., Correas, I., and Alonso, M. A. (1994). Genomic structure and subcellular localization of MAL, a human T-cell-specific proteolipid protein. *J Biol Chem* 269:8159-8164.

Riethmacher, D., Sonnenberg-Riethmacher, E., Brinkmann, V., Yamaai, T., Lewin, G. R., and Birchmeier, C. (1997). Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature* 389:725-730.

Roche, P. H., Figarella-Branger, D., Daniel, L., Bianco, N., Pellet, W., and Pellissier, J. F. (1997). Expression of cell adhesion molecules in normal nerves, chronic axonal neuropathies and Schwann cell tumors. *J Neurol Sci* 151:127-133.

Rosenbaum, C., Kluwe, L., Mautner, V. F., Friedrich, R. E., Muller, H. W., and Hanemann, C. O. (1998). Isolation and characterization of Schwann cells from neurofibromatosis type 2 patients. *Neurobiol Dis* 5:55-64.

Rouleau, G. A., Merel, P., Lutchman, M., Sanson, M., Zucman, J., Marineau, C., Hoang-Xuan, K., Demczuk, S., Desmaze, C., Plougastel, B., and . (1993). Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. *Nature* 363:515-521.

Salzer, J. L. and Bunge, R. P. (1980). Studies of Schwann cell proliferation. I. An analysis in tissue culture of proliferation during development, Wallerian degeneration, and direct injury. *J Cell Biol* 84:739-752.

Sapirstein, V. S. and Rounds, T. C. (1983). Circular dichroism and fluorescence studies on a cation channel forming plasma membrane proteolipid. *Biochemistry* 22:3330-3335.

Sapirstein, V. S., Nolan, C., Stern, R., Ciocchi, M., and Masur, S. K. (1988). Identification of the plasma membrane proteolipid protein as a constituent of brain coated vesicles and synaptic plasma membrane. *J Neurochem* 51:925-933.

Sapirstein, V. S., Nolan, C. E., Fischer, I., Cochary, E., Blau, S., and Flynn, C. J. (1991). The phylogenic expression of plasmolipin in the vertebrate nervous system. *Neurochem Res* 16:123-128.

Sapirstein, V. S., Nolan, C. E., Stadler, I. I., and Fischer, I. (1992a). Expression of plasmolipin in the developing rat brain. *J Neurosci Res* 31:96-102.

Sapirstein, V. S., Nolan, C. E., Stern, R., Gray-Board, G., and Beard, M. E. (1992b). Identification of plasmolipin as a major constituent of white matter clathrin-coated vesicles. *J Neurochem* 58:1372-1378.

Sapirstein, V. S., Durrie, R., Cherksey, B., Beard, M. E., Flynn, C. J., and Fischer, I. (1992c). Isolation and characterization of periaxolemmal and axolemmal enriched membrane fractions from the rat central nervous system. *J Neurosci Res* 32:593-604.

Schaeren-Wiemers, N., Valenzuela, D. M., Frank, M., and Schwab, M. E. (1995). Characterization of a rat gene, rMAL, encoding a protein with four hydrophobic domains in central and peripheral myelin. *J Neurosci* 15:5753-5764.

Scherer, S. S. (1997). The biology and pathobiology of Schwann cells. *Curr Opin Neurol* 10:386-397.

Serru, V., Le Naour, F., Billard, M., Azorsa, D. O., Lanza, F., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (1999). Selective tetraspan-integrin complexes (CD81/alpha4beta1, CD151/alpha3beta1, CD151/alpha6beta1) under conditions disrupting tetraspan interactions. *Biochem J* 340 (Pt 1):103-111.

Shah, N. M., Marchionni, M. A., Isaacs, I., Stroobant, P., and Anderson, D. J. (1994). Glial growth factor restricts mammalian neural crest stem cells to a glial fate. *Cell* 77:349-360.

Shah, N. M., Groves, A. K., and Anderson, D. J. (1996). Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members. *Cell* 85:331-343.

Shamoo, A. E. and Ryan, T. E. (1975). Isolation of ionophores from ion-transport systems. *Ann N Y Acad Sci* 264:83-97.

Shaw, R. J., Paez, J. G., Curto, M., Yaktine, A., Pruitt, W. M., Saotome, I., O'Bryan, J. P., Gupta, V., Ratner, N., Der, C. J., Jacks, T., and McClatchey, A. I. (2001). The Nf2 tumor suppressor, merlin, functions in Rac-dependent signaling. *Dev Cell* 1:63-72.

Shea, T. B., Fischer, I., and Sapirstein, V. (1986). Expression of a plasma membrane proteolipid during differentiation of neuronal and glial cells in primary culture. *J Neurochem* 47:697-706.

Simons, K. and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:31-39.

Simons, K. and Ehehalt, R. (2002). Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest* 110:597-603.

Simons, M., Kramer, E. M., Thiele, C., Stoffel, W., and Trotter, J. (2000). Assembly of myelin by association of proteolipid protein with cholest. *J Cell Biol* 151:143-154.

Slavotinek, A. M., Searby, C., Al Gazali, L., Hennekam, R. C., Schrandt-Stumpel, C., Orcana-Losa, M., Pardo-Reoyo, S., Cantani, A., Kumar, D., Capellini, Q., Neri, G., Zackai, E., and Biesecker, L. G. (2002). Mutation analysis of the MKKS gene in McKusick-Kaufman syndrome and selected Bardet-Biedl syndrome patients. *Hum Genet* 110:561-567.

Suter, U. and Snipes, G. J. (1995). Peripheral myelin protein 22: facts and hypotheses. *J Neurosci Res* 40:145-151.

Svoboda, P., Stein, P., Hayashi, H., and Schultz, R. M. (2000). Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development* 127:4147-4156.

Takeuchi, K., Tsuji, T., Hakomori, S., and Irimura, T. (1994). Intercellular adhesion induced by anti-alpha 3 integrin (VLA-3) antibodies. *Exp Cell Res* 211:133-141.

Timmerman, V., Nelis, E., Van Hul, W., Nieuwenhuijsen, B. W., Chen, K. L., Wang, S., Ben Othman, K., Cullen, B., Leach, R. J., Hanemann, C. O., and . (1992). The peripheral myelin protein gene PMP-22 is contained within the Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication. *Nat Genet* 1:171-175.

Ting-Beall, H. P., Lees, M. B., and Robertson, J. D. (1979). Interactions of Folch-Lees proteolipid apoprotein with planar lipid bilayers. *J Membr Biol* 51:33-46.

Tosteson, M. T. and Sapirstein, V. S. (1981). Protein interactions with lipid bilayers: the channels of kidney plasma membrane proteolipids. *J Membr Biol* 63:77-84.

Trapp, B. D., Moench, T., Pulley, M., Barbosa, E., Tennekoon, G., and Griffin, J. (1987). Spatial segregation of mRNA encoding myelin-specific proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:7773-7777.

Trofatter, J. A., MacCollin, M. M., Rutter, J. L., Murrell, J. R., Duyao, M. P., Parry, D. M., Eldridge, R., Kley, N., Menon, A. G., Pulaski, K., and . (1993). A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell* 75:826.

Wadehra, M., Iyer, R., Goodglick, L., and Braun, J. (2002). The Tetraspan Protein Epithelial Membrane Protein-2 Interacts with beta 1 Integrins and Regulates Adhesion. *J Biol Chem* 277:41094-41100.

Weiner, J. A., Fukushima, N., Contos, J. J., Scherer, S. S., and Chun, J. (2001). Regulation of Schwann cell morphology and adhesion by receptor-mediated lysophosphatidic acid signaling. *J Neurosci* 21:7069-7078.

Wrabetz, L., Feltri, M. L., Quattrini, A., Imperiale, D., Previtali, S., D'Antonio, M., Martini, R., Yin, X., Trapp, B. D., Zhou, L., Chiu, S. Y., and Messing, A. (2000). P(0) glycoprotein overexpression causes congenital hypomyelination of peripheral nerves. *J Cell Biol* 148:1021-1034.

Yanagida, H., Tanaka, J., and Maruo, S. (1999). Immunocytochemical localization of a cell adhesion molecule, integrin alpha5beta1, in nerve growth cones. *J Orthop Sci* 4:353-360.

Zacchetti, D., Peranen, J., Murata, M., Fiedler, K., and Simons, K. (1995). VIP17/MAL, a proteolipid in apical transport vesicles. *FEBS Lett* 377:465-469.

7 Anhang

Abkürzungen

AS	Aminosäure
BBS	Bardet-Biedl-Syndrom
bp	Basenpaar
cDNA	komplementäre DNA
cpm	counts per minute, Strahlung pro Minute
dATP	desoxy-Adenin-Triphosphat
dCTP	desoxy-Cytosin-Triphosphat
ddH ₂ O ^{DEPC}	doppelt-destilliertes Wasser, DEPC behandelt
DEPC	Diethylen-Pyrocyanat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige RNA
E(Zahl X)	embryonaler Tag X
ES	embryonale Stammzelle
FCS	Fötale Kälberserum
h	Stunde
kDa	Kilo-Dalton
kb	Kilo-Basenpaare
LB-Medium	Lauria-Bertani Medium
MAL	Myelin und Lymphozyten assoziiertes Protein
MBP	Myelin basic protein
min	Minute(n)
miRNA	micro RNA
mRNA	Boten-RNA
MTS	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2 - (4-sulfophenyl)-2H-Tetrazolium (Promega)
NC	Nitrocellulose-Membran
nt	Nukleotid
P(Zahl X)	postnataler Tag X
PBS	phosphat buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCI	Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1)
PLP22	Proteolipid Protein 22 kDa
PMP22	Peripheres Myelin Protein 22 kDa
PM-PLP	Plasmamembran Proteolipid Protein
PMS	Phenazinmethosulfat, Elektronenkoppler (Promega)
PNS	peripheres Nervensystem
RdRP	RNA-abhängige RNA-Polymerase
rGAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase der Ratte
rODC	Ornithin-Decarboxylase der Ratte
rSC	Schwanzzelle der Ratte
RT	Reverse Transkription
RNA	Ribonukleinsäure
RNA _i	RNA Interferenz
SAP	Shrimp alkaline phosphatase
SC	Schwanzzelle

SCE	Schwann Cell Enhancer
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	short interfering RNA
TM	Transmembrandomäne
Upm	Umdrehungen pro Minute
ZNS	zentrales Nervensystem

Liste der verwendeten Q-PCR Primer

Plasmolipin	QrPla3fwd QrPla3rev QrPla6fwd QrPla6rev	gtcgtaggctcgcgatcg tgggtgctcactttcgcaggg atttgcgtgaccccataccac aaacataaccagcgcgtaggc	PMP22 ITGA6 GAPDH ODC	QrPMPfwd QrPMPrev QrA6fwd QrA6rev QrGfwd QrGrev QrODCfwd QrODCrev	gcgggaaccactgaccctgaa tcatttaaacatgtggccca agaattgacctcccgagaa gcatacccgctagggtgacc gaacgggaagctcactggc catgtcagatccacaacgg ggttccagaggccaacatc gttccacattgaccgtgac
MAL	QrMALfwd QrMALrev	gcaaatggcagatttgggtac caatggaccgacagggaaac			
MBP	QrMBPfwd QrMBPrev	tgccatctccaggggttc gcatcctccagctagggt			
P0	QrP0fwd QrP0rev	accttcaaggagcgcctac			

Liste der verwendeten Primer

Plapi-M1 Plapi-M2 Plapi-M3 Plapi-M4 Plapi-M5 Plapi-M6 Plapi-M7 Plapi-M8 Plapi-M9 Plapi-M10 Plapi-M11 A3.1-Mi11 A3.1-Mi12 A3.1-Mi13 A3.26-Mi14 A3.22-Mi15 A3.17-Mi16 A3.17-Mi17 A3.1-Mi17b A3.22-Mi18 A3.17-Mi19 A3.1-Mi20 A3.1-Mi21 A3.1-Mi22 A3.1-Mi23 A3.1-Mi24 A3.1-Mi25 A3.1-Mi26 A3.1-Mi27 A3.1-Mi28 A3.1-Mi29 A3.1-Mi30 A3.1-Mi31 A3.1-Mi32 A3.1-Mi33 A3.1-Mi33b A3.1-Mi34 A3.1-Mi35 A3.1-Mi36 A3.1-Mi37 A3.1-Mi38 A3.1-Mi39 A3.1-Mi40 A3.1-Mi41 A3.1-Mi42 M45 M45b A3.1-Mi46 A3E26-Mi47 A3E26-Mi48 A3E26-Mi49 A3E26-Mi50 A3E26-Mi51 A3E26-Mi52 A3E26-Mi53 A3E26-Mi54	tcgccattaacctcctgacaactcac tgctggctcgtgctcactttc accaacggccaggccaccatatac taagaccagccgctggcttagg caataaagagtcgccattaacctc acaaggtgcgcgaagcccagac tcgcatcgcagacacagat agccagaggaaagacagctac gaggcagccgagcgtgggt ggacactgaagtctctcg tgacaacgggaattcaattctg atcagaattttgagctcggag aagcaccagaagactggatg attcacagacgagaggactc gactttcttaacctcaagg caatgcgtgggtcttccatc agtgttgcgagtcggaatgtg ttgcttggcttggggacaaaag ctcagggtgaaggagaaaagtg tggctctgataaccacaagg aggatataagctaaagctccg tagtggagagatggctcagtg ctggactgaaccttgaacctg accagaacaagcaaaagactgg agatggctcagtggttaagac gaagcttgggttagagtag aagcttgggtggtagagtag tcatctggaactctaccagc gaaccagaaggactgttccac tacacacttgcagtgtaaggac tctctgtatctgcactccc cctccaacctccatagagc cagaggaaatgaagacgctctgg aattgtctccaacctccatagagc caagggtataaggttgaagtatgg gtccctggcctagatctcc ttgactggcctgtgtgctctc tgtctctcgggataaattccggtg gttaaactgcaggaaaagcaaggagg ctgctctccactacactatcggg gatccaagtctttcacagcc acagcctgtgaatctcttagc ccgagccctgttctgtcagtg aaaccagagtcactcaagccagc ggcagctcctggaatgcaattctgtag ccacagcgcgaagacgtcgac caagctgcagaagcgcgagcacc ccgatgacaatgagctcgtacc gctgtgactgaatctaacagg ctgttctcactgcaaatgactgc agcagatctcgtcaatcagatg caaggaaagcctctgagaagtg ctgtaatccagactgactctcatgc agacaaagtctcatgtaacct ttcactgaggagcagttaaagggc tctggagctaccacacctggag	A3E26-Mi55 A3E26-M55b PCR-Mi56 PCR-Mi57 PCR-Mi58 PCR-Mi59 A3.1-Mi60 A3.1-Mi61 A3.22-Mi62 A3.1-Mi62b A3E26-Mi63 A3E26-Mi64 A3E6-Mi26 <i>Xba</i> I mPlapi-Re1 mPlapi-Re2 Plapi-P1 Plapi-P2 Plapi-P3 Plapi-P4 Plapi-P5 Plapi-P6 Plapi-P7 Plapi-P8 Plapi-P9 A3.1-Pi11 A3.1-Pi12 A3.1-Pi13 A3.1-Pi14 A3.17-Pi15 A3.1-Pi16 A3.1-Pi16b A3.17-Pi17 A3.1-Pi18 A3.1-Pi19 A3.22-Pi20 A3.1-Pi21 A3.1-Pi22 A3.1-Pi23 A3.1-Pi24 A3.1-Pi25 A3.1-Pi26 A3.1-Pi27 A3.1-Pi28 A3.1-P28b A3.1-Pi29 A3.1-Pi30 A3.1-Pi31 A3.1-Pi32 A3.1-Pi33 A3.1-Pi34 P35 A3E4-Pi36 A3E4-Pi37 P38 A3E26-Pi39 A3E26-Pi40	ccgtccctaacgtccgtaacctaac aacacggagctagctaggaaac ctcctaaaacaagctggctc gtctctgtcttatcaagtaagtc gaattgtcttaggtcaaaactg ccagcatcaatgcacacagactc agtgatgtccaggacagccagg ggttctagaacctctctggc gaatgtctagtgatgacagcc ctgagttcgagccagctggctc ggagatcactggatagccg aagatcaaacctgtagctagc tatctagattaggagtagcccc agaagcatgtgtatcacatc caggacacagatttctgtccc tctctatccagagcaaacaggcgaac gggttctcacatctctatccag atggcggagtccctcgtgaaaag aagttgtataggtgcctggc ctatgctgtgacctaaagccagg gtggcctcggccactctg atctgtgtcgcgactgga gtagctgtctctctggct accagcctcggctgcctc caagtaatgtagagaacctg gtttgttagatcctgctctg agatgaagatgaactctccg cagcactaaatgcaactaacagac aaggaggacagaaggaagc caccatgcctgactggaatcgc aagatggactagtaagctggg attctgggtctgctgctcag cctggaaactcaactagctagg gctttgtagagattccctagg actgagccacctctgcagac gattctggtctatgtcagac ctacattactgcttattgccc ttgaggctagcctaatctac cacaattccacacacatacag tcgtgttagtctgtgaaatgc aactcagcctcaagtcagagg ctttgtgagcttatgctctc ggagccag(ac)tctattctacgagg ggagacactccgcaatcag gtcagcctctgttctactggc atccagcctcaggaggcag gtgagactgggcaagtggtggc gataatgctcaggccaactc ccagctatgactgaagctg tattactgaaccaaggacaagg tgttagggatccctgtc agtctcgtggtcacttaaggaag ggccttcttagtgaacag cgagcgtctgagctcgcgatg caagctgtccctctctctac ttggagattcaaaagcagc
--	---	--	--

A3E26-Pi41	tagaggaatagggtgaccgcag	NeoM	aacattcaggcctgggtggag
A3E26-Pi42	tctgatcttcttggtgagccttc	NeoP	cagcgcatcgccttctatcgcc
PCR-Pi43	gcattttaatgtcttctctg	Neo1s	gaggctattcgctatgactg
A3E26-Pi44	agttccagggttcatgagac	Neo1a	cagtcatacgccaatagcctc
PCR-Pi45	cacctgagagtcagcttgggc	Neo2a	gcatagaaaggcagtcgctg
PCR-Pi46	ttctgtggcaacctactctcaac	Neo3s	agctcgactgtgctactgagc
A3E26-Pi47	tcctcaggtcacaggcttgac	Neo3a	agactagtgagcgtgctactcc
A3E26-Pi48	ccaggcatgatgccatacacc	Neo4a	cttctatcgcttcttgacgag
A3.22-Pi50	ctacatcaagaccagcaggac	Neo5a	ttctgattcatcgactgtgg
A3.22-Pi51	caggctgagctggatcaggg	Neo6a	ccgaactgttcgaccagctc
A3E26-Pi52	ttgcagaatgttagtgatgg	Neo7a	gaggaaatgcatcgacttg
A3E26-Pi53	gagatcttgatagtaagagg	Neosonde ^s	aactcgtcaagaaggcatagaag
A3E26-Pi54	ttaaccagcatcaaccagccc	Neosonde ^a	agaggctattcgctatgactg
A3E26-Pi55	gccactagaacctccagc	PE12-2770+	ctaaagcgcagctccagactgcc
A3E26-Pi56	gcagagctaggtaggtacc	T3	aattaaccctcactaaaggg
A3E26-Pi57	cgacctgtggagtctgtctagg	T7	gtaatacactcactatagggc
A3E26-Pi58 <i>BamHI</i>	atggatcctatggcggagtcccg		

Sequenzen

Plasmolipin-cDNA der Maus

Die Plasmolipin-cDNA der Maus wurde über eine RT-PCR aus dem Ischias-Nerv eines C57/Bl6-Tieres gewonnen und sequenziert:

1 tataaagaag caggctgagc aagccagggg aagcaagcca gtaagcagca	951 gctcccggcc atataaccag cgctcagctg cctctttctt tgcttgtctg
51 ccctctcatg gcctctgcat cgctctctgc ctccaggtct ctgcccctgt	1001 gtgatgattg cctacggagt gacgctttc ttcagctcc aggcctggcg
101 tgagttcctg tcttgatttc cttcagtgat gagcaatgat atggaagcat	1051 aggagtggtg agcaacgagg ccacgagtca gatggctggg ggctactcct
151 aagacaaata aaccctttct tcccgaattt gcttttggtc atggttttct	1101 aagccageta tgctgtggcc tgagccatgg ctgggtctta gcacagggtc
201 accaccgtaa tagagaccct aaaacaacca tctaaaaatc tctgtgtcac	1151 accccctaag cttactggac tcaaaactct cagcactcct gaggaactgg
251 tctgcctcgc cctgttagat tcagtcacag cagcagttgc cactactctg	1201 cccacactgg cacagatgga actggccaag agccaggggt ggggacatcc
301 atttattttt tctgcctcgg ctgtctgtag atcgttctac ggactttctc	1251 tccccactc cttattcag cagaagtgta tggggtttg ggagctctgc
351 aaaatctcta tcaaacagg cgaaccagg gtttaaggggc ggggcctcaa	1301 cttgtcatca gagaactca gtagccagg ctgggccacc ctgttcacca
401 gaagggcgcg ggctcgggc ggagcggggc tggccttcgc gcactgtga	1351 gactaaatg cactaacaga cctcaagcc tctgactgc ctcagtataa
451 gttctgtcta gggtaccxaa gcagcgcag cagccggagc cgcagtcgca	1401 ccctaacaaa agacagatta tctttgtccc caagcaagc aagccccggg
501 gccccggagc agcgcgggga gcgcggccag agcgtctgag gctcgcgatc	1451 ctcttctggt ccaccgtcc cctcccctgc cccatgcaa cctgtcacct
551 gctatggcgg agttcccctg gaaagtgagc acgaggacca gcagccccgc	1501 gtatagactt ttataggaag agttgggatt tctgggactg gacgatttct
601 gcagggcgtg ggagcctctg tgtctcgcct gcgaccggat ctgggcttcg	1551 gataactggt ggttacaaca gtttccgatg gcagcaagct cgctaggtcc
651 tgcgctcccg tcttggggtg ctcgccttct tgcagctggc actggggctg	1601 cctccctcat gtagaactct cccctttggg agagctagca cccgtgcaag
701 ctggtgtggg cctgattgc tgacaccca taccatctgt atcctgcta	1651 ggttctccc gcccccgc cccagctgc tgattaggca caggggactt
751 tggctgggtc atgtttgtcg ctgtcttctc ctggctggtg acaatctct	1701 ccaaggaggg acagaaggaa gcaggcctt gcctggtgag ctgtcatggg
801 tcttcatcat ctacctgttt caactgcaca tgaagtgtga catggtgcc	1751 gttaatggtg actctgtttt ggaattatta tttttacaa tttaaataaa
851 tggccgttgg tgttactgat ctttttctgc gctgcacgg ttctetacat	1801 aatggaagca tctgtttgg
901 tactgccttt attgcctgtg cagcggcggt cgatctgaca tccctgaggg	

Plasmolipin-Gen der Maus

Plasmolipin-Gen der Maus: 5' Bereich mit Exon I (694-1381).

EMBL-Nr.: AJ298129.

```

1 accagaatcc cctgcccga ggtcatctgt aatcccagcc tgcaagacc      1351 cgctcttggg gtgctcgcgc ttctgcagct ggtgagccgg gtagctcggg
51 tgaggtaaga ggaatgtcaa aagcatgaag tcagtctgga ttacagagca    1401 gactggatgg gggactctcc ggggaccccc gggacgetca ctccaagat
101 atctctgtc tcaagacaaa aagtgggcaa aagtaccca gaggttgctt    1451 cgccgggaag cttgcacctg gggacgctcg tgtgacatcc ctgcgagcac
151 gagctcagga caccatgact gtgtctccgt gatgatcct ttgcatactc    1501 agcatgactc ttgtggaggg gaccatacac accctaccgg ggtggttacc
201 agcctccatc actgagaaga aacttttgtt aggaccttga gcttgtgata    1551 gtggcgatac cgtagctgag atagctgcgc acaactgtcc gecagtctgt
251 agttgtcaca aggagccata ggatagtaca gtcacctaca cagcttctgt    1601 cccttctctt ctacccttcc cccttccctc tgggaccgtg ccttgcttt
301 gacctggctc ttacceactg ggggtcagtg teaccctcat gtgctcagct    1651 ctccgccggg caaagtccac tgccctctcc tteaccgggc ttttaacct
351 ccagtcctct tggggacctg ctttctattt cccaactgc ctaggttggt    1701 aaatgcgacc gctctgtage cctcctggac agggcagAAC accacatcac
401 cctgccactg cgcctttgct cctacttaa accctccaa ggtttctccc    1751 tggctctgac acgcgcgctc ccaccagggc acctaccagg ggtctctggt
451 tactcacaga ttcaggcctc tgcacaaatg teaccacttc tgacaggtct    1801 tcgaatctcc ttcttgggc tgtggagatt cgagaggca agaaaccagc
501 tccttgacta atgtgctcct tccttttctg tcaacttaac ccaagctata    1851 tgtctgcatc ccccgtactc ctgtgcaggt cccagctgaa gatcctagag
551 gcaatccaag aggagggAAC ctggattgag aaaatgcctc tataagatcg    1901 ttgcccgctc ccattgggtg cattctgaga tgcagctgt cttttcatag
601 ggctctaggc aagccctgta gagaattttc tcagtattg atggaggagg    1951 tcccctctcg cgagggtctg gaggcctgtg gctgccctca gggAACggtc
651 gccagtcaca ttgtgagcgg tgccatccct gggctcgggg ttctataaga    2001 tcattaactc gagaggtccg ctggttaggg aatagggtag caccgaggt
701 aagcaggctg agcaagccag gggagcaag ccagtaagca gccccctcc    2051 gggcatgcat ctgtttctgt catcatcctc ccagtgggca cctcgagcca
751 atggcctctg catcgctcc tgccctcagg tctctccct gcttgagttc    2101 ggctgccagg ccgggctggg gagtcgggag gctttctctg gccatctcca
801 ctgctctgat ttctctcagt gatgagcaat gatatggaag cataagacaa    2151 cctagggeat acatactatc ttggtttcga gatttctgat ctctctggt
851 ataaaccttt tcttcccaca ttgtcttttg gtcattggtt tetaccaccg    2201 gagccttctc ccttcccctc tccccttccc ccttcccccc tccgtctct
901 taatagagac cctaaacaa ccatctaaa atctctggt cactctgctc    2251 cctgggtttt gtttaaaat cagattcttg ggccccaac ccgaaaaaa
951 cgccctgta gattcagtc cagcagcagt tgccactacc tggatttatt    2301 tgtgaaactg ctctttgaat ctccaaaagc gcagcaagaa atttgattt
1001 ttttctgcc tggctgtctg tagatcggtc tacggacttc ttcaaatct    2351 taatgtcttt ctctggagt ggttttgggt actgtttggt ttgatgaga
1051 ctatcaaac aggcgaaccc agggtaagg ggcggggcct caagaagggg    2401 tcagggaggg tagcatgagg ctctctctg ggaccaattt aactctgccg
1101 cggggcctcg ggcggagcgg gctgggctt cgcgcacctg tgatttctgt    2451 cgagacactc gccgacctg gagtgtggg ctcttggtga ttgccttgtt
1151 ctagggtacc caagcagcg cagcagccgg agcccagtc gcagccccgg    2501 tgttttattt atttgtttg attcaattg tttctgttt ttgagacaa
1201 agcagcgcgg ggagcgcggc cagagcgtcg taggetcgcg atcgetatgg    2551 gactgcata tagccagat tggctttaa ttcctgcag ccacagctgg
1251 cggagttccc gtgaaagtg agcagagga ccagcagccc cgcgcagggc    2601 cttcaattc cttgtgtagc ggaggctagc cttgactag accttccca
1301 gtgggagcct ctgtgtctgc gctgcgaccg gatctgggct tcgtgcctc    2651 agtgtttaa ttactttctg acaccaccac tccagggtt tttctgctt

```

2701 ctttgaacct cacactgag agtcagcttt gggctggggg aggagttaaa
2751 cggtttgtga aaggacaga gaggagagag gtctaggaag gagttacggg
2801 gaggctagaa gggtaagttt ttgagctaag cctttgcagg gagtgggtgtg
2851 gggacagcag aactttgtag tgcacaggct gagcgggagt tgtagcatcg
2901 tttctggtct ggctaggagc ccagcatcgt aagcatctag gggcagaact
2951 ggggtctctg ttgtgttggg ggtcttgga ggttctggag catgaagaca
3001 tcagggtgtg aatgataga tccttttac tctttctc cttcctaga
3051 tatcgttcca aagaactcac ttggagacta tggcagccg cttcttcta
3101 agatgtttct gtggcaacct actactccac tggggcccag ggggaggggtg
3151 ggcagacagg tacctacttg ctgaaagcc acaacagcac actggaggct
3201 ggttgttcta gacctttga ctagggtggg ttagtttgg tgttttagtt
3251 gttgtttgtt tttttttt gtgggggttt ttggttttt ggtttttttg
3301 aggggggggt tgtttttt aaagacaggg tctctcaaca tagctttggc
3351 ttctgggga gctgtttct gactctctct cggcctctac tctttatgtt
3401 gttttgctct tacattcggg ggtgtggcac atcagagcca agtgaagag
3451 gctccatgcc tagtgctcgc cccctgggga tcaaggaagg ctgcttggag
3501 gaggcagtag ctaaggagat ggaggtcttt gctggccagg ttgctctgc
3551 tactagggta tagaggccc tgcagcagatg gaaagatgga tgagaagcaa
3601 ggccaaactt ctggagcaaa gcaactgctc tcatctagca tggtagttca
3651 tctacagaac ctgacatcta cagacatctg atgctttta ctactcata
3701 actgcccata cccatctagc tccagaaagg atactggatg gtgctgttaa
3751 ttgttaatac agaagagta ctgtatttct aaagcctgac ttgagagaac
3801 ttttaaagag acatgccta gcagaaacc tgcaagtta aatgtttggc
3851 tcaaggctga cttctctggt aacataaca aaaaaagaa catgaatctt
3901 catagctatc gtctaaacag gccgcccaag ttgacctag agacaattct
3951 tttgcttcat gttacagttc tttgtgaagc aagggaatgg aaggtgctgc
4001 cggtgtggct gacaggtacc cgtggtacat cctaatgagt ttgaaaaaac
4051 ttgaaagaac gtgggggatg aagtaccac cttttcttt tctttcttt
4101 tgtttttgtt tttgagatg gatttcctg tgtagccta gctgttctga
4151 aactgtctct gcagaccagg ctggcctcca agaatactc ctgtctctgt
4201 gttcaagtg ctgggattga aggtgttcac cagcactgcc cgctgaagt
4251 gccatattt ttgatactt tttaacaca tctctcccc agctttggga
4301 caaagatga tcttacctgg gacttactga taagcacaga gacactggag
4351 caaagtcaca tggttggggg tgggtggagg acaagcaaa ctactgccc
4401 caggtaggat ttgcactcaa atctgactgt ttgaagccta gctccatcca
4451 tgttctctgc tgcctttata tgggattctg ggttctctag atggccttac
4501 aagagaagga tgacctctc aggaaggag actcggccga gactttagag
4551 gagggtctt tggaagaggt gagctcttaa gactgtctct agatggatgg
4601 ggttttagaa gaaggtttta gcaggtcaca gtggcacaac ggctgtaac
4651 cccagtctc ctgtgagtgg gaggtcaaaa caggaggatt gtgaatttga
4701 gaccagcttg tttaggagg accacgaatt aagcctggt gccagagaca
4751 tgggggctat gtatatatta tggatgcttt gaggaacga ggggttctc
4801 attgtcttc ctaacttcc ccttaggatt gggggcagcc acacagtct
4851 ggttttaggt aaacaaacag atcagaggcc tctctgcca ctgtagtgtt
4901 ccagtgcac tttgagaaca ctggctgatt gtaggtctgg aagcagaggc
4951 ttgggttcaa atccagactc tgttttttc aacttggat cctaagaaca
5001 gtcttgactc tgccecaac cccagcccc atacttcaac cttataacct
5051 tgtctgtaaa acagtatgg tagagaatg gcactgcca tgtcttagc
5101 ctggcacatg ctggcatgaa ggcagatc actcagcct aagatcctgg
5151 agctcttag caagctttag tgattctagg gacaaagctc atctctgaaa
5201 gcttctcat cttctctct ggggggacc gaggaagctc atccaatga
5251 ttctgctct atgtcagacc cagcagcag gctggtctc ctccatggag
5301 ggacaggagc agggccaaaa gagctctggt ttcaagaag ggctgtctg
5351 attgctgagc agatgtgagc agcaggcgg ggcgagtgga attgcaagga
5401 cagtgttggg ggttctctta agcctgatc tgtgttctt tggtagcctc
5451 agtcaagcct gcaggttct gtgccagagc cacaagtgcc ctgcatggtt
5501 aatccacc tctggtgggc aagagtga aaactttgag aattcacttg
5551 taatcacata atgagtgtat gggttgatc tctttaaaa aacaaagca
5601 agctgatgga gctctgagt ttgaggtagc ctaactaca taaaaaac
5651 aaaaccaate aatcaaat cgtagccaga tgtgtgtgtg tgtgtgtgcc
5701 tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgcctctgtg tgtgtgtgtg
5751 tgtgtgccta tgtgtgtgtg tgtg

Plasmolipin-Gen der Maus: 3' Bereich mit Exon II (8668-8841), Exon III (10838-10960) und Exon IV (11909..12745) sowie polyA-Signal (2717..12721).

EMBL-Nr. AJ298130.

```

1 ttctctctct ctctcttct ctctctctct cttctctat tctttcttt
1401 tcaggaggca gaggcaggca gatctctgtt aaagtctgag gccactctgg
51 ctttttttc cgagacacag ggtttctctg tgtagccctg gctgtcctgg
1451 tctacagaat gcattccagg actgccaaa gctacacaga gaaaaggcca
101 aactcacttt gtagaccagg ctggcctcga actcagaaat ctgcctgcct
1501 accaaccaac caaaaagaat tcttcaaat gaataaatat gttgggcagt
151 ctgectgagt cctgttttc aaacaacaa acatgatttt tttcttttt
1551 ggggaattac acagagtgtg tgcctatgct caaaactgtg agcggaggat
201 gatgtaatat gttctgacta caaataactg aagccacaca aaactatgt
1601 cgggatgtct atcaggccca gagaggaag atactctcct cgggtcacac
251 tacttaagga gggactctg tgggagggga cccagaatct ctctctcta
1651 agcagtgagg gatagctgtg agtttgggat tactggctgg gtaccctggg
301 cctgtggaat ttaacattg ctacacacta gttgcagttc atttatggc
1701 agtttttct ctgcatctgt cagcagaag tggcctctgc ttcaggaagg
351 ttctgttcca gtagacagcc tgtgtctca cactgatcag tgatttaaaa
1751 ggcagttcac atttacaag tcttctgct tatcagagag ttgcctctc
401 gtctccttta ttgtagctt agtcgggctg agtatacaga ttcattgtgg
1801 tccggcagtg gtggcttgac gactatgccc accattctct tcggggctgc
451 ggccctatag aaagaagtct tgtgtgcat gatgctggga aatatgtcat
1851 cgtggaaaac aggcggaggc tgttctctg gcggcagctg gaaccagccc
501 ggcgagtgag cgtgccttcc tgctcacaag ggaccaagta gcagctctct
1901 ttactctgac agaacagggc tcggggcttt ttgctgctgg gcagggtgag
551 gtgtgctgag ggccaggccc caggctgtgt ggtcaatgag aaagaagcc
1951 ctctctctgt ttgctcaggg agggaaggca gggcgacaca ccacagtctc
601 tgggtcagaa gcaagggtag cagtgggtct caacctctct aatgctgcaa
2001 caagtgagga caagacaaa ggtcaggaga gacctgcaa gtaggctacc
651 cctttaata cagttctca tgctgtgtg acgcctgccc gccccccc
2051 aagtccccag gcttgggcca gctactgag cttagectgg actgtgggct
701 ccaaccacaa aattatgtca ctgctgcatt acaactgtca ttctgcttt
2101 ggatgatctc tgacgccage tgaactctc ttctgccage cttgggggtg
751 gctatgaacc gtacataaaa catctgatat gcaggatc tgccttgtga
2151 ggggtgacac catcctctct gagagtggag atgggagaga tatgctcagg
801 cctcaaagg gatcacaacc cacaaagta gaactgctaa tigttagcct
2201 ccacactctg ggaatgagga aggcctgtc cttgggtctg cagctagacc
851 atggtcattc atctccaggt acaagatata cctctctgag gctgggattg
2251 ttaggtttt ccagggctaa gagattcaca ggctgtggtt gctccatagc
901 tatgtgcata gacggtgtct gatagctacc cagagggcca cactgaaaa
2301 tctggcatcc cagacagtaa tatttctctg aagcgtaat gtcagggtgc
951 cttggccatg tatagcactt ttttctttt atcattacat tgtatttact
2351 cccacctctg caggagtcaa gtgctaagag aaaggaagtc taccctgggg
1001 taccttttat tagttgagtt ttttttttc actcgtatgt gtgcatgtgt
2401 ctgtctagca tcctcatat ggatgccctt aggtcagatc ctcatctct
1051 atgcacacac tgcagcacgt atggaggctc acctgtggga ggtgtctct
2451 acaaagact tccgtttcc ttctgtgatt tgtgccgagt gcttctctg
1101 tttcaccaca tggctctggg gtacggagct catgtcatcg gggttggtg
2501 ggagaaagtc ggccccgaga gaggaaggcc caggaagtaa ggggcttgg
1151 agcattctta ttcagagcca tcacgccagg cggcagtac ttatttcaga
2551 cctgctggat gccaggctat gactgaagct gtatgttcaa gaagctctac
1201 agtatatagc aagtggagct tgttggagc taggactgga gaattgtgag
2601 cccgccttc tcacgcagaa taaaaactc ctgagatgtt cttctcaaa
1251 ttcaaggtca agcctgggct acttagagca taccagcat cttgagtaag
2651 gctggaggcc atcctaata tggggagacc caagcagaca ctatggggac
1301 taatgggacc ctgggtctaa aaacaaaaa taacaagtgg acagccatta
2701 ccctggggga gagtaaggag tggggcacag atgggtgctg tatgttctg
1351 cgaattcttt ccagcctggc agctgtgaca ctcacttta atcccagac
2751 gaaccttcc aggcactttg ccactgtgtg ggtgcca aaatggag

```

2801 ggaggggtag gaggcacaga cccacagcct cacacaccag gaggatga
2851 ccaaaggag acctgatta tctattctac ggggcagcat ggagttatgt
2901 aggaagtagt atgaagctca ttctgggtag aattttccta ctaaataaca
2951 ataattaaca ataacacatt taattattta ttattgatgt tattactgaa
3001 ccaaggacaa ggtttgtgt agtacagtct ggcttcaaga cttgtggcaa
3051 cccttaggtt ttgcctccc aagtctggg attacagatc tggaccacta
3101 gcacgggctg ggaagtttt tctaaaatac tggggacacc caggaccatg
3151 cagttgaaga gatttcaggt ccatattggc tcagccattt gtgtgtgtgt
3201 gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtacactctt gtactgtgg gacgtctct
3251 tctgagacct aggacttaca cctagcaggt tgcattggaa aactgcattt
3301 ggaataactgt gatgctggcc aaggcttagg cagactcctg caggccagcc
3351 ccagctgcc ataccctgc ttgtctctt cctcagactt gaaacagctt
3401 ggcacagaac cggctctgga gaaaagtgtg ctgcttgag tgactctggt
3451 ttctcgtgtg tctctgtttt cagatagaca aagggacaag cttggtggct
3501 ttgctttcc tggaagattc tagacatggt gtacctccc gccggccca
3551 tgtttctaaa atatecagtg caggaattcc aaggtgcctc accagcctc
3601 ctttggcaca gagagggtg gtgtgtgtgt gtggtatggc cagccagcc
3651 gcctggagcc tgtgtctctt gccctttgt ctctgtgac acaatgggtg
3701 acttcttacc cccataaagt ctcttcagt gtagggagaa gggccaggat
3751 gggggtggag gttgagctag gccaggctat gactaggcca agttgtctga
3801 tgcctcatc tgcttagact gtgcccagag tgaggggaga cccaggaag
3851 ggcatgtgg ccacctggg cctcagttc ccgatagtgt agtgaggag
3901 cagtcactga agggctgtga aagacttggc atactgccc catgtcagag
3951 ggttctccc cgtttctct ctccatggtc tgtgcccacc ttcactctt
4001 ctaaacatt tagcttaatt gctaacctc aaactgaa gatatcac
4051 aaagaacaaa cagtttga catccttca ggacttaca gcaactatg
4101 gaggactct ggccagagcc ctgcccagc gtacacagtt ctaccacag
4151 cccttatgc cctgagactg ggtttcacc agcaacagc gcttctatt
4201 ctgagcctg gcttagtccc ttctacaacc tgtaaagcct gtctaggaa
4251 cataggtcaa ctctagagag gaggctctc ccctctctg aagctccct
4301 cactcctec ttgcttctc cagtttaac tacaccacat aaccatacc
4351 tcctgttac gggcccggg cacactgta gggtaactag gctaacatt
4401 aaaactggt cttgtgcccc agatgaggac atagaccgga aaggttaggt
4451 gagtctaca gacaccaag actttacagt gactgactt tggctgaca
4501 atatctaga agcaggagta ggtggactc ggaggtaag gttaccaga
4551 atgccagag tagagttca tctgcccata gatttcaag tgactctga
4601 ctctctctc cccacctc agttccctaa tcttataac atgtacttt
4651 accagtgaga tctttctctg ctctatacc caaatcttc ctctctctg
4701 acactcttc cccaccgaa tttatcccga gacacacac cccaccccg
4751 tgcgatgctg taccagcca gttatgctt ctgagctggc ccaactgct
4801 gatgtggag cacctgaaag gtgcagagcc ctgacacaga agtctacag
4851 tagatggtg tgaagagag cactgagga caggtcagc tgggggag
4901 tgtgagctac atgagacatg ttcaggagc ggagttctg tcacgggatc
4951 agggagtaga ataaaggact ttgcccctat tctctgccc cctctacctg
5001 atgcctttg ctaccctga agagtgtgct tccccactg agtgaaggct
5051 tctggcctt cagctagatg gcaatctgtg acaggtgcat ttcagtgat
5101 cacaggagc cctgaaactt ctggaacctc cctccagga ccacagcag
5151 cagcaaggg gtcagcaaaa caccagctg gatggcttag ggaccggag
5201 aaactgttt gttgagttct aataaggac cggaccttc ttgtctagg
5251 acagaaacca agtcagctc ctaggcgtg ggccaagctc cacagccaa
5301 aggaacaaa atctacccc acctatctg tgctttatct ctgttttg
5351 tgatctgaa atcaggggtg gaggggaca gggggggac atgtatctc
5401 acagcctgc cctcagtagc tcttttcta cagctcagc agagctggct
5451 aattaatccc cttttatct caggttact gtatggctg tgagcgttg
5501 tagaaactg gcaagacagc ctggagagag ggtaaatggg agatctagc
5551 caggaccct ctgctggca cctaccgggt gaccctctg ctgaagcctg
5601 tgatgacag cattcaggt gggcatgat gtgaacatgc accggcctt
5651 tctgattgt catttgatg ccttttcta ctcttctca gttagtagga
5701 aacagccac ccagtgccg ggttggggc ctgaaaaga cttacataa
5751 gactgacag tccctaggtg tgtcccccac cccccccc caccctctc
5801 catgtctac ctgagaaat gctggagatg ttattcaga gcgtctcat
5851 tctctgaca gaaatgact cacggaactc tggggttctg tggccttct

5901 agtatgtctc tttggcagc gtgatttggg gtggggagta aagggtgtg
5951 caggaccatg tgtggtcca catgcctgtg gtgtagaac tgaggagcag
6001 ggtgtgagtt caaggtcagg ttgactgat gagaccatgc caagaaagag
6051 ggagaggagt gaggaggaa ggagagaggg agggtagggg aaagtgtgtg
6101 tgtgtgtgtg ttgtcatgt ataggcatgg gcattccaga gtgctcatat
6151 ggaggttga gacaatttt caggagtccc ctctccac gtaggttcta
6201 gagatctaac tcaggtcacc agactttgtg gcaaggtctt cacctactga
6251 gccacctctc cctggccact gagggttaat gaaatgaggg ttgtccca
6301 gtttggcatg tgaccacagt cttagaaggc cctgctacac agccccatc
6351 ttgtcactgt aaagtggca tggagacaaa cctgggcat gcttgtgagg
6401 gtcagaggca agagcagatg gagggtgct atgtgacatg ggtgtctggg
6451 gctcacctta gctgggagc gcagatacag agagagcctg ctttggccag
6501 ggcattgctg ggctcctagg cctgctcagc tacagggtcc ctgctctac
6551 actgcaagtg tgtattcaa acaaaagaaa ctctctgta gtgggtggt
6601 ttgagagaag ggggctggag gagccccage tctgggtcat gaccctctg
6651 gtgaggattt ctcttagat cccagggaac ttgccaatgt cctgtgagca
6701 gagtggtag gccaggagat ggggacttgt ttcaaagat cagtatccc
6751 aggcagctc agctcctag atctgactga aagggtctca ccttggact
6801 ggggctaccg gcttcatgc tagcagcaga gggtagacca gtctctg
6851 ttctagaat gaagcttct ccagaagcca cagtagactt ctacacct
6901 ggtggctggt agagtccag atgagagaga gtgggtatcc ccaacctag
6951 acagagatcc ttggccagca aagaagaggc tgggaggecc aggacagta
7001 cggggttga ctatccctgg gtcttccca gggctttgg gctatgctc
7051 tacaagaagt ctatggtag aaccatctga gtttggctct ttgtggcagg
7101 actcagggg ggagaaattt acataaggct gaccgtact ctcaagtata
7151 aaactgact ttgagtagct gtctcagggt ggtgtgtcc ctgactgtt
7201 acgaatgagg taaggaagca ctgcagctt gtgcaggtg aagaggaacg
7251 ggttttaaac aaagccatg cttttagggt ctacacactc agtcgggat
7301 gtgggggtac ctgctactc taaccacaa gcttctggc gtgcttacc
7351 atccactgg ctctctctt cactctggg ttctggaggg aggggccc
7401 tcaagttgc aggtttcca gcttaggcaa taagctctgt tactgctga
7451 gccatctga aacgtcccc tttctgcta tctatctatt tattatcta
7501 ttaaggattt acttatttta catatgagta cactgttctc atctcagac
7551 gcaccagaag agggcaccag atccccatta cagatgggtg tgagccacca
7601 tgtggttctt ggaattgaa ctgagggtct ctggaagagc agccagtctt
7651 aacctgag ccactctcc actactcccc ccacccttt ttttgagac
7701 agagtttgt tttgaaacag gggctcatgt gggcaagact ggcctagac
7751 tcatgttgc ctgaaactca ttctgaagtc tctttttcc tccagtgtg
7801 ggattacaag tattagctc cctgactggc ttctagcatt tttttttt
7851 ctgcacctgt ggcaagtc agccccgga atgctgtggg cagtctggt
7901 atgaggagca tatactctat gggagagata cgttctac cttgggtggt
7951 actatctggg gacctgggtg tctcagttag ggttttatg ctgtgaacg
8001 acaccatgac caaggcaagt ctataaagg acaacattta attgggctg
8051 acatacaggt tcaaaggtc agtcagatg cgtcaaggca agaacggagg
8101 cgaatccagt caggcatggt gcaggaggag cggagagttc atctctact
8151 gaaggctgt agcagatgac tgacttcaag gcagctagaa tgtgagactt
8201 ataactaca cccacaatga cacctacc agcagggcca tacctttaa
8251 tctgtcact cctgggccc agcatataca aacctcaaca cggggaaga
8301 gcctttgtc acacagcatg atgggaattg aaaggggaa gagtggccag
8351 acaagatcc cagcacagat gtaacaaca ggagcaaga tttctttaa
8401 gaagctgtt ttaattgtac gtgcgtgtg ccatgttca tgccacagt
8451 aacacagaaa ggctggagca caacctgg tcgtacttt tecttaca
8501 cctgagttcc agaattgaat tccgttgc aggttgtga caaacattt
8551 acctcttag ccacttgc agctaaact tttgagttt acaagaaagg
8601 gggccaaggc cagacctcc ggctggagct gttcagctc gagaaactc
8651 ccctatttt tccacagca ctgggctgc ttgtgtggc cctgattgt
8701 gacacctat accatctgta tctgcctat ggctgggtca tgtttgtc
8751 tgtctctc ttggtgtga caatctct ctctcacc tacctgtt
8801 aactgacat gaagttgtac atggctccc ggctgtgt ggtgattt
8851 gggcaggac tgtcggctc caggctgag ctctctct gtgaatgct
8901 aggacggac ctctgacct tccataaatg tgaatggag ggcaggtgg
8951 tgggtgtg gccatctcc tgcctctag ctacatgag agctggggtg

9001 ggaaggtatg ttaatgacgg aagtggagtg tttgacttgg tgcttgaag
9051 agaccagcat cgagaggcta ttgactgact ctgcagatat ccttgggaat
9101 cttgggatat tgttctttct tgaggggat cagaattttg agctcggagg
9151 tctgggtttg tcagtgcag ctgcctecat tctctccagg cctggctct
9201 ctggagagaa tgggtgcccc aggtttgtct caggccagc tctctggct
9251 gggttttttt tttttttt ctggaacca gaaaacct gcagctgggt
9301 ctgagccttt tagtgagcac agaggcgcatt gattgtaagg caggcggagg
9351 ttggaactag gcagcgattg ttacaattc aatgcttgtt tagcgagagg
9401 aaactgtagt catccgaga cagaatgggt ttgtagatc ctgtctcgc
9451 tagccagagc cggcgagggt gtgactggt cactgtactt ggggacaaga
9501 tttgggattg aggtggcggg ggctggactc ctggctaaag gctagcccc
9551 cttctgaata tcccaagccc ctaaagaaga attccacaag gctggagacc
9601 tctgtctctg aggcaaggct ggcagcacag cacagccca gtgaaggagg
9651 tcagctgggg gctgtgtctg gtgctgctgg gctgagctgg gagaggaact
9701 gggtagatgac cttctcaac tctgggaca tgtttaatat aaaggctcag
9751 gtaagatgga ctagtgaact gggcaggaa ggtctagaa cctaacaagt
9801 acctggcctt gagaagctgc ctctgcccg cttaacctt gagagatgt
9851 ggcccactgg tgccaagcct tgaggattt tgtttgtgt actgatggc
9901 ctaggatca aatccaggac ctcatgaatg cagagcttta cactgagata
9951 catgcccagc cctgagtag ctgttgcctt tgtttttt atacagtttt
10001 gatgttagg cccgactgac ctggaatcca tggctctct gctttgtgt
10051 ctgacatgct ggctctgta agctactctg cccagcttg aggggtttt
10101 gttttgtttt attttagct aggtttctc agtagccctg gctgactgg
10151 aactcactag tctaggctgg cctaaactc agagatcggc ctgcctctac
10201 ctctgtgtg ctgcgatcaa aggtgtgagc tacaactact tatcttaatt
10251 gatatttga tatagcatct cactatatgc accaagttgg cctctgcctc
10301 ttgagatgct gggattacag gtgtgtacca ctatgtccag aaactttgaa
10351 catgtttaat atgaaatttt caagttttca catgaaatct aattttaat
10401 gttggcaatt aaaaatgtat agcacaataa atggctggag accggtttga
10451 ggacaagagg catccactgg gggtaggaa caggccccgc tgccagctga
10501 aggtcacat ccagctctt tgggtcttg tagagattcc ctaggacct
10551 gcccctgta tttcccttg agtttagat agtataagg agtcatagat
10601 ttctccact ggtgggcaga gggatgtgag ggccaggcac atggccaagt
10651 gctgatgtg tcataggaag aacatggca tggcgtgtgc cacacaagag
10701 atggcattc tttagctgt tagaggcaag tggctcgtt ggtggcacc
10751 gtccaacac ttcagcctt cccgtcagg cttaaggtg gtgactttc
10801 ttgtgatgc ttatcctct gcctctcc cctacagta ctgatcttt
10851 ttgtcctgc caggttctc tacattactg cttttattg ctgtcagcg
10901 gcgctgac tgacatcct gagggtctc ccgcatata accagcctc
10951 agctgcctc gtaagtatg cccagctcc agcctctgc aggtatcca
11001 gccagcct ttgtgaact acagctct ctctgagttg tcaactgctg
11051 gatgctcag ggcctctt ccttagtga cagcagaact caaggggacc
11101 tgaatgatg ggatecactg tggactctg cacattgca cctcagctg
11151 gctgtcatc ctgacatc cgtctacatt tctttttt ctagtattc
11201 cttataaaaa ttccaaact ggactgtgtc aagacggcca ttcactac
11251 ccagttcag tctaaaggca gagactatg gttcttttt agagaaggaa
11301 actggagttg tggctatgc caggacagga cagccaatgc tgggtgtctt
11351 ccatctctc ggtgagagt ggttataaat taagtgaact ccatctggg
11401 aacggagact caagctctg aaagcacag ccacatacag ggtacaaact
11451 gattcagaaa actcctggga gcctggagta ttactactg tttttttt
11501 tttcagttt gggcctgaa ccacagctc tgggagctt gggcaacagc
11551 tttactgag ccacatcct agcctgaat gttactgtg gacactaggt
11601 ccttatgta tataaagta cccactgct actecagagt gctgtcctg
11651 gcaccatctg acatgtctg cctgttagt tcttcccct gaccctaga
11701 acataatgcc agatgtgtg tatgggtggg tgggcataag ggggtggct
11751 gccagaaca gtgctctga ttaaccaag gggctctgc tcaagtttc
11801 atcccaagt cctctgagg agaccactt ggtctgtgt cactgtccc
11851 atgtgttct ctgctctc ctgactgacc ccttggctt cttttctc
11901 cctgccagt ctttctgt ctggtatga ttgctacgg agtgagcgt
11951 ttctcagct tccagcctg gcgaggagt ggtagcaac gggccagag
12001 tcagatgct ggggctact cctaagccag ctatctgtg gcctgagcca
12051 tggctgggtc ttagcacagg gtaaccctt aagcttactg gactcaact

12101 ctcagcact cctgaggaac tggcccacac tggcacagat ggaactggcc	13351 gtgttttctc acgtgtatgt atttgcaacta tctgggtgctc aggaagcaga
12151 aagagccagg ggtggggaca tctctccccc ctccttatt cagcagaag	13401 agagagcact ggattccctg aagctggagt tagtgcgagt gctgtgaact
12201 tgatgggggtt tggggagctc tgccttgta ctagagaact tcagtagccc	13451 gaccagggc cctcggaag agcagcaagg gctctcagcc actgagccac
12251 aggctgggcc accctgttca ccagactaa atgactaac agaccctcaa	13501 ctctgcagac ccttcacccg cccccgtat tctctctctg tatttgtcca
12301 gcctctgacc tgctcagta taacctaac aaaagacaga ttatcttgt	13551 ctctctctt tctaaccagg caggetgagc agcaaacctt actgagtct
12351 ccccaagcca agcaagcccc gggctctct ggtcccaccg tcccctccc	13601 ttcagcatct gactgcagcc ctgattatag gagggcagg aaggggaagg
12401 tgccccatgc caacctgtca cctgtagaga cttttatagg aagagttggg	13651 tcaactgagag ttgacagtta cacagagggc cttgatctc aaaaaccaa
12451 atttctggga ctggacgatt tctgataact gttggttaca acagtttccg	13701 agcaacaata accggaggtc agtagataca ttaaaatgga caatgcacat
12501 atggcagcaa gctcgtagg tcccctcct catgtagaac tctcccctt	13751 caagtatta ttctgcccac acacctcaaa ttttactcat tttacaaaag
12551 gggagagcta gcaccgtgc aaggttctc cccgcccc cgccccaggc	13801 tactaaatga cacacagcta cagaaaaaa cacggagctt agcttatatc
12601 tgctgattag gcacagggga cttccaagga gggacagaag gaagcaggcc	13851 ccttaaagtc taatggtcac atggaaagc agcagggagt ctgtttacta
12651 cttgcctggt gagctgtcat ggggttaatg gtgactcttg tttggaatta	13901 taaaagttaa agtcaaaagt atgattaggt gtttgaactg tttctgctt
12701 ttatttttta caatttaaat aaaaatgga gcatctgtt gaaagggtt	13951 cttctagag atgtgataca catgcttct gtttgggtgc agtcaccaa
12751 tatcattcct ggtcttagat gtttgtaag gttttactt tttggtcct	14001 agatgacaga ggaccagaaa tctgtgtct cccccacc ccacccccag
12801 ttagaagatg gcaacaatta agatgaaatt agaatcagat acttgcgttt	14051 gctgagctgg atcaggggag catcaactta gcagagaga ttgtatgaaa
12851 tgatactgtt agagggagga gatcaagttt tggctcttg tcccgtcct	14101 acaaacagca gactcctac cccaataac cccccccagc tcaactggct
12901 cacttctctt ggtgattgic aatatacata gtgtccactt tggaggttag	14151 acacgaagga ctgcacacaa gcattgcacaa gcacacctg catgctgtcc
12951 gtaatgaagt ctccctgttc caggaggact agccatttt gagcataga	14201 tgacagagcc tcggtccact tctagcacac agcctctttg tctgtgtgcc
13001 ggaaagcga tccataggaag ccagagctct cagagacca tcagtatct	14251 cagcaaggag aaccctcgg aaagcatt cgcactcgca aactcacag
13051 cacgcctga cgtaatgctt cgtacaatct cagaatgcc gtttagggga	14301 ctacaaagca cacagcatat aatacttga tctttaagt gttgatcatg
13101 ggcattctgg gttctgtctc tcagcaggaa tagaggcagc atctcagtga	14351 ggcaccccaa gatcactc actaggttag cctgagttt catctataaa
13151 tgggtcacac gggccagact cttaactttc ttgccctgt cttgtcatt	14401 aataagttc ttaaaaataa tgcttagagt catagagaac agtagggcta
13201 ggaggacgca catagcatct gtccaagttt gtggaccaac acacaaatt	14451 catcaagacc agcaggactc actcactggt aaaaggattg ctaatgtaag
13251 agcaagctta catagaatat taaactgttc ttgcagtctg cctgcctct	14501 gtcgggagtt ctcttctact tgtgggtaga gggcagctct ctcggtggat
13301 gggctctttt gtttttaag attattctta tttgattca tgtctgcga	14551 c

Aminosäuresequenz des Plasmolipins der Maus:

MAEFPSKVSTRTSSPAQGVGASVSALRPDLGFVRSALGVLALLQLALGLL
 VWALIADTPYHLYPAYGWVMFVAVFLWLVTIVFFIHYLFQLHMKLYMVPW
 PWPLVLLIFFVAATVLYITAFIACAAVDLTSLRGSRPYNQRSAAFFAC
 ACLVMIAYGVSAFFSFQAWRGVGSNAATSQMAGGYS

Im Laufe der vorliegenden Promotionsarbeit standen mir viele Menschen stets hilfreich zur Seite. Wenn einige von ihnen hier nicht namentlich erwähnt werden, ist das nur auf den begrenzt zur Verfügung stehenden Raum zurückzuführen.

Bedanken möchte ich mich zuallererst bei Prof. Hans Werner Müller, der mir diese Arbeit ermöglichte und stets für kritische Diskussionen bereit war. Das gilt ebenso für Prof. Rolf Wagner, der sich freundlicherweise als Betreuer zur Verfügung gestellt hat. Bei Dr. Frank Bosse bedanke ich mich für die Betreuung und die freundliche Zusammenarbeit. Ein besonderer Dank geht an Dr. Patrick Küry für die unzähligen Ratschläge, Diskussionen und Anregungen. Prof. Ulrich Rütter und Dr. Thomas Theil danke ich für die unkomplizierte Kooperation und die Unterstützung meiner Arbeit im Bereich "Tiermodell". Ein Glücksgriff waren die Mitarbeiter des Neurochemischen Labors, die auch über einen Generationswechsel hinweg das Labor zu einem angenehmen und lehrreichen Arbeitsplatz gemacht haben. Zu erwähnen sind hier vor allem Christian Stephan, Birgit Hasse, Ulrich Pippirs, Sebastian Franken, Friedericke Lausberg und viele mehr. Für wertvolle Ratschläge in der Zellkultur möchte ich mich darüber hinaus bei Brigida Ziegler bedanken und ebenso bei Regine Greiner-Petter für die Fülle an Tipps für den Labor-Alltag. Nicht vergessen möchte ich natürlich die "Damen" und "Herren" aus meinem Studium, die seit Jahren immer wieder belebend mein (außer-) universitäres Leben begleiten. Dank gebührt zudem vor allem auch meiner Familie, ohne die ich dieses Studium nicht hätte bestreiten können. Ganz besonders aber möchte ich mich bei Gaby Symalla dafür bedanken, dass es sie gibt.

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt zu haben. Alle Stellen, die aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, wurden als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Düsseldorf, den