

IV. Ergebnisse

4.1. Immunlokalisation von Mdg1 in der Maus

4.1.1 Der Antikörper 2983

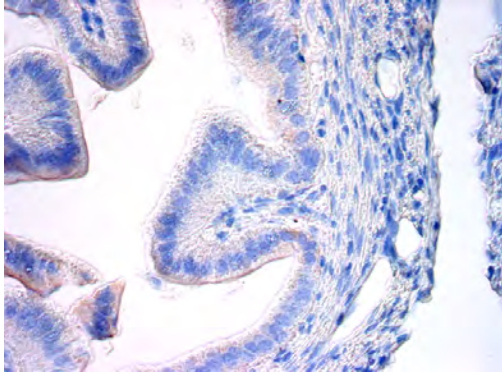
Um die Lokalisation eines Proteins immunhistologisch in Gewebeschnitten untersuchen zu können, ist ein Erstantikörper notwendig, welcher spezifisch an das zu untersuchende Protein bindet. Je spezifischer der Antikörper ist, desto genauer ist die Aussage über die Lokalisation des Proteins. Für das Mdg1-Protein ist der Antikörper 2983 vorhanden, welcher das Mdg1-Protein allerdings nur in hohen Konzentrationen detektiert.

Es wurden alle Organe sowohl mit als auch ohne Erstantikörper untersucht. Hier soll zunächst an zwei Beispielen gezeigt werden, dass der Antikörper 2983 in der Immunhistologie verwendet werden kann. Dies wird anhand des Eileiters der adulten Maus, als Beispiel für ein sekretorisch aktives Gewebe und am Darm eines 12 Tage alten Fetus, als Beispiel für ein differenzierendes Gewebe, verdeutlicht.

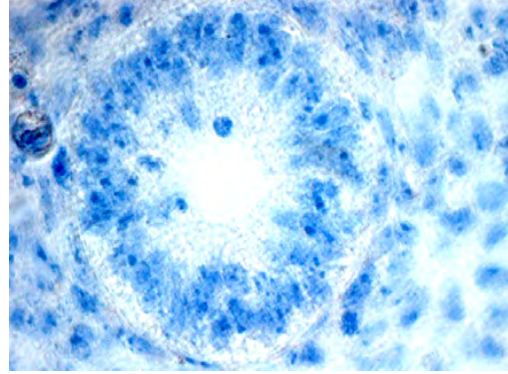
Die positive Rotfärbung lässt auf eine Lokalisation des Mdg1-Proteins in den entsprechenden Organen und Geweben schließen (Abb. 2 C, D). Ohne Erstantikörper ist keine rotbraune Färbung in den Schnitten zu erkennen (Abb. 2 A, B). Es ist lediglich eine blaue Anfärbung der Zellkerne zu beobachten, welche durch die Gegenfärbung mit Hämalaun erzielt wird. Somit kann die Hintergrundfärbung vernachlässigt werden und von der rotbraunen Anfärbung der Zellen direkt auf eine Mdg1-Lokalisation geschlossen werden.

ohne Erstantikörper 2983

A) Eileiter adult, 20x

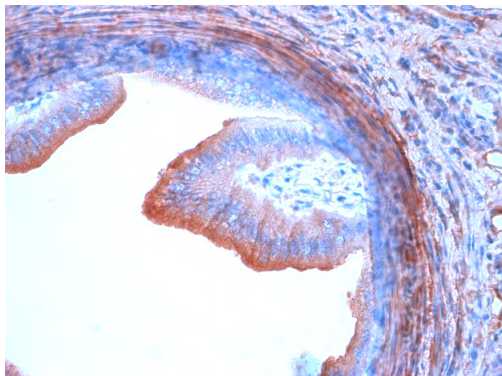


B) Darm 12 Tage, 100x



mit Erstantikörper 2983

C) Eileiter adult, 20x



D) Darm 12 Tage, 100x

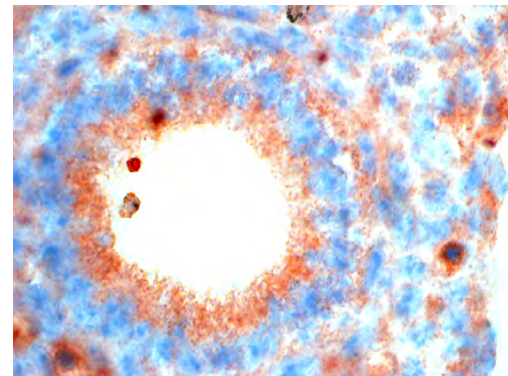


Abb. 2 : Kontrolle des Antikörpers 2983 auf dessen Anwendbarkeit in der immunhistologischen Nachweismethode

A und B: Negativkontrolle, ohne Erstantikörper 2983; eine rotbraune unspezifische Hintergrundfärbung ist nicht vorhanden bzw. sehr gering. Die blaue Färbung zeigt die Zellkerne an und ist durch die Gegenfärbung mit Hämalaun bedingt.

C und D: Positivkontrolle, Verwendung von 2983 als Erstantikörper; die rotbraunen Bereiche zeigen die Lokalisation von Mdg1-Protein an

4.1.2 Immunlokalisation von Mdg1 während der Organogenese

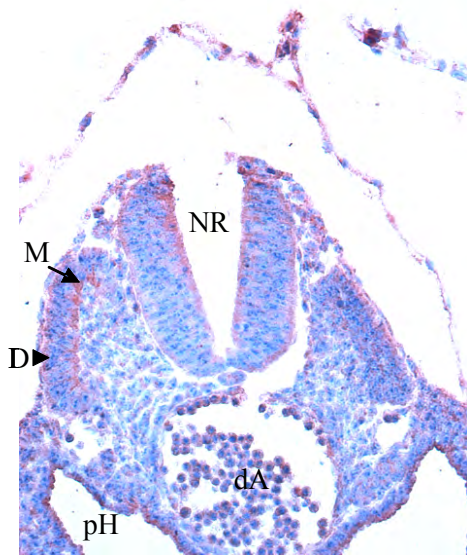
Um die Lokalisation des Mdg1-Proteins während der Embryonalentwicklung und der Organogenese zu untersuchen, wurden Mäuseembryonen und -feten verschiedener Entwicklungsstadien herangezogen.

Als erster Untersuchungszeitpunkt wurde der Tag 9 in der Entwicklung gewählt, um eine Aussage über die Lokalisation von Mdg1 während der frühen Organogenese treffen zu können.

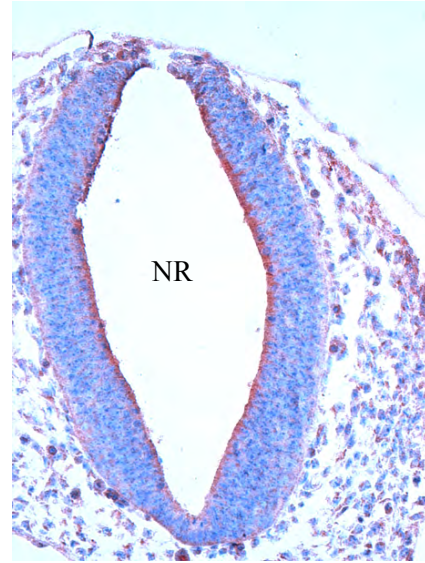
Die Lokalisation von Mdg1-Protein bei Mäuseembryonen zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung ist vor allem im neuroepithelialen Gewebe des Neuralrohrs nachweisbar. Dieses zeigt im lumenwärtigen Bereich eine deutliche Mdg1-positive Anfärbung, wobei die Intensität der Färbung nicht in allen Abschnitten des Neuralrohrs gleich stark ausfällt. Diese richtet sich in dem Gewebe nach dem jeweiligen Grad des Schlusses. Geschlossene Abschnitte weisen keine Mdg1-Lokalisation mehr auf, während noch offene Bereiche positiv für das Mdg1-Protein sind (Abb. 3 A bis C). Die positive Anfärbung ist auf die apikalen Bereiche der Epithelzellen beschränkt. Das Zytoplasma, wie auch der Zellkern, zeigen keine rotbraune Färbung (Abb. 3 D). Das Dermomyotom (Abb. 3 A) ist im medialen Bereich positiv für Mdg1. Dieser Abschnitt entwickelt sich später zum Myotom. Eine Lokalisation des Mdg1-Proteins findet sich außerdem im Epithel, welches die Körper- und Organhöhlen auskleidet. Das Entoderm, das den Magen-Darm-Trakt auskleidet, färbt sich positiv an, was anhand der pharyngealen Höhle in Abb. 3 A gezeigt wird. Aus dem Entoderm entwickeln sich in späteren Stadien die Enterozyten. Das Endothel der Gefäße, wie beispielsweise das der dorsalen Aorta (Abb. 3 A), zeigt sich ebenfalls sehr schwach positiv für das Protein Mdg1.

Auch extraembryonale Strukturen, wie Dottersack und Amnion, sind zu diesem Entwicklungszeitpunkt positiv für Mdg1. Im Bereich des Dottersacks zeigt sich die positive Anfärbung vor allem in den Dottersackgefäßen.

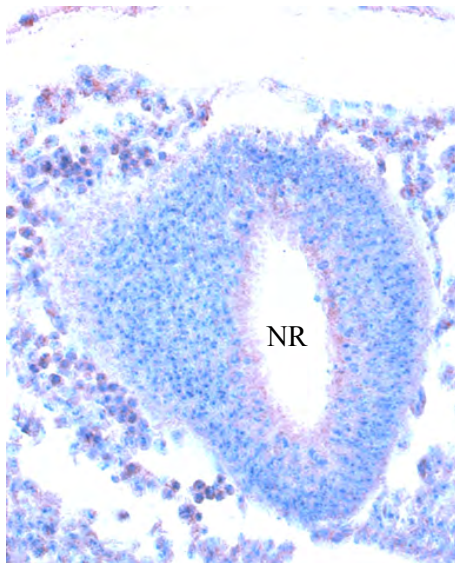
A) Neuralrohr, 20x



B) Neuralrohr, 20x



C) Neuralrohr, 20x



D) Neuroepithel, 100x

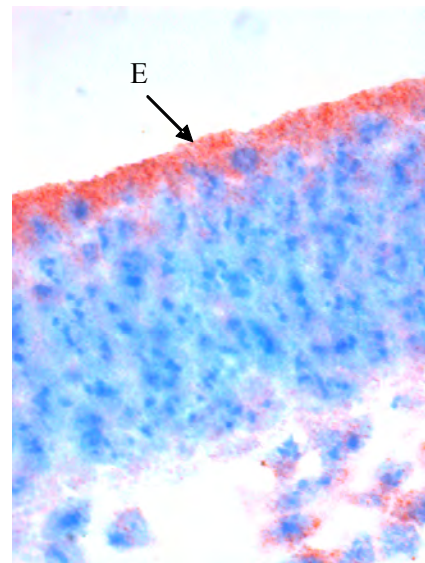


Abb. 3 : Immunhistologischer Nachweis der Lokalisation von Mdg1-Protein in Mausembryonen Tag 9

Immunhistologische Anfärbung mit dem Erstantikörper 2983, Gegenfärbung der Kerne mit Hämalau. Die rötlich angefärbten Bereiche sind positiv für Mdg1. Bereiche, welche lediglich eine Blaufärbung aufweisen, sind negativ für Mdg1.

Das neuroepitheliale Gewebe des Neuralrohrs färbt sich im apikalen Bereich rotbraun an. In Bild A) sind neben dem Neuralrohr die dorsale Aorta, die pharyngeale Höhle und das Dermomyotom als positive Strukturen zu erkennen

D=Dermatom, M=Myotom, NR=Neuralrohr, dA=dorsale Aorta, pH=pharyngeale Höhle, E= Epithel des Neuralrohrs

Der Tag 12 der Entwicklung steht inmitten der Organogenese, weshalb dieser als zweiter Untersuchungszeitpunkt gewählt wurde.

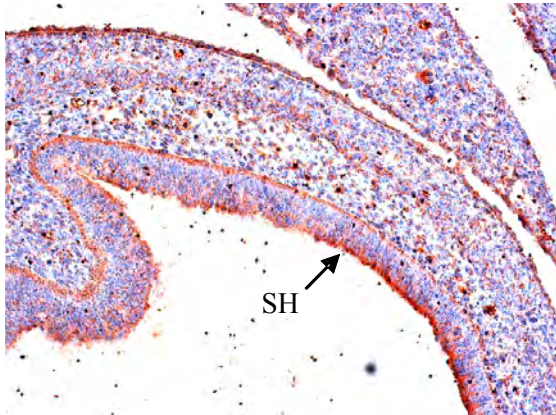
In dieser Entwicklungsphase kann das Mdg1-Protein in Magen und Darm nachgewiesen werden (Abb. 4 A – C und D). Die Negativkontrollen zeigen, dass ohne Erstantikörper keinerlei rotbraune Färbung in diesen Organen vorhanden ist. Im Bereich der Magenschleimhaut ist eine positive Mdg1-Färbung sowohl apikal als auch basal in den Zellen zu erkennen. Mdg1 ist in diesen Zellen zytoplasmatisch lokalisiert, ebenso in den Schleimhautzellen des Darms. Allerdings ist im Darm Mdg1 vor allem im apikalen Bereich der Schleimhaut nachweisbar. Die basale rotbraune Anfärbung ist nur in einigen Zellen erkennbar und schwach ausgebildet. Die Zellkerne zeigen in beiden Organen lediglich eine blaue Färbung, bedingt durch die Gegenfärbung mit Hämalaun.

Im Bereich der Nieren zeigen die Zellen der sich entwickelnden Tubuli eine positive Reaktion auf Mdg1 (Abb. 5 A). Diese ist zytoplasmatisch und besonders im apikalen Bereich der Zellen lokalisiert (Abb. 5 B). In den entstehenden Glomeruli ist das Mdg1-Protein ebenfalls nachweisbar, jedoch ist die rotbraune Anfärbung nur sehr gering. Die Negativkontrolle zeigt wiederum, dass ohne Mdg1-Antikörper keinerlei rötliche Färbung entsteht (Abb. 5 C).

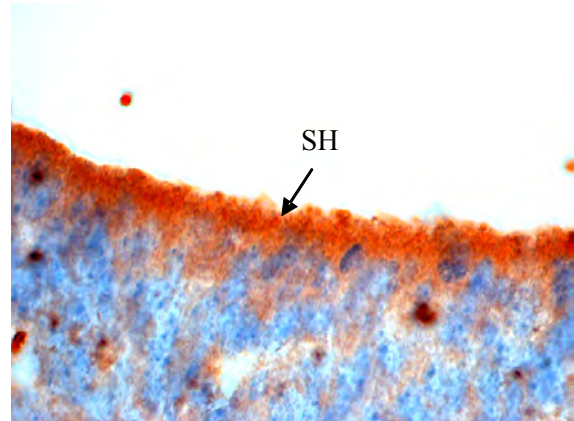
In den Ependymzellen, welche die Gehirnventrikel auskleiden, kann zu diesem Entwicklungszeitpunkt eine Mdg1-Lokalisation nachgewiesen werden (Abb. 6 C). Diese ist im gesamten Zytoplasma der Zellen vorhanden, jedoch zeigt sich eine stärkere Anfärbung im apikalen Bereich der Zellen (Abb. 6 D).

Bei der Betrachtung des Knorpelgewebes fällt auf, dass nur einige Chondrozyten eine Mdg1-positive Färbung zeigen. Positive Zellen liegen hier neben negativen Zellen vor, wobei die Lokalisation des Mdg1-Proteins im gesamten Zytoplasma der positiven Zellen beobachtet werden kann (Abb. 6 A, B).

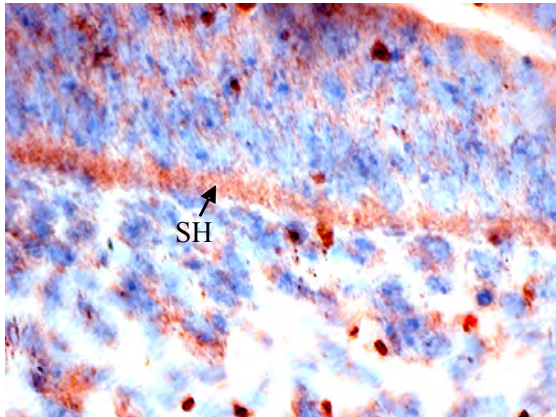
A) Magen, 20x



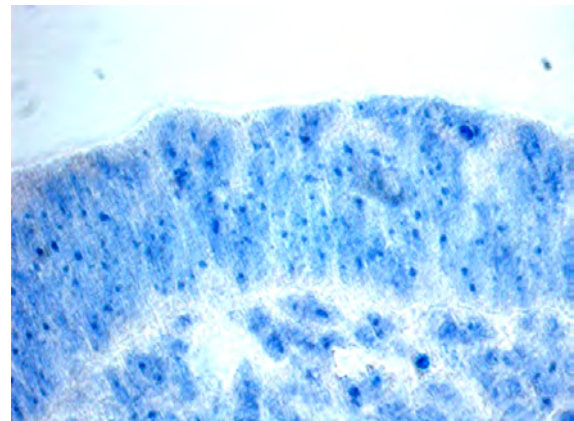
B) Magen apikal, 100x



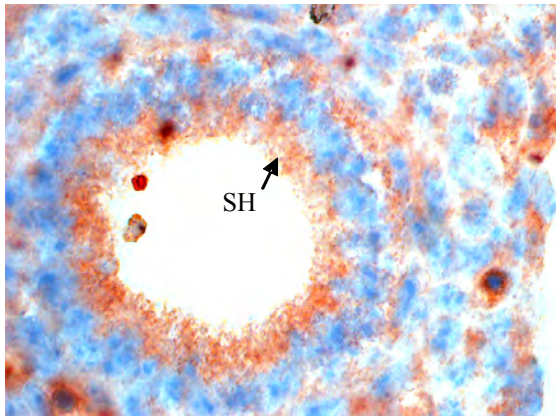
C) Magen basal, 100x



D) Magen Negativkontrolle, 100x



E) Darm, 100x



F) Darm Negativkontrolle, 100x

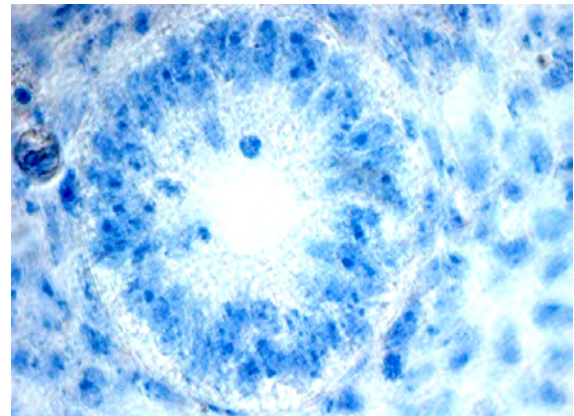
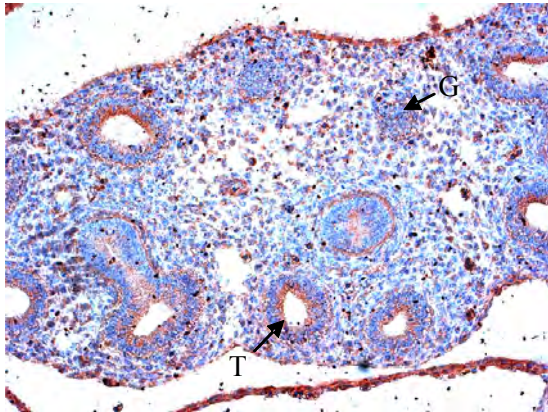


Abb. 4: Immunhistologischer Nachweis der Lokalisation von Mdg1-Protein in Magen und Darm am Tag 12 der Entwicklung

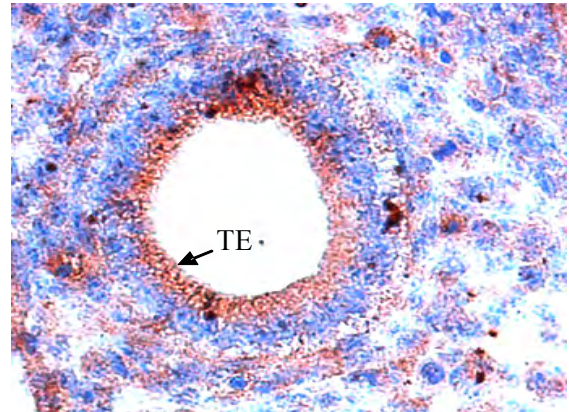
Die durch die immunhistologische Untersuchung mit dem Erstantikörper 2983 angefärbten positiven Bereiche stellen sich rotbraun dar. Die Schleimhautzellen des Magens sind sowohl im basalen als auch im apikalen Bereich positiv angefärbt, die Zellen der Darmschleimhaut vorwiegend apikal. Die Zellkerne sind durch Hämalaun blau angefärbt.

SH=Magen-Darm-Schleimhaut

A) Niere, 20x



B) Tubulus, 100x



C) Tubulus Negativkontrolle, 100x

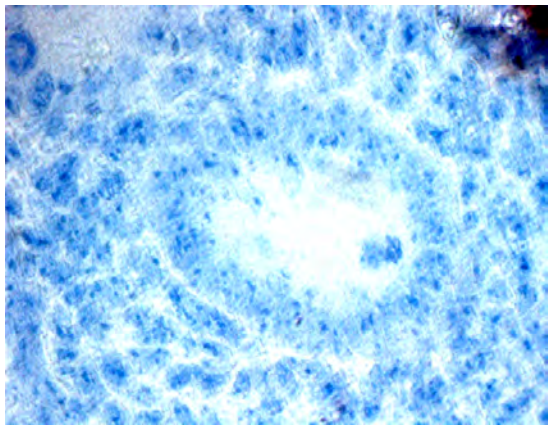
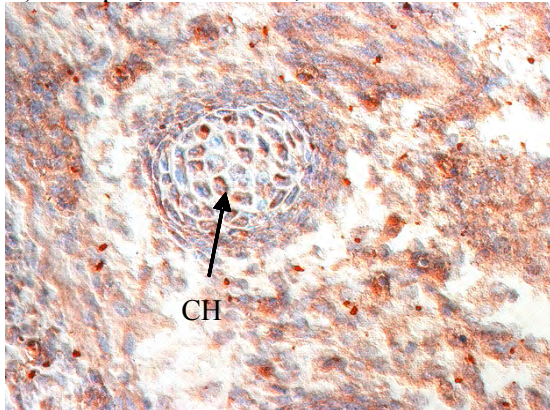


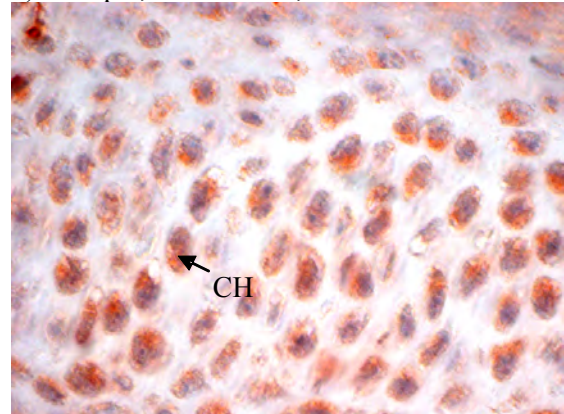
Abb. 5: Immunhistologischer Nachweis der Lokalisation von Mdg1-Protein in der Niere am Tag 12 der Entwicklung

Die durch die immunhistologische Untersuchung mit dem Erstantikörper 2983 angefärbten positiven Bereiche stellen sich rotbraun dar. Im Bereich der Tubuli ist das Epithel apikal rotbraun gefärbt. Die Glomeruli zeigen nur eine geringgradige Anfärbung. Die Zellkerne erscheinen durch Gegenfärbung mit Hämalaun blau.
G=Glomerulum, T=Tubulus, TE=Tubulusepithel

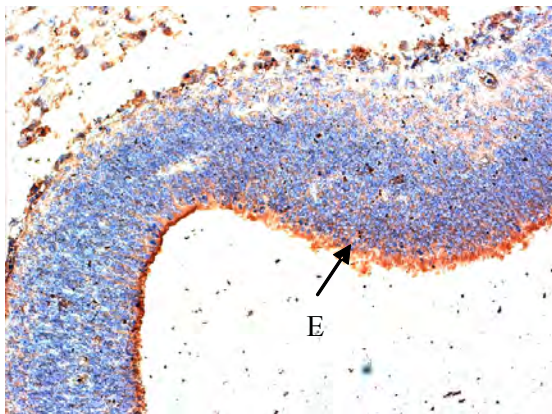
A) Knorpel, Wirbelsäule, 40x



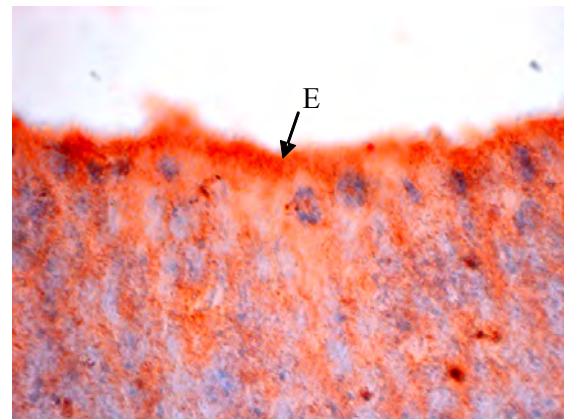
B) Knorpel, Wirbelsäule, 100x



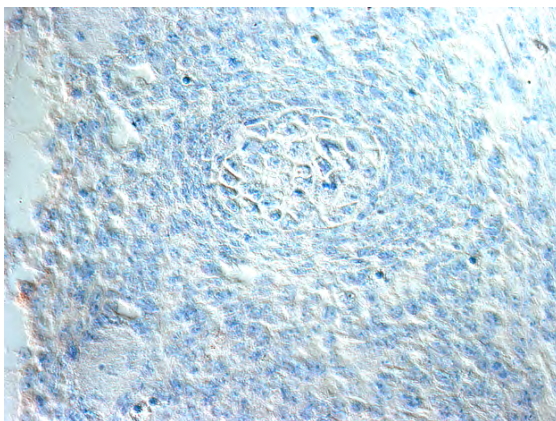
C) Gehirnventrikel, 20x



D) Gehirnventrikel, 100x



E) Knorpel Negativkontrolle, 40x



F) Gehirnventrikel Negativkontrolle, 100x

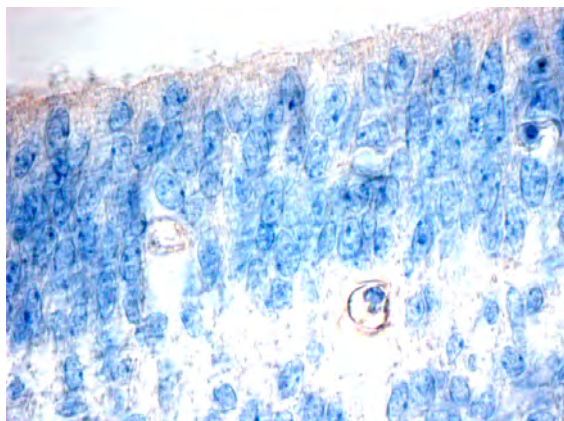


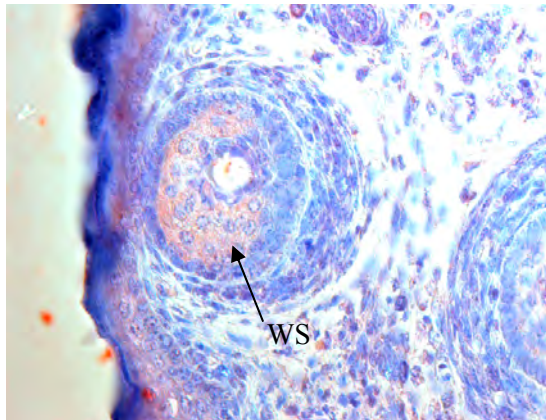
Abb. 6: Immunhistologischer Nachweis der Lokalisation von Mdg1-Protein in Knorpelzellen und im Gehirnventrikel am Tag 12 der Entwicklung

Die durch die immunhistologische Untersuchung mit dem Erstantikörper 2983 angefärbten positiven Bereiche stellen sich rotbraun dar. Im Bereich der Knorpelzellen ist das Zytoplasma rotbraun gefärbt. Die Ependymzellen zeigen ebenfalls eine zytoplasmatische Anfärbung. Die Zellkerne erscheinen durch Gegenfärbung mit Hämalaun blau.

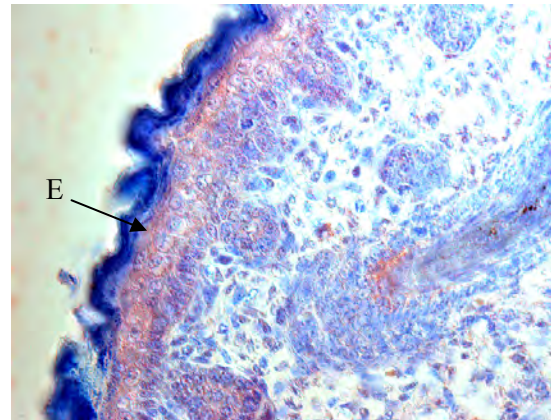
CH=Chondrozyt, E=Ependymzelle

Als drittes Stadium für die immunhistologische Untersuchung wurde Tag 18 der Entwicklung, der bei der Maus das Ende der Fetalperiode darstellt, gewählt. Ein schwach positives Signal wird in diesem Entwicklungsstadium in der Haut, vor allem in der Epidermis gefunden. Hier färbt sich besonders das Stratum spinosum an (Abb. 7 B). Des Weiteren kann Mdg1 zu diesem Zeitpunkt im Bereich der Wurzelscheiden der sich differenzierenden Haaranlagen nachgewiesen werden (Abb. 7 A).

A) Haar, 100x



B) Haut, 100x



C) Haut und Haare Negativkontrolle, 40x

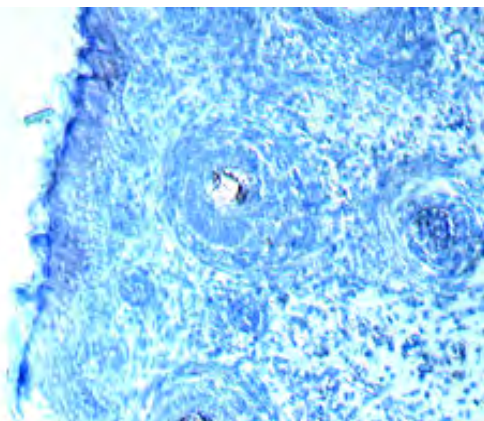


Abb. 7 : Immunhistologischer Nachweis der Lokalisation des Mdg1-Proteins in der Haut und den Haaren am Tag 18 der Entwicklung

Immunhistologische Anfärbung mit dem Erstantikörper 2983 und Gegenfärbung der Kerne mit Hämalaun.

Im Bereich der Haaranlagen sind die Wurzelscheiden rotbraun angefärbt, ebenso das Stratum spinosum im Bereich der Epidermis.

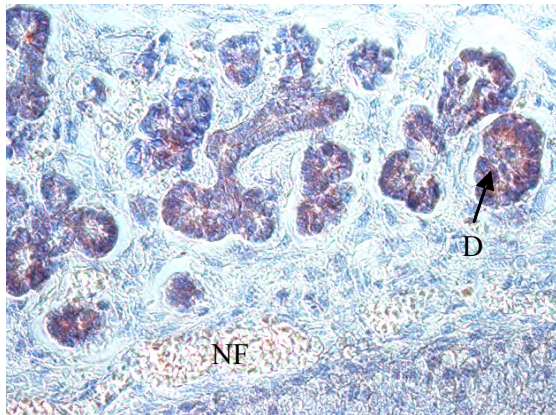
E=Epidermis, WS=Wurzelscheide

Im Bereich der Nasen- und der Nasennebenhöhlen kann das Mdg1-Protein im respiratorischen Epithel nachgewiesen werden (Abb. 8 D). Die Epithelzellen zeigen eine zytoplasmatisch lokalisierte rötliche Anfärbung, welche vor allem auf die apikalen Bereiche der Zellen beschränkt ist. In der Negativkontrolle ist ebenfalls eine leichte rötliche Anfärbung in den apikalen Zellanteilen erkennbar. Diese ist jedoch sehr gering und nimmt durch die Untersuchung mit dem Erstantikörper gegen Mdg1 deutlich zu. Das Zytoplasma der tubuloazinösen Drüsenzellen der Schleimhaut des Respirationstrakts ist ebenfalls positiv für Mdg1 (Abb. 8 A, B). Bei diesem Gewebe ist die Negativkontrolle lediglich blau angefärbt.

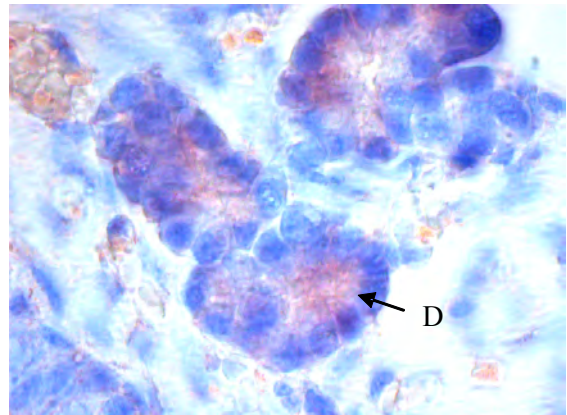
Positive Signale für das Mdg1-Protein sind in diesem Entwicklungsstadium weiterhin in den Epithelien der Zunge und des harten Gaumens zu beobachten (Abb. 9 A). Die Zungenpapillen sowie die Muskelfasern der Zunge weisen eine deutliche Mdg1-Lokalisation auf (Abb. 9 B, C). Im Bereich der Papillen ist Mdg1 vor allem im Bindegewebsstock nachweisbar. Das verhornte Epithel zeigt nur eine geringgradige Anfärbung. Die Negativkontrollen sind sowohl im Bereich der Zungenpapillen als auch im Bereich der Zungenmuskulatur lediglich blau angefärbt (Abb. 9 D, E).

In diesem Stadium der Entwicklung kann, im Gegensatz zu den vorher gezeigten, im neuroepithelialen Gewebe das Mdg1-Protein nicht nachgewiesen werden. Die am Tag 12 Mdg1-positiven Knorpelzellen weisen zu diesem Zeitpunkt ebenfalls keine Lokalisation von Mdg1 mehr auf, auch das Epithel des Darms ist zu diesem Zeitpunkt negativ.

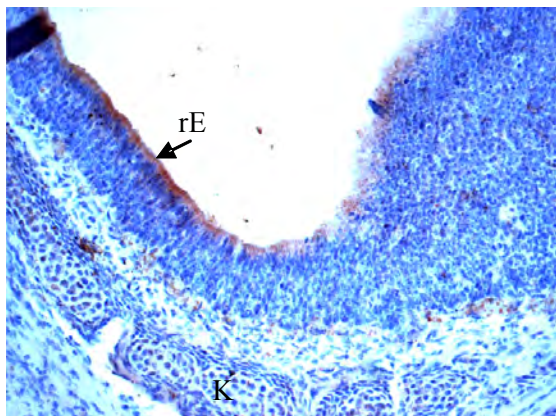
A) Drüsen der Nasenschleimhaut, 20x



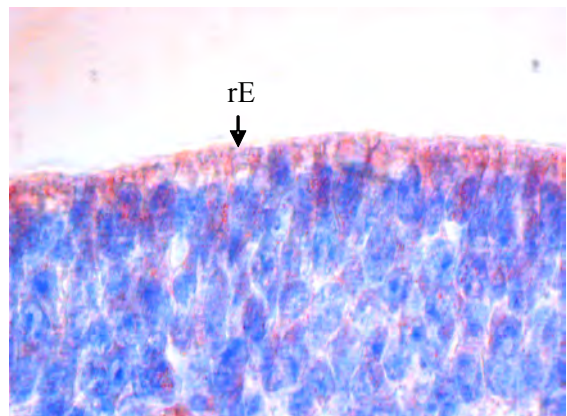
B) Drüsen der Nasenschleimhaut, 100x



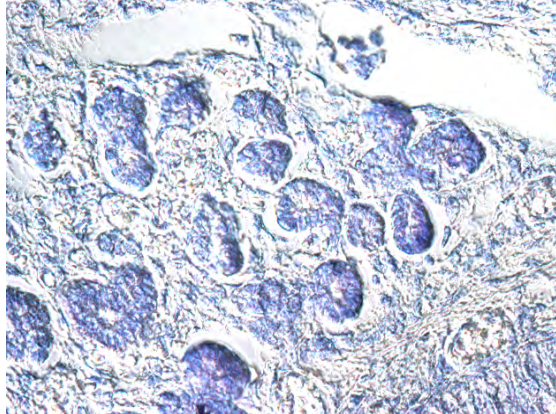
C) Nasennebenhöhle, 20x



D) Nasennebenhöhle, 100x



E) Drüsen Negativkontrolle, 20x



F) Nasennebenhöhle Negativkontrolle, 100x

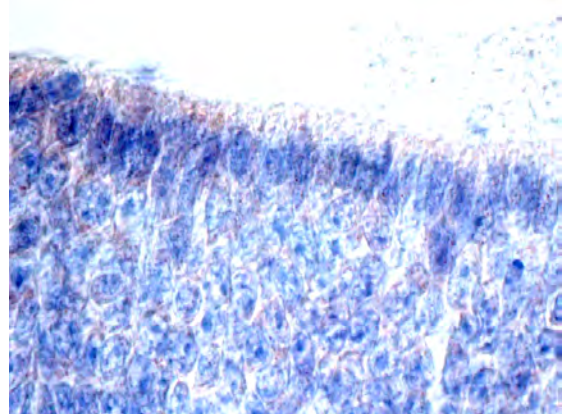


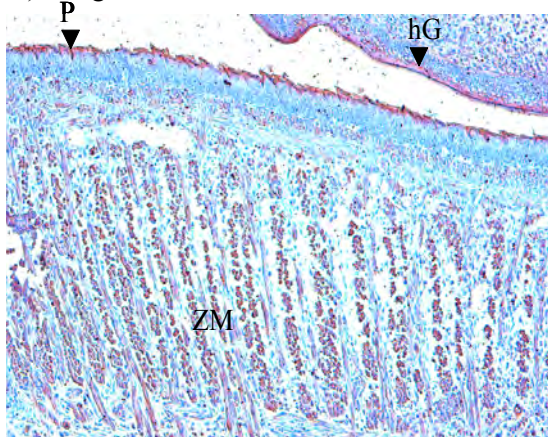
Abb. 8 : Immunhistologischer Nachweis der Lokalisation des Mdg1-Proteins in Nase- und Nasennebenhöhle am Tag 18 der Entwicklung

Immunhistologische Anfärbung mit dem Erstantikörper 2983 und Gegenfärbung der Kerne mit Hämalaun.

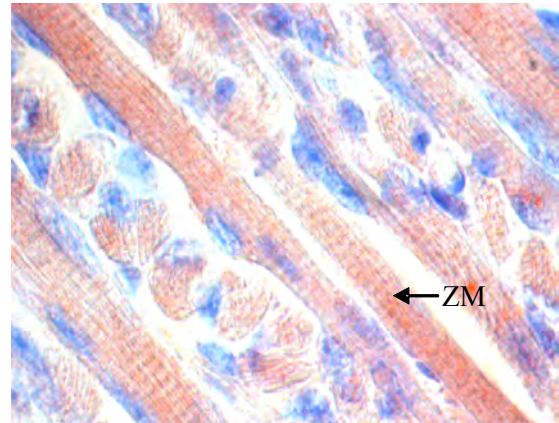
Die Drüsenzellen der Nasenschleimhaut zeigen zytoplasmatisch eine Mdg1-positive Anfärbung. Das Epithel der Nasennebenhöhle ist apikal positiv gefärbt.

D=seromuköse Drüse, NF=Nervenfaser, rE=respiratorisches Epithel, K=Knorpel

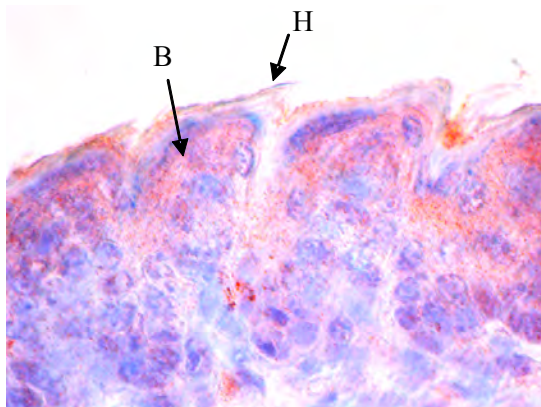
A) Zunge und Gaumen, 20x



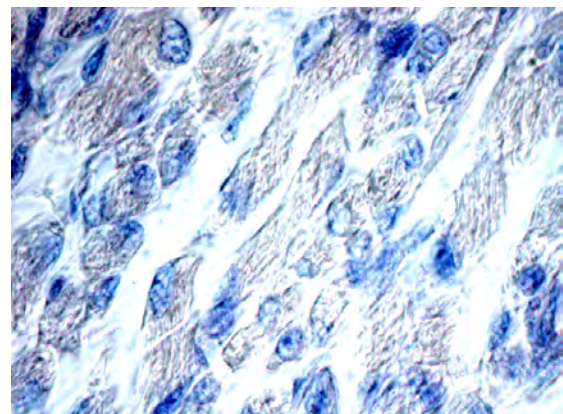
B) Zungenmuskulatur, 100x



C) Zungenpapillen, 100x



D) Zungenmuskulatur Negativkontrolle



E) Zungenpapillen Negativkontrolle

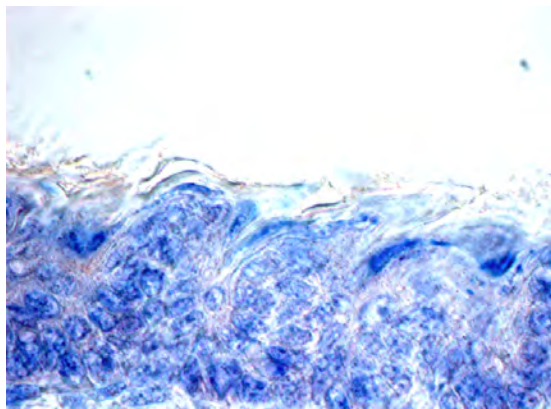


Abb. 9 : Immunhistologischer Nachweis der Lokalisation des Mdg1-Proteins in der Zunge am Tag 18 der Entwicklung

Immunhistologische Anfärbung mit dem Erstantikörper 2983 und Gegenfärbung der Kerne mit Hämalaun.

Die Zungenmuskulatur und die Zungenpapillen zeigen eine Mdg1-positive Anfärbung. Das Epithel des harten Gaumens ist ebenfalls rotbraun gefärbt.

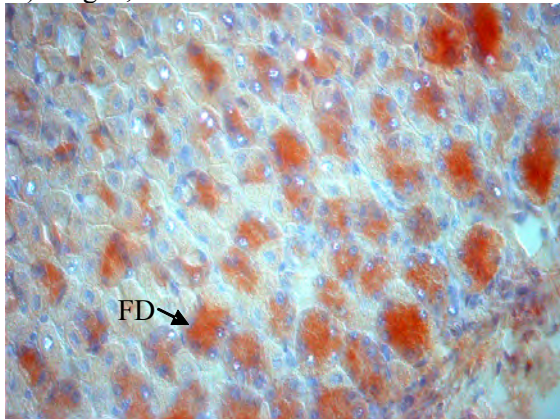
P=Zungenpapille, hG=harter Gaumen, ZM=Zungenmuskulatur, B=Bindegewebsstock, H=verhorntes Epithel

4.1.3 Immunlokalisation von Mdg1 im adulten Organismus

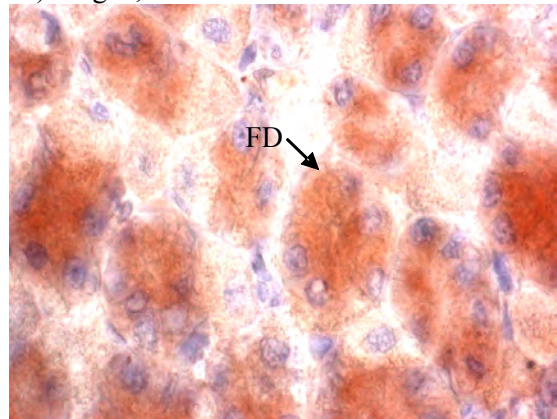
Eine stark positive Färbung als Nachweis für das Mdg1-Protein kann im Magen-Darm-Trakt adulter Mäuse gesehen werden. In der Magenschleimhaut findet sich das Protein vor allem in den tubulösen Fundusdrüsen (Abb. 10 A, B). Das Mdg1-Protein ist in diesen sekretorisch aktiven Drüsenzellen zytoplasmatisch lokalisiert, der Kern zeigt lediglich eine blaue Anfärbung, bedingt durch die Gegenfärbung mit Hämalaun. Die Schleimproduzierenden Zellen des Drüsenhalses zeigen keine Mdg1-Lokalisation, ebenso die Muskelschicht des Magens.

Im Bereich der Dünndarmzotten ist eine Mdg1-positive Färbung im einschichtigen Epithel nachweisbar. Hier sind die resorptionsaktiven Enterozyten rotbraun angefärbt. Diese Färbung ist im gesamten Zytoplasma der Zellen sehr gut zu erkennen (Abb. 10 D). Die Becherzellen sind ebenfalls positiv. Die Mdg1-positive Färbung ist auch hier im Zytoplasma zu finden, vor allem im apikalen und basalen Bereich der Zelle (Abb. 10 D). Die Becherzellen besitzen eine große Speichervakuole, welche sich nicht anfärbt und deshalb als ungefärbter rundlicher Bereich in der Zelle erkennbar ist. Durch diese Vakuole wird das Zytoplasma an den Rand der Zelle verdrängt. Die Krypten, die tubulöse Einsenkungen des Epithels in die Lamina propria darstellen, zeigen keine Mdg1-positive Anfärbung.

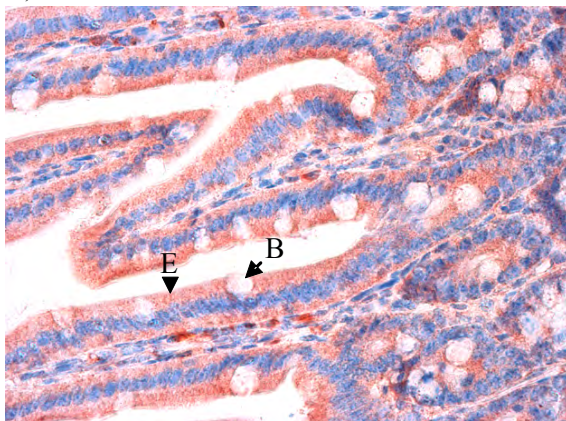
A) Magen, 40x



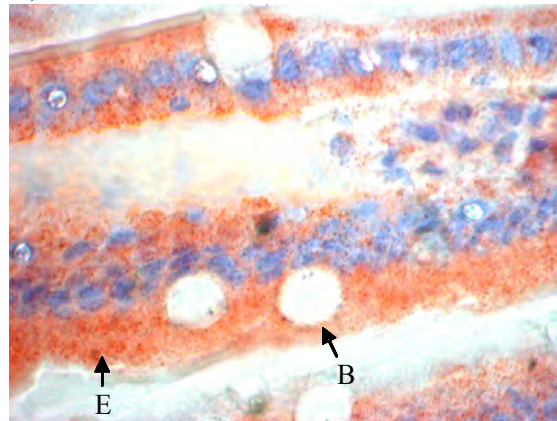
B) Magen, 100x



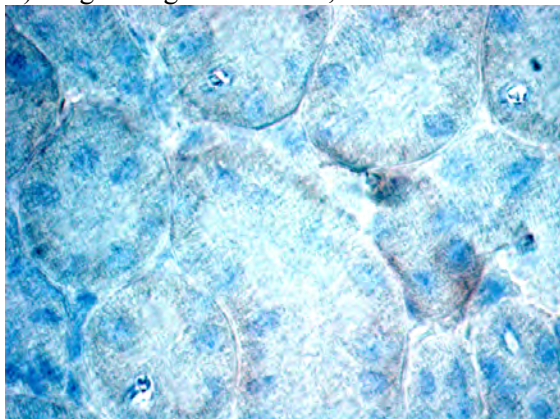
C) Darm, 40x



D) Darm, 100x



E) Magen Negativkontrolle, 100x



F) Darm Negativkontrolle, 100x

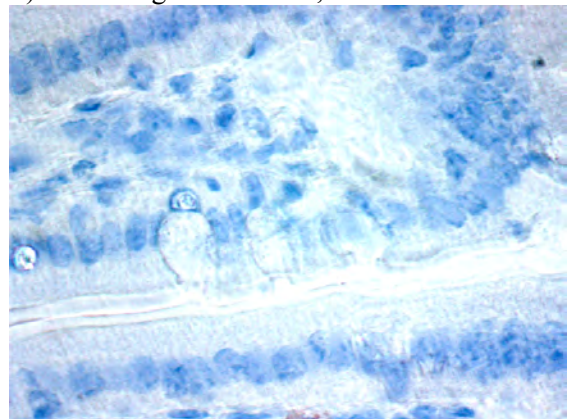
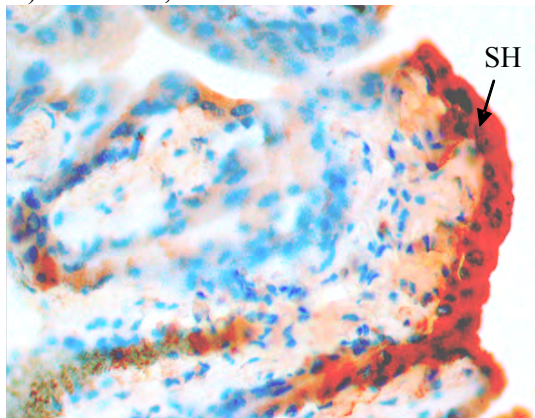


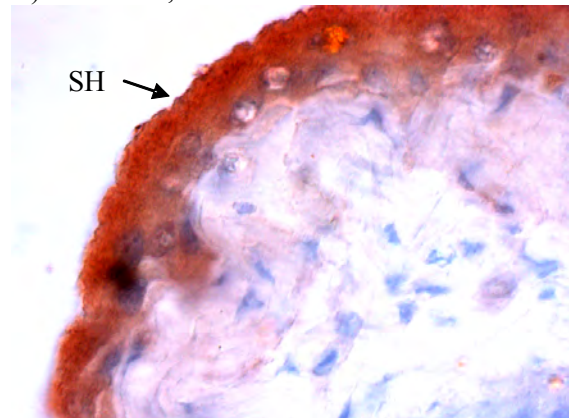
Abb. 10: Lokalisation des Mdg1-Proteins im Magen-Darm-Trakt der adulten Maus
 Immunhistologische Untersuchung mit dem Erstantikörper 2983 und Gegenfärbung der Kerne mit Hämalaun.
 Die rotbraune, positive Färbung ist vor allem in der Schleimhaut dieser Organe zu finden. Die Schleimhautzellen zeigen eine zytoplasmatische Lokalisation des Proteins.
 FD= Fundusdrüse, E= Enterozyt, B= Becherzelle

Außer im Magen-Darm-Trakt kann das Mdg1-Protein auch in der Harnblase der adulten Maus nachgewiesen werden. Positive Bereiche in der Harnblase sind dabei vor allem in der Schleimhaut und der Serosa zu finden. Die Schleimhaut weist nebeneinander gleichzeitig positive und negative Abschnitte auf. So zeigen einige Schleimhautfalten eine rotbraune Färbung, wogegen andere nicht angefärbt sind. Die Mdg1-positiven Signale befinden sich vor allem apikal, in den äußeren Schichten des mehrschichtigen Epithels (Abb. 11 A, B). Hier liegt auch die so genannte Crusta. Diese Schicht ist verdickt und wird durch subplasmalemmal gelegene Filamentbündel verstärkt. Dadurch bildet sie eine Schutzschicht gegen den hypertonen Harn.

A) Harnblase, 40x



B) Harnblase, 100x



C) Harnblase Negativkontrolle, 40x

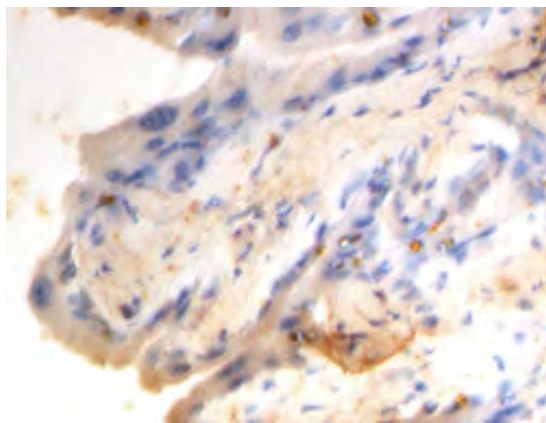


Abb. 11: Lokalisation des Mdg1-Proteins in der Harnblase der adulten Maus

Immunhistologische Untersuchung mit dem Erstantikörper 2983 und Gegenfärbung der Kerne mit Hämalaun.

Die rotbraune Färbung des Mdg1-Proteins ist im Bereich der Blasenschleimhaut nachweisbar.

SH=Schleimhaut

Vom Respirationstrakt wurde hier nur die Lunge untersucht. Dabei fällt auf, dass bereits die Negativkontrollen eine leichte rotbraune Färbung erkennen lassen. Jedoch sind die Organschnitte, welche mit dem Mdg1-spezifischen Antikörper 2983 inkubiert wurden, deutlicher rotbraun angefärbt. Aus diesem Grund lassen sich auch in der Lunge Mdg-positive Bereiche durch den Vergleich der Negativ- mit der Positivkontrolle nachweisen. In der Lunge findet sich das Mdg1-Protein vor allem in dem respiratorischen Epithel der Bronchiolen und Bronchioli (Abb. 12 A). Das Protein ist dabei besonders in den Flimmerzellen nachweisbar. Es ist in diesen Zellen im gesamten Zytoplasma lokalisiert (Abb. 12 G). Die Becherzellen zeigen keine oder nur eine geringgradige rötliche Färbung. Die Alveolen weisen im Bereich der Pneumozyten eine Mdg1-Lokalisation auf, wobei die Zellen auf Grund ihrer Form und Lage als Pneumozyten Typ II identifiziert werden (Abb. 12 E). Diese sekretorisch aktiven Zellen sind reich an Organellen. Durch Exozytose phospholipidhaltiger Granula bilden sie einen oberflächenaktiven Phospholipidfilm (Surfactant) aus.

Abb. 12: nächste Seite

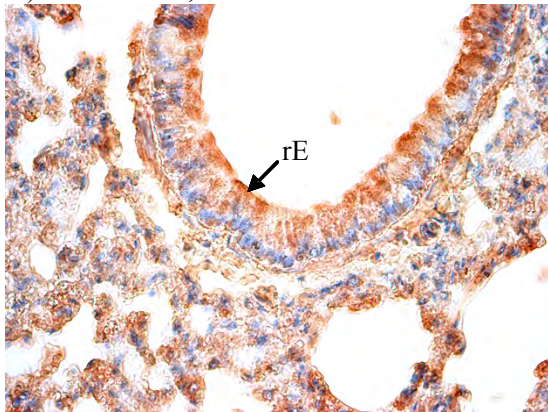
Lokalisation des Mdg1-Proteins in der Lunge der adulten Maus

Immunhistologische Untersuchung mit dem Erstantikörper 2983 und Gegenfärbung der Kerne mit Hämalaun.

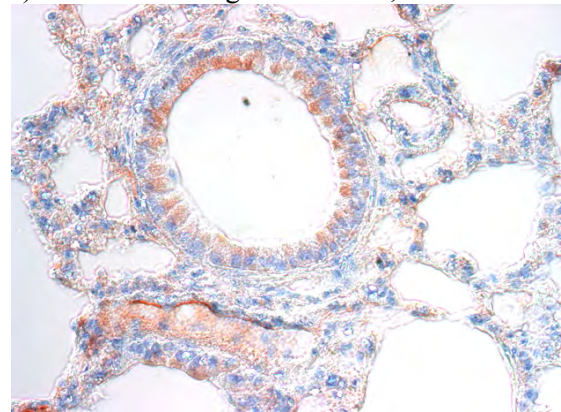
Das Mdg1-Protein kann vor allem in der respiratorischen Schleimhaut und den Pneumozyten Typ II nachgewiesen werden.

rE=respiratorisches Epithel , P=Pneumozyt Typ II, F=Flimmerzelle, B=Becherzelle

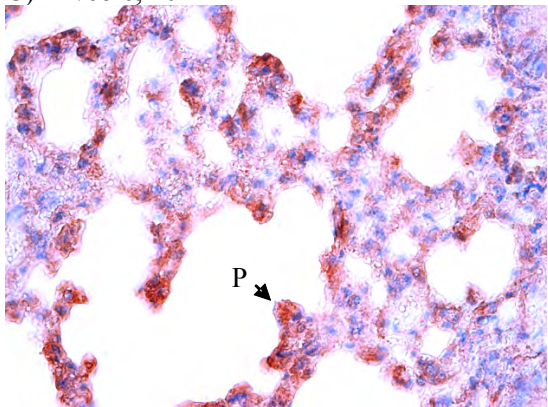
A) Bronchiolus, 20x



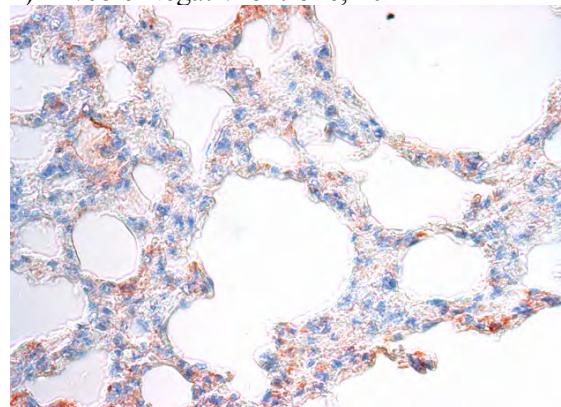
B) Bronchiolus Negativkontrolle, 20x



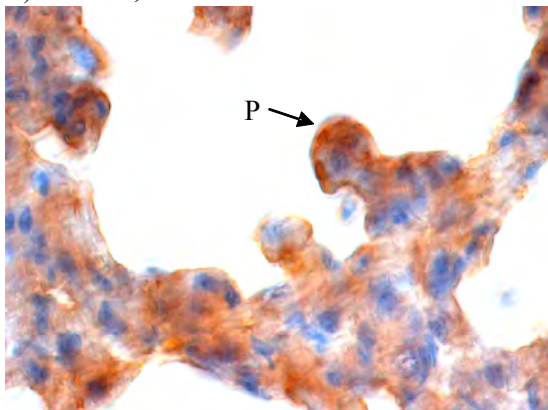
C) Alveole, 40x



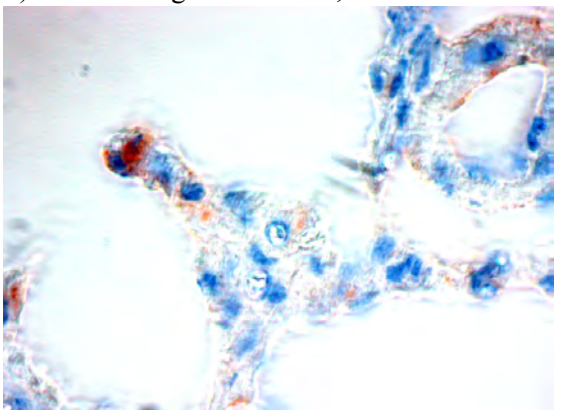
D) Alveole Negativkontrolle, 40x



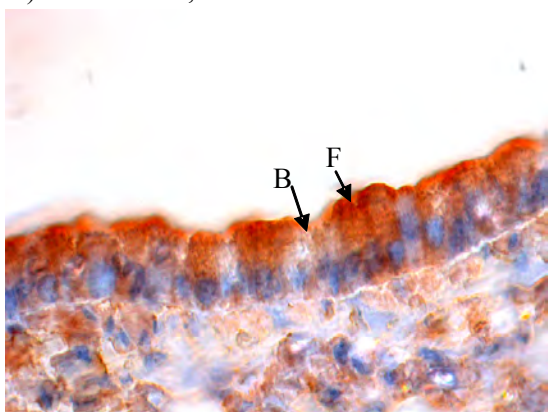
E) Alveole, 100x



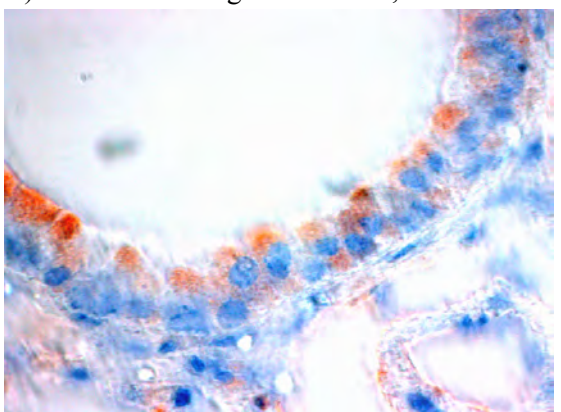
F) Alveole Negativkontrolle, 100x



G) Bronchiolus, 100x



H) Bronchiolus Negativkontrolle, 100x

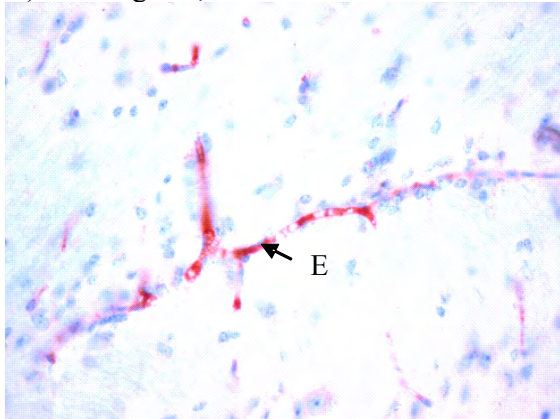


Im Gehirn lassen sich weder im Groß- noch im Kleinhirn Mdg1-positive Neuronen nachweisen. Lediglich in der Pia mater, welche das gesamte Gehirn umgibt, sowie in den Kapillaren im Gehirn, ist eine Mdg1-Lokalisation zu erkennen (Abb. 13 A, D). Die Anfärbung im Bereich der Kapillaren ist nicht homogen, sondern in stark positive und negative Endothelbereiche gegliedert (Abb. 13 A). Dabei kommen stark rotbraun gefärbte Gefäßabschnitte vor, welche von ungefärbten Bereichen unterbrochen werden. An der Gehirnoberfläche ist eine schmale durchgehende rotbraune Färbung erkennbar. Außerdem kann man eine fleckenartige, rotbraune Anfärbung im Bereich der Gehirnoberfläche erkennen (Abb. 13 C).

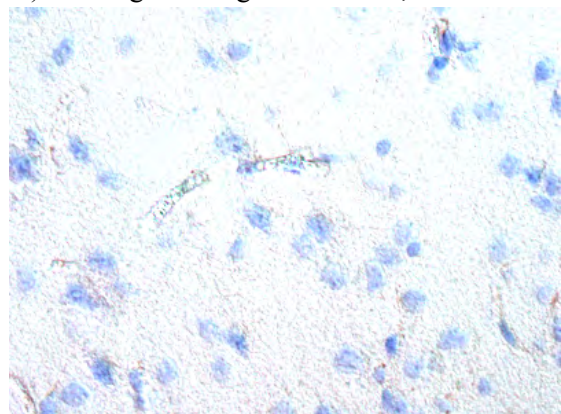
Im Bereich der Plazenta weisen die Trophoblastriesenzellen eine Lokalisation von Mdg1-Protein auf. Das Mdg1-Protein ist in diesen Zellen an der Plasmamembran lokalisiert und vor allem auf den lumennahen Bereich der Plazenta konzentriert (Abb. 14 C, D). Eine geringere rotbraune Anfärbung kann in der Nähe des Zellkerns beobachtet werden (Abb. 14 D). Daneben zeigt auch der viszerale Anteil des Dottersacks Mdg1-positive Signale, vor allem im Bereich der Dottersackgefäße (Abb. 14 C). Im maternalen Anteil der Plazenta kann keine Mdg1-Lokalisation nachgewiesen werden.

Die Schleimhaut des Eileiters, wie auch dessen Muskelschicht, lassen eine Mdg1-positive Anfärbung erkennen (Abb. 14 A). Diese ist im gesamten Zytoplasma der Zellen zu finden, zeigt jedoch vor allem im lumenwärtigen, apikalen Bereich der Zellen eine intensivere Färbung. Die Mdg1-positive Reaktion ist bei allen Zelltypen der Eileiterschleimhaut nachweisbar, das heißt in Drüsenzellen wie auch in Flimmerzellen (Abb. 14 B).

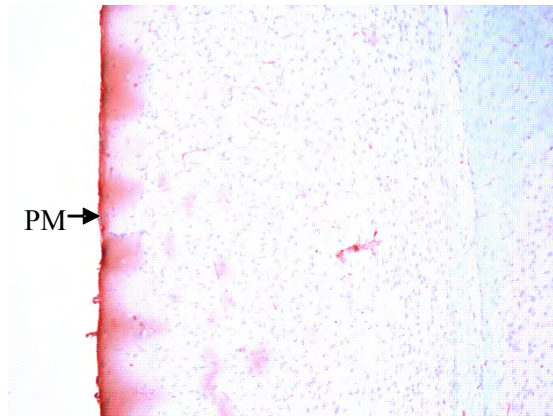
A) Gehirngefäß, 40x



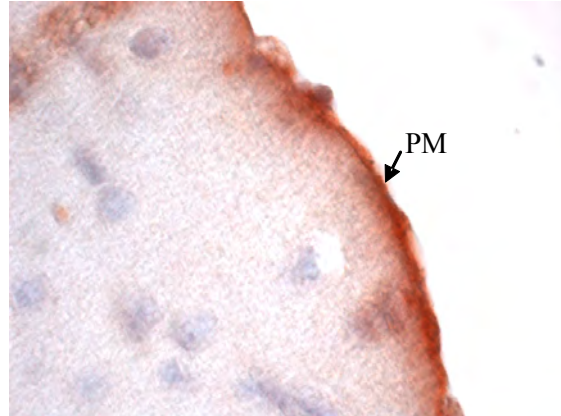
B) Gehirngefäß Negativkontrolle, 40x



C) Gehirn, 20x



D) Gehirn, 100x



E) Gehirn Negativkontrolle, 20x

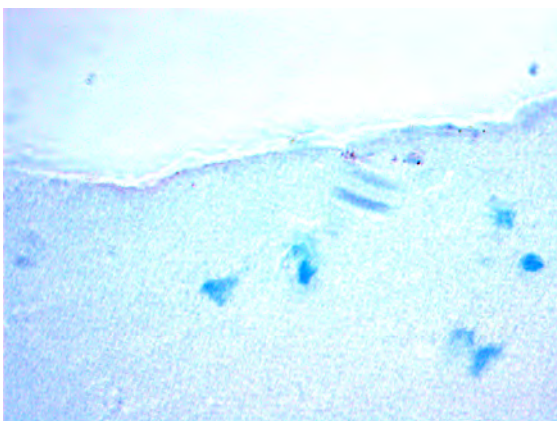
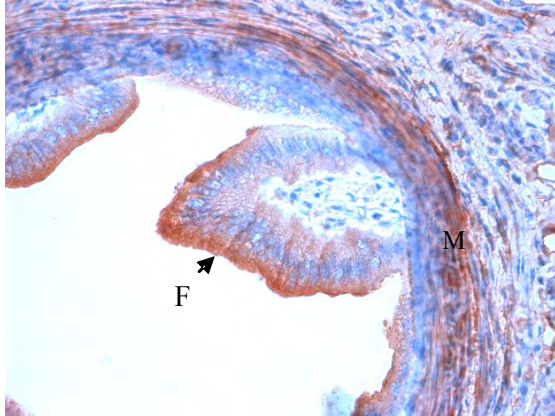


Abb. 13: Lokalisation von Mdg1-Protein in Gehirn und Gehirnkapillaren der adulten Maus
*Immunhistologische Untersuchung mit dem Erstantikörper 2983 und Gegenfärbung der Kerne mit Hämalaun.
Das Mdg1-Protein kann in der Pia mater und den Kapillaren nachgewiesen werden.
Im Bereich der Kapillaren sind positive und negative Abschnitte zu erkennen.
E=Endothel der Kapillaren, PM=Pia mater*

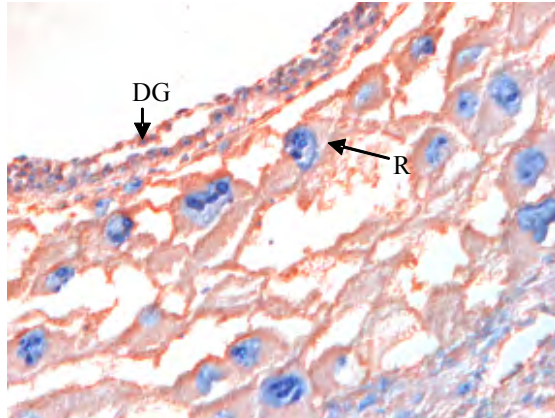
A) Eileiter, 20x



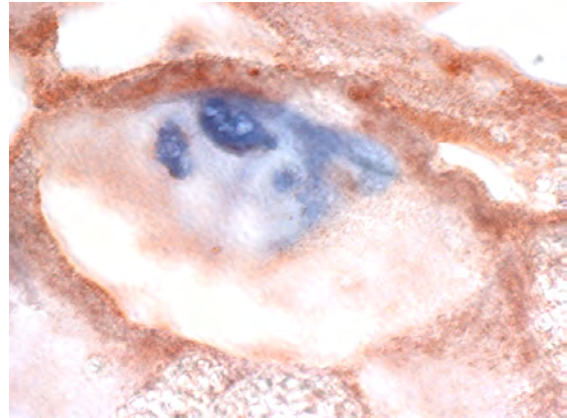
B) Eileiter, 100x



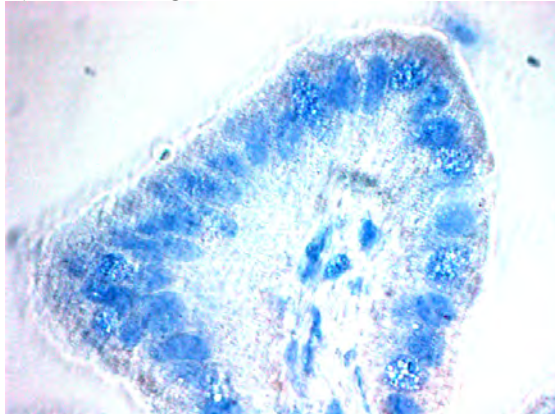
C) Plazenta, 40x



D) Trophoblastriesenzelle, 100x



E) Eileiter Negativkontrolle, 100x



F) Plazenta Negativkontrolle, 100x

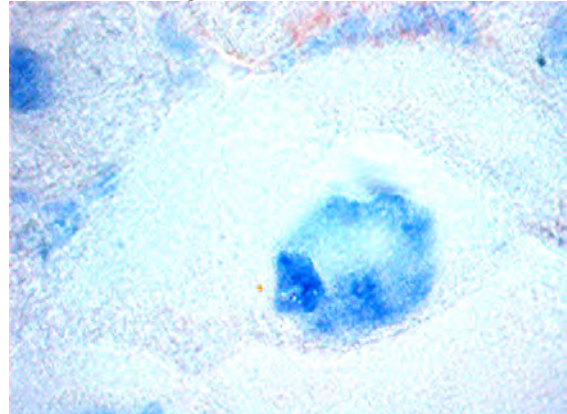
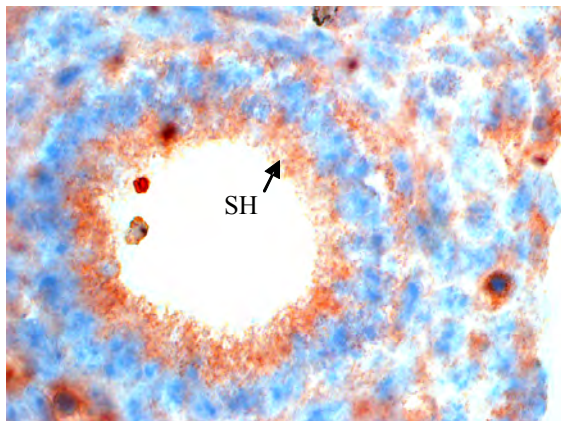


Abb. 14: Lokalisation des Mdg1-Proteins in den weiblichen Geschlechtsorganen
 Immunhistologische Untersuchung mit dem Erstantikörper 2983 und Gegenfärbung der Kerne mit Hämalaun.
 Das Mdg1-Protein kann in der Eileiterschleimhaut und den fetalen Bereichen der Plazenta nachgewiesen werden. Besonders die Dottersackgefäße und die Trophoblastriesenzellen weisen eine Mdg1-Lokalisation auf.
 F=Flimmerzelle, D=Drüsenzelle, M=Muskelschicht, DG=Dottersackgefäß, R=Trophoblastriesenzelle

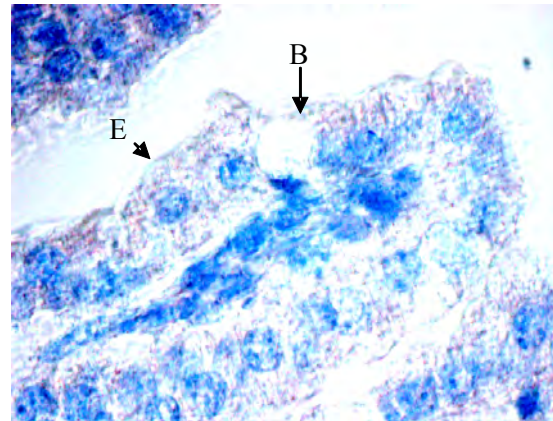
4.1.4 Vergleich der Organe zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten

Die Lokalisation von Mdg1 ist nicht gleichförmig in allen Organen und allen Entwicklungsstadien. Eine vom jeweiligen Funktionszustand des Organs und der Zellen abhängige Lokalisation des Proteins ist erkennbar. Dies soll an zwei Beispielen demonstriert werden. Da die Organogenese am Tag 9 der Embryogenese erst beginnt, kann dieses Entwicklungsstadium in die Betrachtungen nicht mit einbezogen werden. Die Vergleiche werden an Hand des Darms und der Knorpelzellen exemplarisch gezeigt.

A) Tag 12, 100x



B) Tag 18, 100x



C) adult, 100x

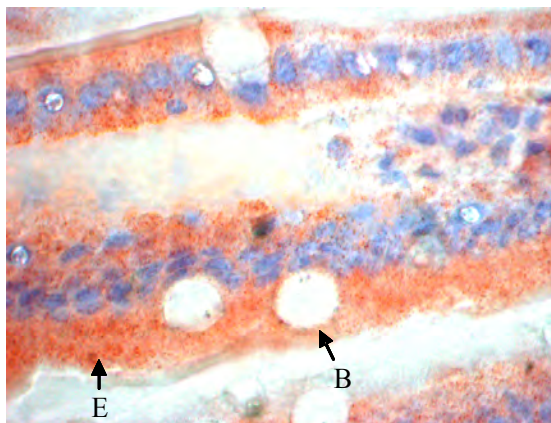


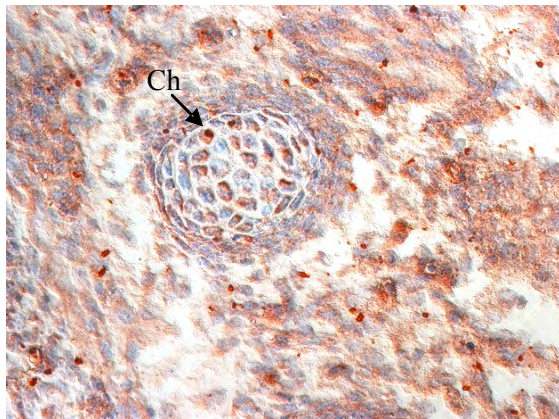
Abb. 15: Vergleich der Mdg1-Lokalisationen zu verschiedenen Zeitpunkten der Organogenese und im adulten Organismus am Beispiel des Darms

Anhand der rotbraunen Anfärbung des Mdg1-Proteins kann man dieses im Darm am Tag 12 und im adulten Organismus nachweisen. Am Tag 18 ist Mdg1 im Darm nicht vorhanden, es ist lediglich die blaue Färbung der Kerne zu sehen.
 SH=Schleimhaut, E= Enterozyt, B=Becherzelle

Im Bereich des Darms zeigt sich, dass die Mdg1-Lokalisation nicht kontinuierlich über alle Entwicklungsstadien nachweisbar ist. Am Tag 12 der Embryonalentwicklung ist eine Lokalisation in den Schleimhautzellen vorhanden, welche zytoplasmatisch, besonders in apikalen Bereichen, zu finden ist (Abb. 15 A). Diese ist am Tag 18 nicht mehr vorhanden. In diesem Stadium kann keine Lokalisation von Mdg1 in den Schleimhautzellen des Darms nachgewiesen werden (Abb. 15 B). Eine Mdg1-positive Anfärbung ist jedoch im Darm der adulten Maus wieder in den Zellen des Schleimhautepithels nachzuweisen. Dort ist das Mdg1-Protein im Zytoplasma der resorptionsaktiven Enterozyten und der Becherzellen zu finden (Abb. 15 C).

Als weiteres Beispiel soll die entwicklungsabhängige Mdg1-Lokalisation am Knorpel gezeigt werden. Auch hier ist am Tag 12 eine Lokalisation in den Chondrozyten nachweisbar. Dabei fällt jedoch auf, dass positive Zellen neben negativen Zellen liegen (Abb. 16 A). Die extrazelluläre Matrix des Knorpelgewebes ist nicht angefärbt. Mdg1 kann dagegen am Tag 18 in den Chondrozyten des Knorpels nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 16 B).

A) Tag 12, Wirbelsäule, 40x



B) Tag 18, Nasenknorpel, 40x



Abb. 16: Vergleich der Mdg1-Lokalisation zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung im Knorpelgewebe

Einige Chondrozyten zeigen am Tag 12 eine rotbraune Färbung. Daneben sind auch negative Chondrozyten zu finden. Am Tag 18 sind alle Chondrozyten negativ für Mdg1. Ch=Chondrozyt

4.2. Identifizierung der Proteindomänen, die die subzelluläre Lokalisation von Mdg1 kontrollieren

Das Mdg1-Protein besteht aus insgesamt 222 Aminosäuren. Im N-terminalen Bereich besitzt es eine hydrophobe Sequenz, welche 26 Aminosäuren umfasst. An diese schließt sich die J-Domäne an, wodurch das Protein den DnaJ-Proteinen zugeordnet wird. Diese Domäne ist hochkonserviert. Am C-terminalen Ende befinden sich die Aminosäuren Cystein, Serin, Glycin und Glutamin (CSGQ). Diese vier Aminosäuren sind möglicherweise eine Erkennungssequenz für Farnesylierung (CaaX-Motiv). Farnesylierung am C-Terminus spielt bei der Verankerung von Proteinen an biologischen Membranen eine Rolle.

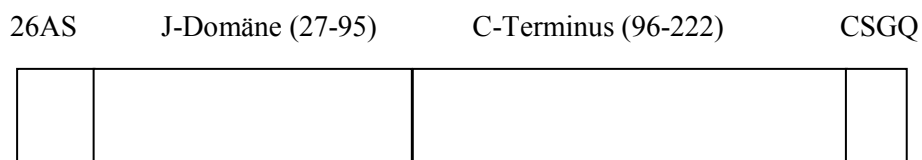


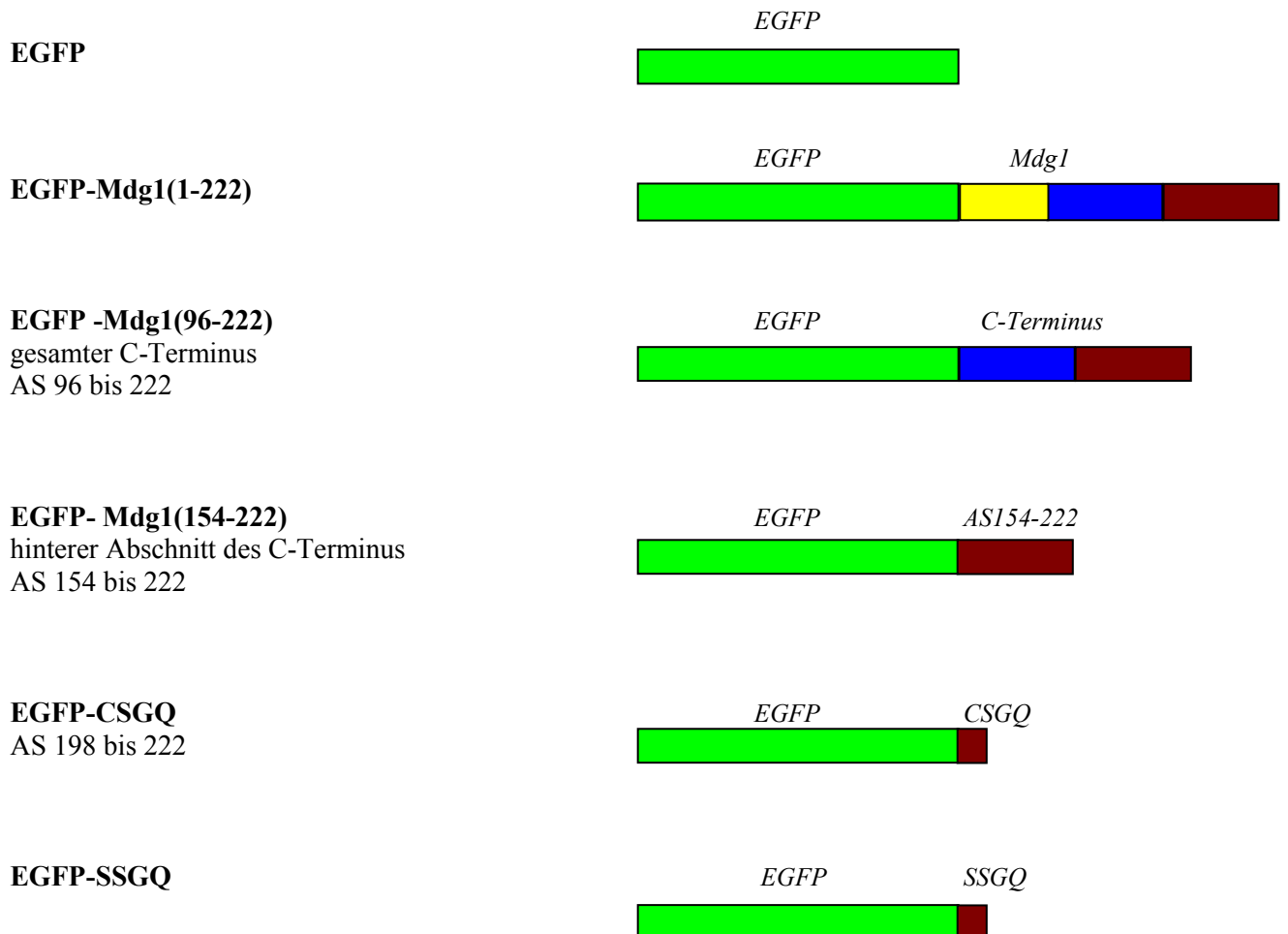
Abb. 17: schematische Darstellung des Mdg1-Proteins mit den N-terminalen hydrophoben 26 Aminosäuren, der J-Domäne und dem C-terminalen CSGQ

Es wurde bisher jedoch noch nicht gezeigt, ob Farnesylierung von Mdg1 stattfindet. Um die Relevanz einer möglichen Farnesylierung für die Proteinlokalisierung zu überprüfen, wurde der C-Terminus so verändert, dass bei der SSGQ-Mutante auf gar keinen Fall eine Methylierung stattfinden konnte. Weitere Deletionskonstrukte wurden hergestellt mit dem Ziel, die Proteindomänen zu identifizieren, welche sowohl für die subzelluläre Lokalisation wie auch den Kerntransport verantwortlich sind.

4.2.1 Verwendete Konstrukte

Um die subzelluläre Lokalisation des Mdg1-Proteins untersuchen zu können, wurden die entsprechenden Abschnitte des Mdg1 in einen Expressionsvektor kloniert, welcher die Sequenz für das grün fluoreszierende EGFP-Protein enthält. Für die Identifizierung der Proteindomänen, welche bei der Lokalisation von Mdg1 eine Rolle spielen, wurde die Nukleinsäure in verschieden große Teilbereiche zerlegt. Die verwendeten Konstrukte sind in der Abbildung 18 zusammengestellt.

N-terminale Lokalisation von EGFP:



C-terminale Lokalisation von EGFP:

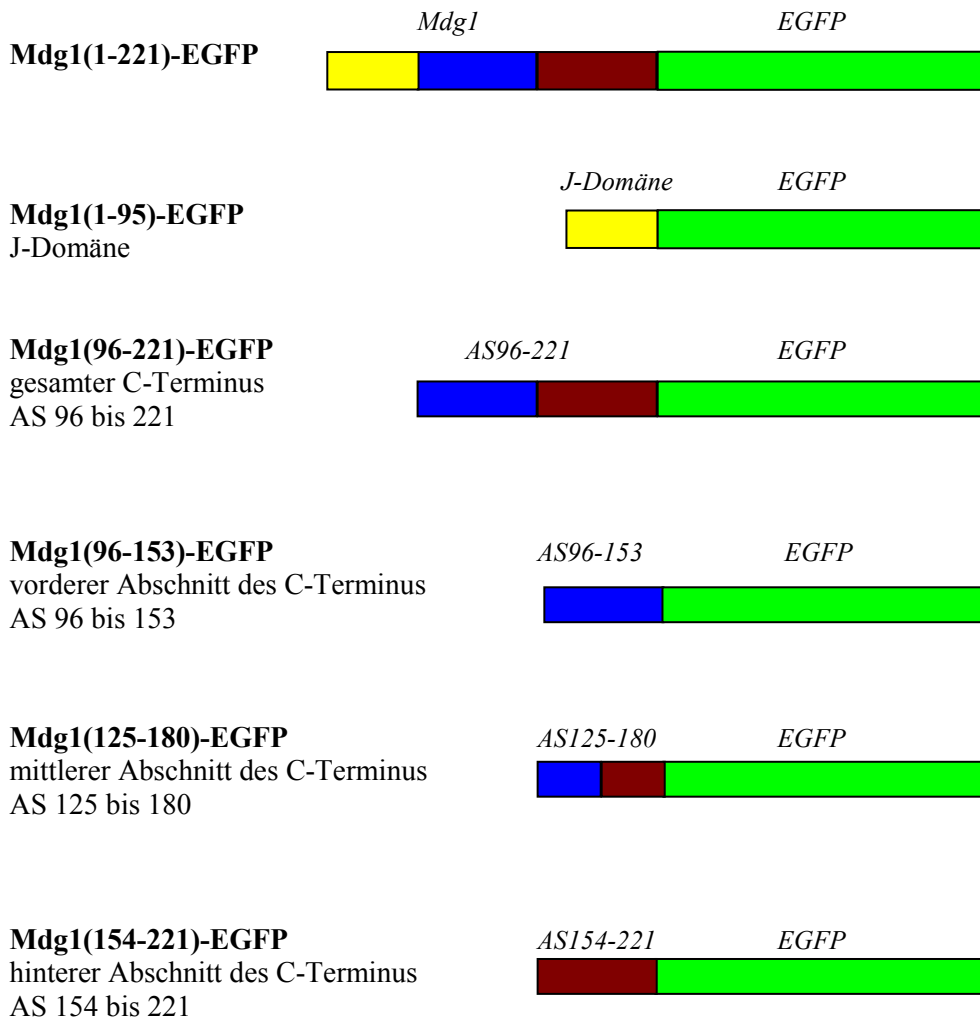


Abb. 18: Schematische Darstellung der Deletionskonstrukte des Mdg1

Grün: EGFP, Gelb: J-Domäne, Blau und Rot: C-Terminus, Blau: Aminosäurebereich 96 bis 153, Rot: Aminosäurebereich 154 bis 221 bzw. mit Stop-Codon bis 222
Klonierung der Mdg1-Bereiche vor bzw. hinter EGFP

4.2.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung

Um Aussagen über die subzelluläre Lokalisation des Mdg1-Proteins vornehmen zu können, wurde zunächst die fluoreszenzmikroskopische Methode verwendet. Mdg1 wurde dazu an das grün fluoreszierende EGFP fusioniert und seine subzelluläre Lokalisation mittels Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Die Verwendung von EGFP-Mdg1-Fusionskonstrukten setzt jedoch voraus, dass das 25 kD große EGFP die Verteilung des Mdg1-Proteins in der Zelle nicht behindert oder beeinflusst. Um diese Gefahren zu minimieren, wurden viele der nachfolgenden Experimente mit Konstrukten durchgeführt, bei denen Mdg1 sowohl C- als auch N-terminal an EGFP fusioniert war. Außerdem wurde die Lokalisation des EGFP innerhalb der Zelle unter Kontrollbedingungen und nach Hitzeschock überprüft, um zu sehen, ob EGFP selbst in einem Zellkompartiment angereichert oder gleichmäßig über die ganze Zelle verteilt ist.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Zellen zeigen, dass EGFP sowohl bei 37°C als auch nach Hitzeschock gleichmäßig innerhalb der Zelle verteilt ist und keine Lokalisationsänderung durch Temperaturwechsel aufweist (Abb. 19). Somit eignet sich dieses Protein für die Lokalisationsstudien.

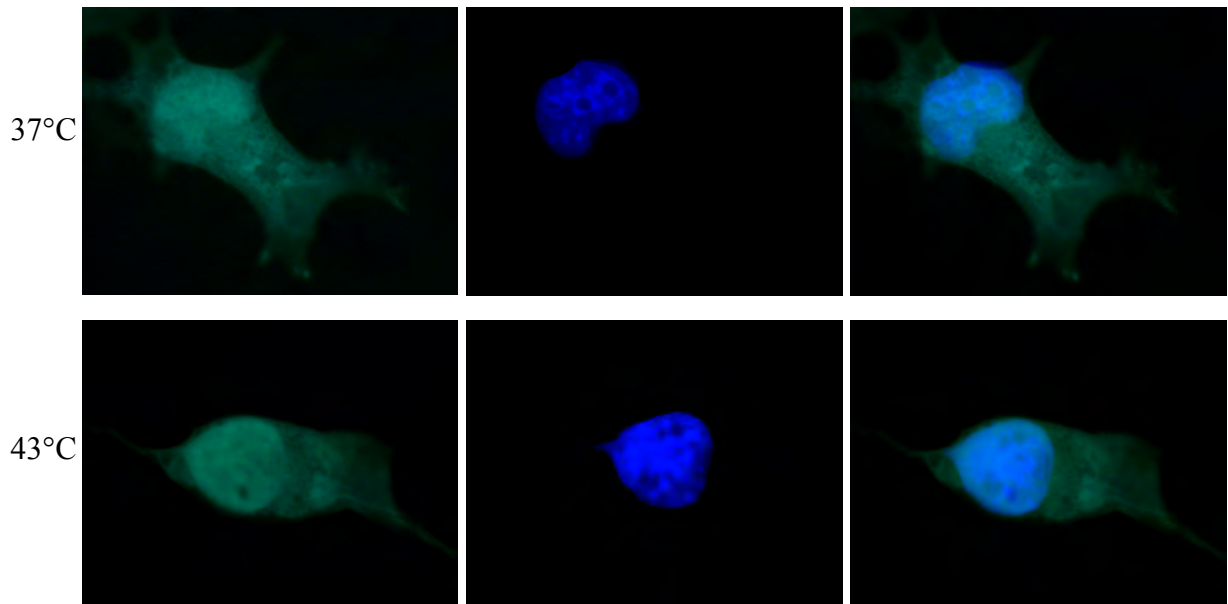
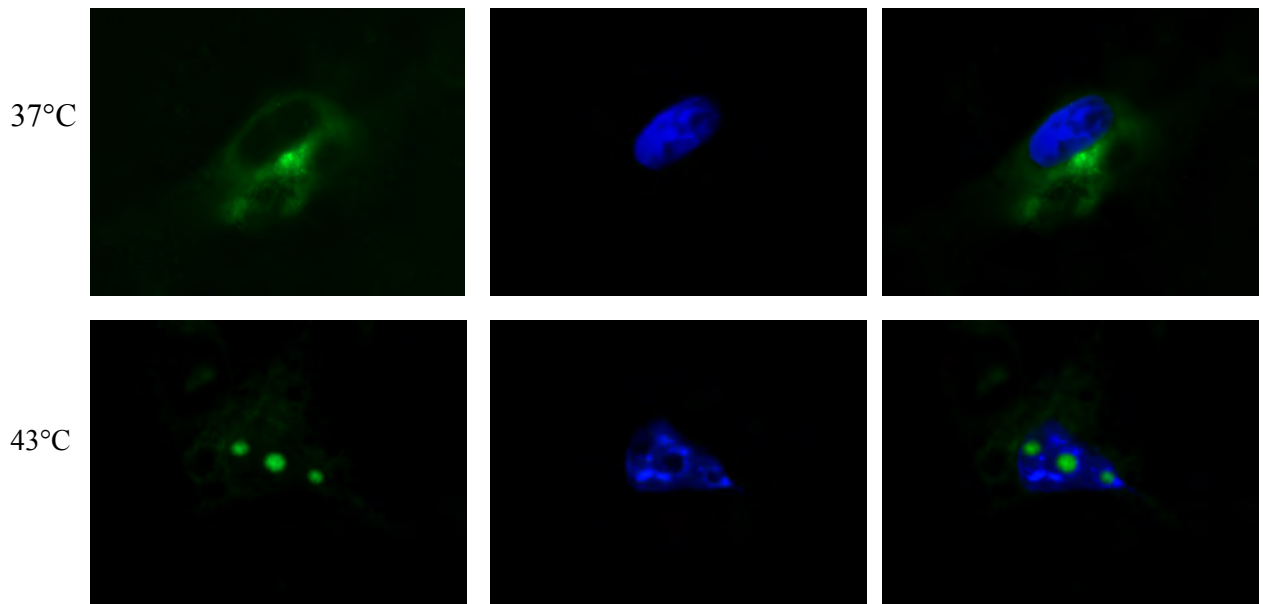


Abb. 19: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisation von EGFP
 COS7-Zellen wurden mit dem Expressionsvektor transfiziert und bei 37°C (oben) und 43°C (unten) inkubiert.
 Links: grüne Fluoreszenz des EGFP
 Mitte: Kernfärbung mit Bisbenzimidazole; die Nukleoli sind gut an den schwarzen Bereichen innerhalb des Kerns zu erkennen
 Rechts: Übereinanderlagerung der beiden Bilder

Zunächst wurde das gesamte Mdg1 an EGFP fusioniert, wobei EGFP einmal N-terminal (EGFP-Mdg1(1-222)) und einmal C-terminal (Mdg1(1-221)-EGFP) vorlag (Abb. 18). Bei Mdg1(1-221)-EGFP liegt der N-Terminus frei vor, wodurch die Rolle der N-terminalen 26 AS untersucht werden kann. Diese Sequenz ist hydrophob, weshalb eine Interaktion mit Membranen wahrscheinlich ist. Das Konstrukt EGFP-Mdg1(1-222) hat eine frei vorliegende C-terminale Region und dient damit der Untersuchung des Einflusses von CSGQ auf die subzelluläre Lokalisation. CSGQ kann möglicherweise farnesyliert werden und somit zur Interaktion mit Membranen und anderen Proteinen beitragen. Dazu muss diese Sequenz jedoch frei vorliegen.

A) Mdg1(1-221)-EGFP



B) EGFP-Mdg1(1-222)

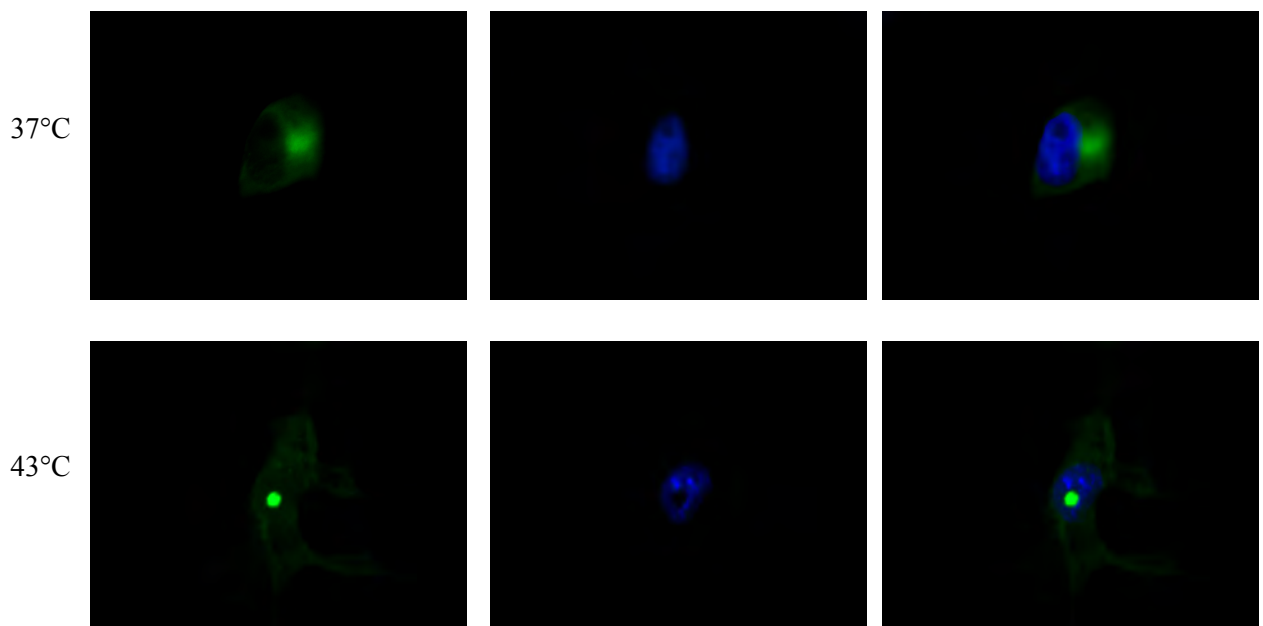


Abb. 20: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisation des Mdg1-Proteins
 COS7-Zellen wurden mit dem entsprechenden Konstrukt transfiziert und bei 37°C inkubiert. Die Kerne wurden mit Bisbenzimidie angefärbt und die Zellen fixiert. Anschließend erfolgte die Betrachtung der Zellen im Fluoreszenzmikroskop. Die grüne Fluoreszenz, welche die Lokalisation des Mdg1-Fusionsproteins anzeigt, ist bei 37°C an einer dem Zellkern benachbarten Struktur erkennbar. Nach Hitzeschock ist diese in den Nucleoli zu finden. Die blaue Fluoreszenz entspricht der Lokalisation des Zellkerns. Durch Übereinanderlagerung der Bilder kann die Lokalisation des Mdg1-Fusionsproteins besser bestimmt werden.

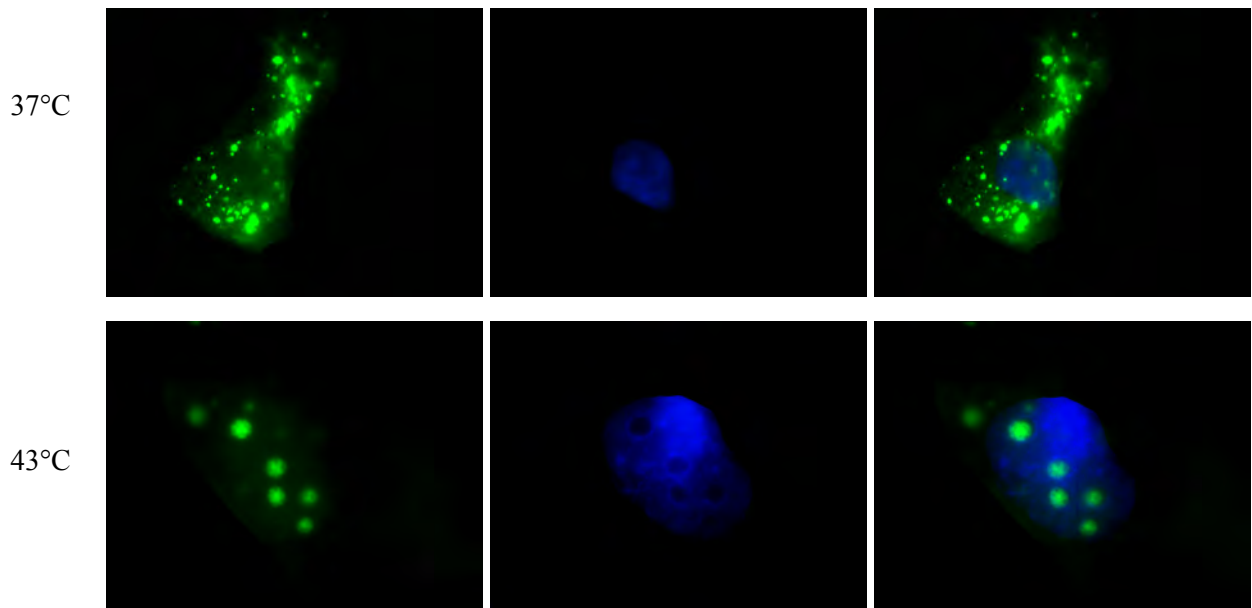
Bei 37°C zeigen beide Proteine eine zytosolische, retikuläre Verteilung. Dieses retikuläre Muster weist auf eine ER-Lokalisation der Proteine hin. Der Zellkern enthält deutlich weniger Mdg1-EGFP-Fusionsprotein. Nach Hitzeschock sind die Proteine beider Konstrukte in den Zellkernen zu finden, wobei man eine nukleoläre Akkumulation beobachten kann (Abb. 20). Die subzelluläre Lokalisation bei 37°C und bei 43°C ist bei beiden Proteinen identisch. Offensichtlich wird die subzelluläre Lokalisation von Mdg1 sowohl vom N- als auch vom C-Terminus bestimmt, wobei es auszureichen scheint, wenn eine der beiden Domänen frei zugänglich ist. Es ist aber auch möglich, dass die Lokalisationsdomänen unabhängig von der Position des Fusionsproteins funktionieren.

Um die Proteindomänen, die für diese charakteristische Lokalisation des Mdg1-Proteins innerhalb der Zelle bei 37°C und bei 43°C verantwortlich sind, zu identifizieren, wurde zunächst das Mdg1-Protein in seine Hauptdomänen, die J-Domäne und den C-Terminus, aufgeteilt. Hierzu wurde die 68 Aminosäuren umfassende J-Domäne vor EGFP kloniert und der C-Terminus entweder in den Vektor pEGFP-C1 oder den Vektor pEGFP-N3 ligiert, je nachdem, ob sich EGFP C- oder N-terminal der Mdg1-Sequenz befinden sollte [Mdg1(96-221)-EGFP, EGFP-Mdg1(96-222), siehe Abb. 18].

Das Konstrukt, welches lediglich die J-Domäne -fusioniert an EGFP- enthielt, zeigte sich als Letalfaktor für die Zellen. Nach einer Inkubation für 16 bis 18 Stunden bei 37 °C waren alle Zellen tot.

Die beiden Konstrukte, die nur den C-Terminus von Mdg1 enthalten [Mdg1(96-221)-EGFP und EGFP -Mdg1(96-222)], liegen bei 37°C in Aggregaten in der Zelle vor. Dabei ist EGFP-Mdg1(96-222) nicht im Zellkern zu finden, und die Anzahl der Aggregate ist deutlich geringer als bei dem anderen Konstrukt (Abb. 21 B). Nach Hitzeschock sind beide Fusionsproteine in den Nukleoli zu finden, wobei bei Mdg1(96-221)-EGFP die Nukleoli kleiner erscheinen als bei dem Konstrukt EGFP-Mdg1(96-222) (Abb. 21 A, B).

A) Mdg1(96-221)-EGFP



B) EGFP- Mdg1(96-222)

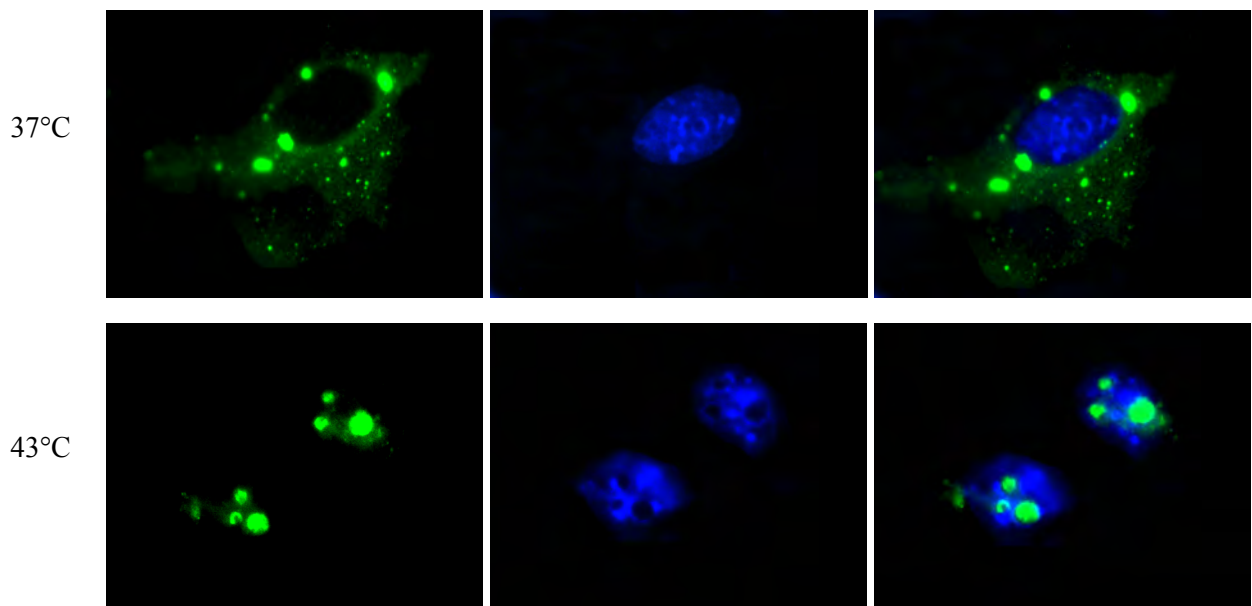


Abb. 21: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisation von Mdg1(96-221)-EGFP und EGFP-Mdg1(96-222)

COS7-Zellen wurden mit dem entsprechenden Konstrukt transfiziert. Anschließend erfolgte die Betrachtung der Zellen im Fluoreszenzmikroskop.

Beide Konstrukte des gesamten C-Terminus zeigen bei 37°C eine Verteilung in kleinen rundlichen Strukturen über die Zelle, welche an der grünen Fluoreszenz zu erkennen ist. EGFP-Mdg1(96-222) kommt dabei nicht im Zellkern vor. Nach Hitzeschock sind beide Proteine in den Nukleoli lokalisiert. Die Zellkerne sind durch Gegenfärbung mit Bisbenzimid angefärbt und an der blauen Fluoreszenz erkennbar.

Da der C-Terminus von Mdg1 offenbar alle notwendigen Informationen für die subzelluläre Lokalisation des Proteins nach Hitzeschock enthält, wurde anschließend der C-Terminus näher analysiert. Aus Datenbanken konnte kein Hinweis auf die Anwesenheit bekannter Domänen gefunden werden, außer der Sequenz CSGQ, welche eine putative Farnesylierungssequenz darstellt. Die weitere Deletion des C-Terminus in Konstrukte aus jeweils etwa 60 Aminosäuren sollte mehr Aufschluss über die Domänen geben (Abb. 18).

Bei 37°C sind alle Fusionsproteine dieser Deletionskonstrukte gleichmäßig innerhalb der Zelle verteilt. Die zuvor gesehene retikuläre Verteilung kann mit diesen Konstrukten nicht mehr erzielt werden (Abb. 22). Nach einer Stunde bei 43°C sind sowohl Mdg1(96-153)-EGFP als auch Mdg1(154-221)-EGFP im Zellkern zu finden. Eine Assoziation mit den Nukleoli ist bei diesen Proteinen nachweisbar (Abb. 22), wobei die Fluoreszenz eine geringere Intensität zeigt als bei den beiden Konstrukten, welche Mdg1(96-222) enthalten. Mdg1(125-180)-EGFP zeigt auch nach Hitzeschock eine gleichmäßige Verteilung über die gesamte Zelle, wie bei 37°C. Eine Assoziation mit dem Zellkern und den Nukleoli ist bei diesem Protein nicht zu finden (Abb. 22).

Die Information für die Lokalisation im Zellkern nach Hitzeschock muss demnach in den Aminosäuresequenzen 96-125 und 180-222 enthalten sein.

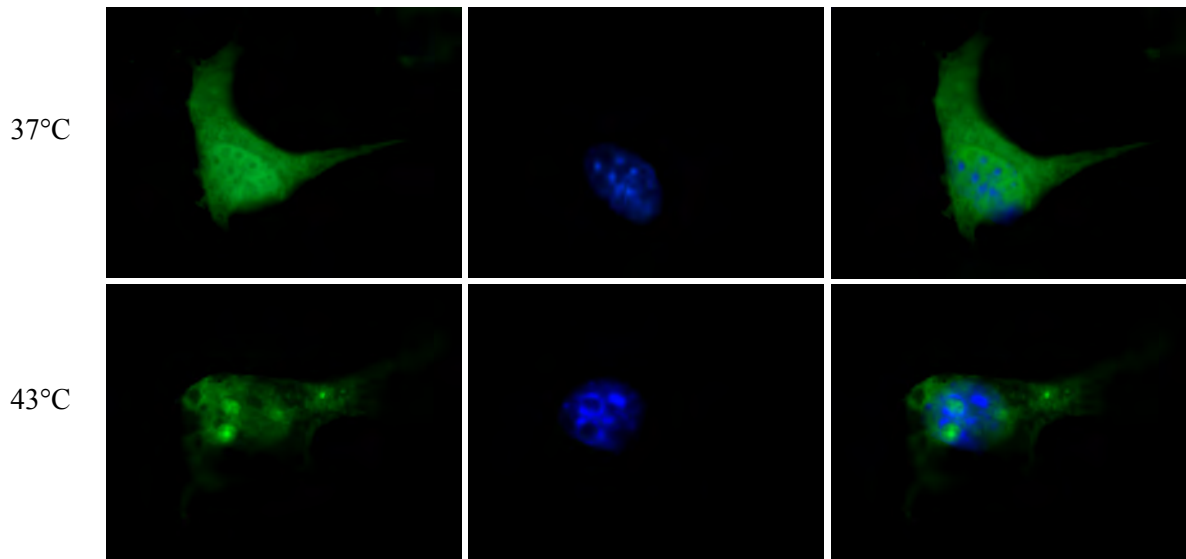
Abb. 22: (nächste Seite)

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisation der etwa 60 AS umfassenden Teilabschnitte des C-Terminus von Mdg1

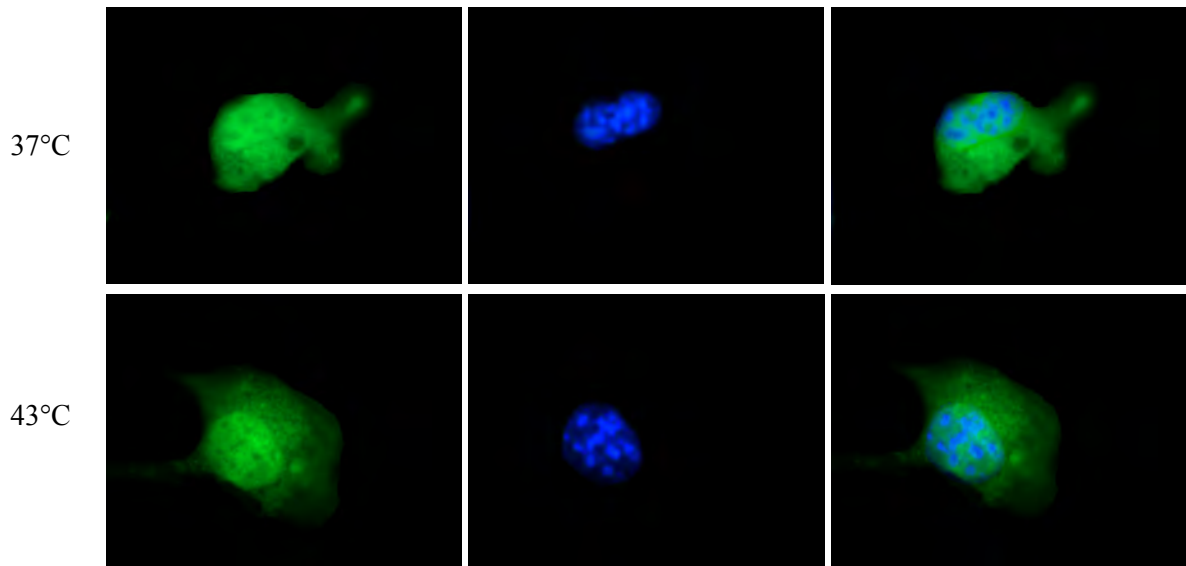
COS7-Zellen wurden mit dem entsprechenden Konstrukt transfiziert. Die Kerne wurden mit Bisbenzimid angefärbt und sind an der blauen Fluoreszenz zu erkennen. Anschließend wurden die Zellen fixiert und fluoreszenzmikroskopisch betrachtet.

Bei 37°C ist die grüne Fluoreszenz aller Fusionsproteine gleichmäßig innerhalb der Zelle verteilt. Bei 43°C können Mdg1(96-153)-EGFP und Mdg1(154-221)-EGFP in den Zellkernen und Nukleoli nachgewiesen werden. Mdg1(125-180)-EGFP zeigt diese Lokalisation nicht. Dieses Protein ist auch bei 43°C über die gesamte Zelle verteilt.

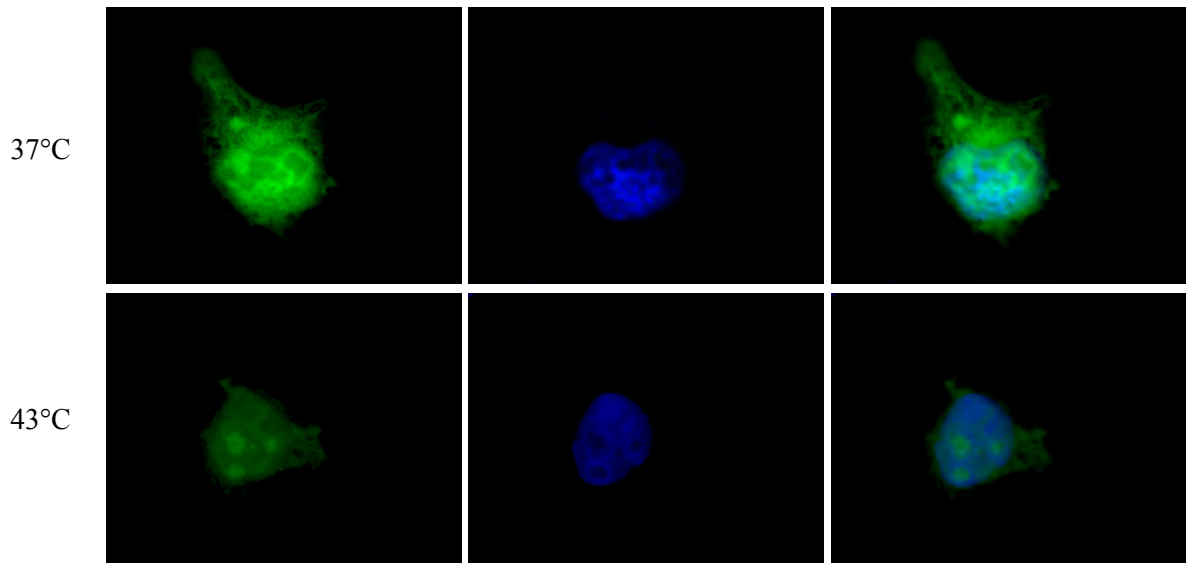
A) Mdg1(96-153)-EGFP



B) Mdg1(125-180)-EGFP

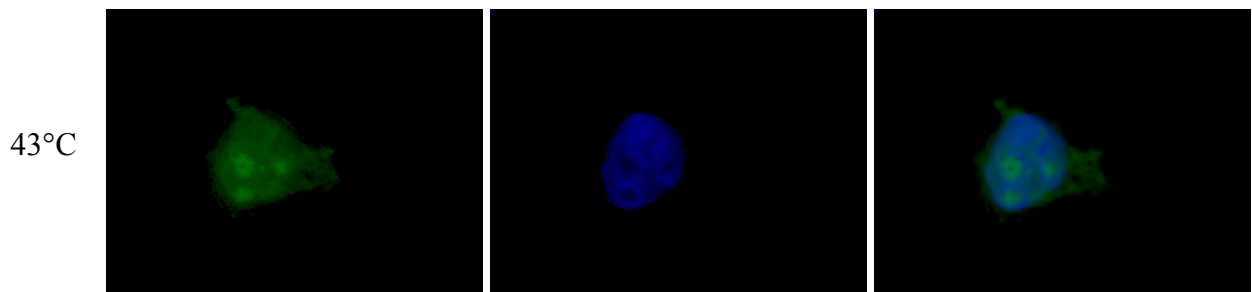


C) Mdg1(154-221)-EGFP



In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob die C-terminal gelegene Sequenz CSGQ, welche eine mögliche Farnesylierungssequenz darstellt, eine Rolle bei der Translokation in den Zellkern oder der nukleolären Assoziation spielt. Dazu wurde die Lokalisation von Mdg1(154-221)-EGFP mit jener von EGFP-Mdg1(154-222) bei 43°C verglichen. In Abb. 23 kann man erkennen, dass beide Konstrukte nach Hitzeschock in den Nukleoli zu finden sind. Die Fluoreszenz ist jedoch bei EGFP-Mdg1(154-222) deutlich stärker.

A) Mdg1(154-221)-EGFP



B) EGFP-Mdg1(154-222)

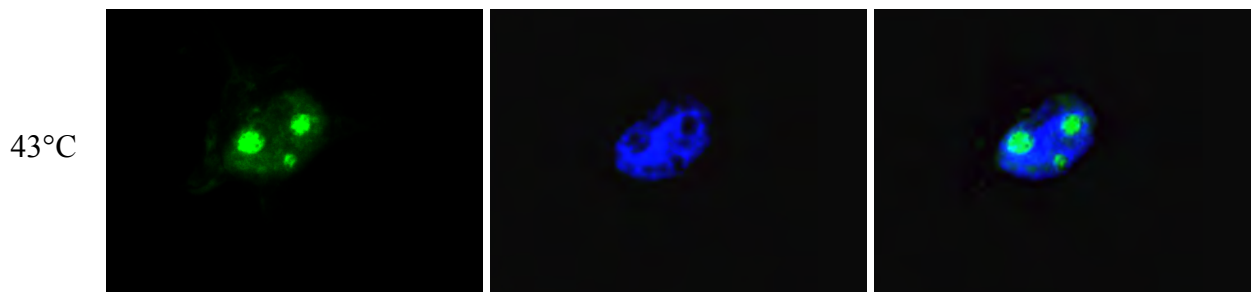


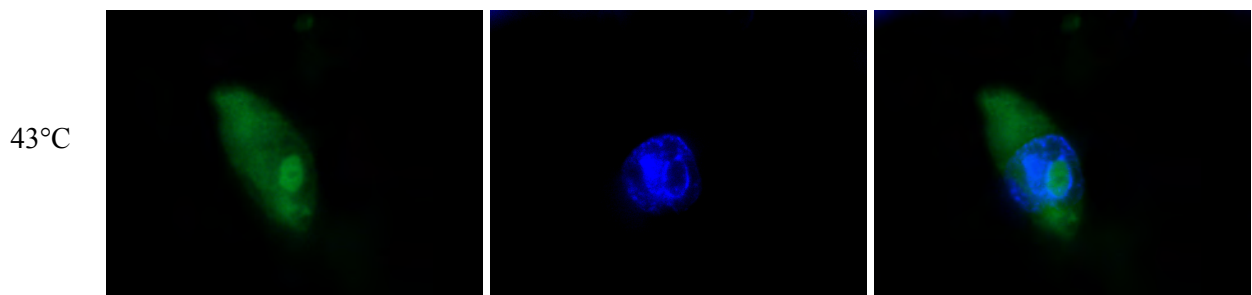
Abb. 23: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisation von EGFP-Mdg1(154-222) nach Hitzeschock

COS7-Zellen wurden mit dem entsprechenden Konstrukt transfiziert. Die Kerne wurden mit dem blau fluoreszierenden Bisbenzimidazol angefärbt, anschließend die Zellen fixiert und fluoreszenzmikroskopisch betrachtet.

Beide Fusionsproteine liegen bei 43°C in den Nukleoli vor und sind gut an der grünen Fluoreszenz zu erkennen, welche bei EGFP-Mdg1(154-222) stärker ausfällt.

Dieses Ergebnis ist ein Hinweis darauf, dass die Sequenz CSGQ eine Rolle bei der Translokation von Mdg1 unter Hitzeschock in den Zellkern und die Nukleoli einnehmen könnte. Um die Rolle dieser CSGQ-Sequenz weiter zu untersuchen, wurde einerseits CSGQ (funktionsfähige Form) hinter EGFP kloniert, andererseits eine mutierte Form, welche statt Cystein Serin enthält (EGFP-SSGQ). Diese Form kann nicht mehr farnesyliert werden.

A) EGFP-CSGQ



B) EGFP-SSGQ

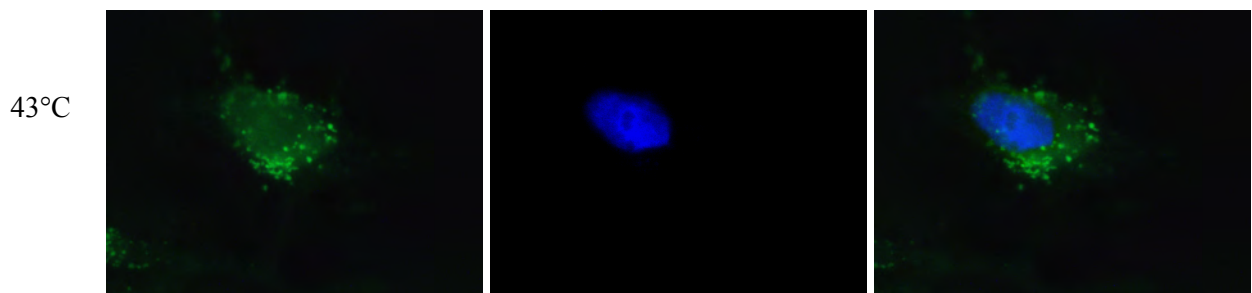


Abb. 24: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisation von EGFP-CSGQ und EGFP-SSGQ nach Hitzeschock

COS7-Zellen wurden mit dem Plasmid transfiziert, bei 37°C inkubiert und anschließend eine Stunde bei 43°C gehalten. Anschließend erfolgten die Färbung der Kerne mit Bisbenzimidide und die Fixation der Zellen.

Die grüne Fluoreszenz des EGFP-CSGQ ist über die gesamte Zelle verteilt, wobei eine Assoziation an den Nukleoli zu beobachten ist. EGFP-SSGQ hingegen liegt in Aggregaten über die Zelle verteilt vor.

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisation dieser Proteine zeigt, dass EGFP-SSGQ nach Inkubation der transfizierten Zellen für eine Stunde bei 43°C nicht in gelöster Form in den Zellen vorliegt. Das Protein bildet Aggregate und ist vor allem in dem Zytosol der Zellen zu finden (Abb. 24 B). Das Protein mit farnesylierungsfähigem C-terminalem Ende (EGFP-CSGQ) zeigt eine Lokalisation über die gesamte Zelle, wobei eine Assoziation an den Nukleoli erkennbar ist (Abb. 24 A). Diese Fluoreszenz in den Nukleoli ist jedoch nur schwach ausgeprägt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für die Lokalisation bei 37°C die N-terminal gelegenen 26 Aminosäuren von großer Bedeutung sind. Diese Sequenz dirigiert das Protein an das ER und den Golgi-Apparat.

Die Assoziation an den Nukleoli bei 43°C wird von verschiedenen Sequenzabschnitten bewirkt. Dabei kommt den Aminosäureabschnitten 96 bis 125 und 180 bis 222 eine Bedeutung zu. Außerdem scheint auch die farnesylierbare C-terminale Sequenz CSGQ bei der subzellulären Lokalisation eine Rolle zu spielen.

4.2.3 Detektion des Mdg1-Proteins in den zellulären Fraktionen unter Kontrollbedingungen und nach Hitzeschock

Um die Ergebnisse, welche durch die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen ermittelt wurden, durch eine andere, unabhängige Methode zu verifizieren, wurde die proteinbiochemische Nachweismethode gewählt. Dabei wurden die transfizierten Zellen in die Fraktionen Zytosol, Mikrosomen, Kern und Zytoskelett getrennt. Für die Transfektion wurden dieselben Plasmide verwendet, die auch für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung herangezogen wurden (Abb. 18).

Zunächst wurden untransfizierte COS7-Zellen untersucht, um unspezifische Signale, die bei einigen Antikörpern auftreten, zu identifizieren. Dabei wurden die Zellen ebenso behandelt wie transfizierte Zellen und sowohl unter Kontroll- als auch unter Hitzeschockbedingungen untersucht. Die Zellen wurden vor Fraktionierung unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet, um eine Verunreinigung mit anderen EGFP-Plasmiden auszuschließen. Die untransfizierten Zellen zeigten keine Fluoreszenz.

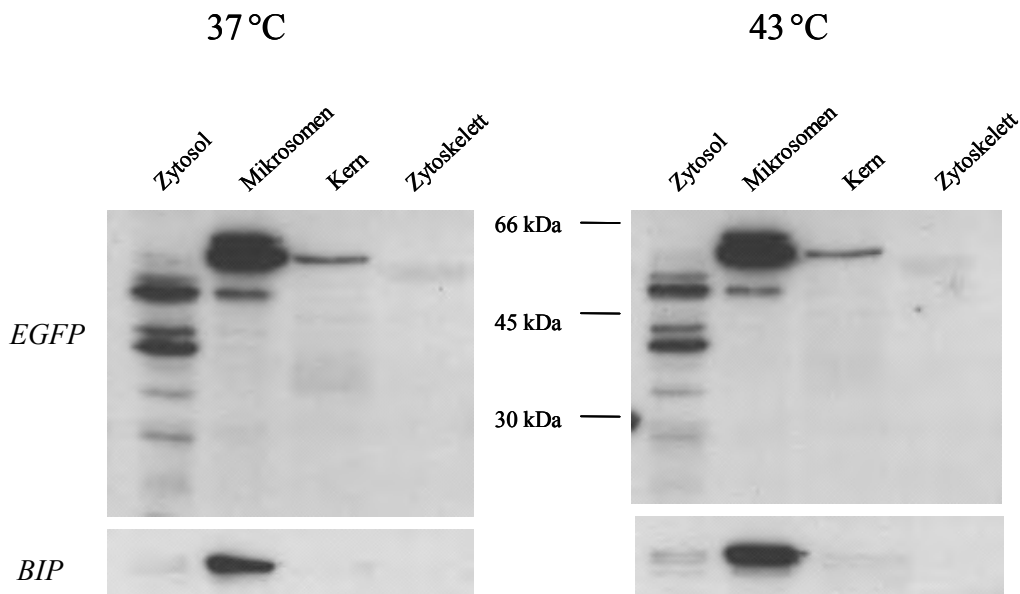


Abb. 25: Western-Blot-Analyse untransfizierter COS7-Zellen nach Zellfraktionierung
 Detektion mit anti-GFP als Erstantikörper unter Kontrollbedingungen und nach Hitzeschock; Kontrolle der Reinheit der Fraktionierung mit anti-BiP/GRP78.
 Die schwarzen Banden stellen unspezifische Banden des Antikörpers dar.

Wie aus dem Western-Blot ersichtlich, weist der anti-GFP Antikörper einige Hintergrundbanden auf. Dies betrifft insbesondere die zytosolische und die membrangebundene Fraktion. In der Kernfraktion ist lediglich eine Bande zu finden. Die Fraktion des Zytoskeletts weist keine unspezifische Bande für EGFP auf (Abb. 25).

COS7-Zellen wurden anschließend mit dem Plasmid Mdg1(1-221)-EGFP transfiziert. Die Western-Blot-Analyse wurde sowohl mit dem anti-GFP-Antikörper als auch mit anti-BiP/GRP78 durchgeführt. Die Analyse mit anti-BiP/GRP78 zeigt, dass der Reinheitsgrad der Fraktionierung sehr hoch ist, da BiP lediglich in der membranumschlossenen mikrosomalen Fraktion nachweisbar ist. Somit lässt sich eine genaue Aussage über die Verteilung des Mdg1(1-221)-EGFP-Fusionsproteins machen. Mdg1(1-221)-EGFP ist unter Kontrollbedingungen hauptsächlich in der zytosolischen Fraktion, aber auch in der Zytoskelettfraktion zu finden (Abb. 26). Nach Hitzeschock wird die Bande des Zytoskeletts deutlicher. Eine nachweisbare Translokation in den Zellkern, wie sie in der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung festgestellt wird, ist durch die proteinbiochemische Methode nicht nachweisbar.

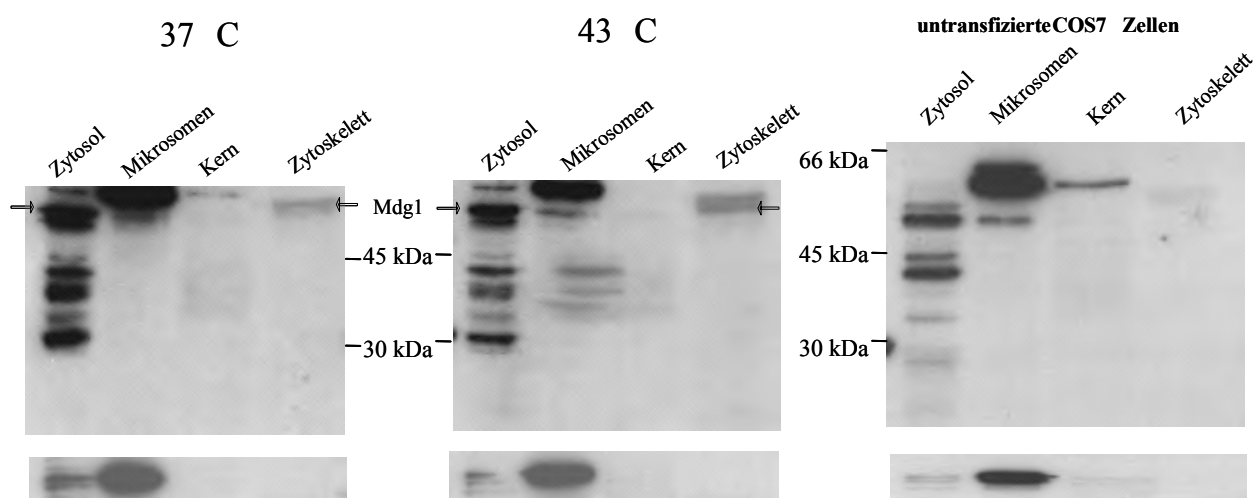


Abb. 26: Western-Blot-Analyse von Mdg1(1-221)-EGFP (52,7 kDa) nach Zellfraktionierung transfizierter COS7-Zellen

Detektion mit dem Erstantikörper anti-GFP, Kontrolle der Fraktionierung mit anti-BiP/GRP78 (unten).

Die Banden des Fusionsproteins (Pfeil) sind bei 37°C im Zytosol und im Zytoskelett zu finden, bei 43°C im Zytoskelett.

Zum Vergleich mit den unspezifischen Hybridisierungsbanden ist der Blot aus Abb. 25 noch mal eingefügt (rechter Blot).

Um zu untersuchen, ob eine freie, funktionsfähige CSGQ-Sequenz an der Lokalisation von Mdg1 beteiligt ist, wie in vorherigen Versuchen bereits postuliert, wurden COS7-Zellen mit EGFP-Mdg1(1-222) transfiziert. Bei diesem Plasmid ist EGFP N-terminal an Mdg1 fusioniert, so dass der C-Terminus nicht maskiert ist. Nach Zellfraktionierung wurden die Fraktionen in der Western-Blot-Analyse unter Verwendung des Erstantikörpers anti-GFP untersucht. Unter Kontrollbedingungen verhält sich dieses Protein ähnlich wie Mdg1(1-221)-EGFP. Es ist ebenfalls in der zytosolischen und der Zytoskelettfraktion zu finden (Abb. 27). Jedoch zeigt dieses Protein auch eine deutliche Bande in der mikrosomalen Fraktion. Nach Hitzeschock unterscheidet sich das Verteilungsmuster wesentlich von dem des Proteins mit maskiertem CSGQ. EGFP-Mdg1(1-222) zeigt eine deutliche Lokalisation im Zellkern. Daneben ist es ebenso wie Mdg1(1-221)-EGFP auch in den übrigen Fraktionen nachweisbar, wobei die Stärke der Zytoskelett-Bande deutlich zunimmt.

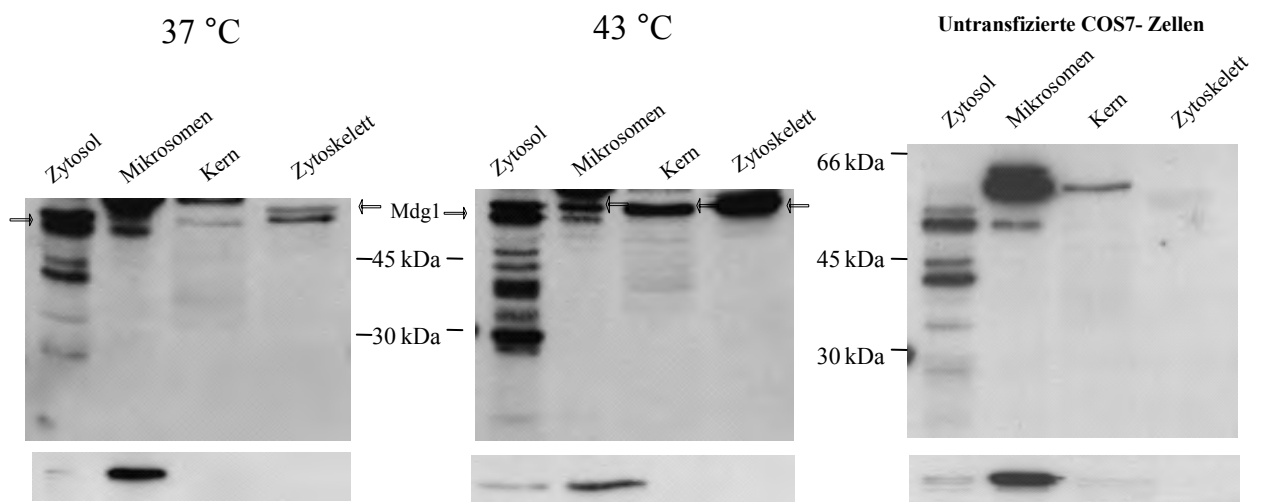


Abb. 27: Western-Blot-Analyse von EGFP-Mdg1(1-222) (52,7 kDa) nach Zellfraktionierung transfizierter COS7-Zellen

Detektion mit anti-GFP als Erstantikörper, Kontrolle der Reinheit der Fraktionierung anti-BiP/GRP78, welches lediglich in der Mikrosomenfraktion nachzuweisen ist (unten).

Bei 37°C sind die Banden des Fusionsproteins (Pfeil) in der zytosolischen und zytoskelettalen Fraktion zu finden, bei 43°C in allen Fraktionen, auch im Zellkern.

Zum Vergleich mit den unspezifischen Hybridisierungsbanden ist der Blot aus Abb. 25 noch mal eingefügt (rechter Blot).

Da sich durch Vergleich der Lokalisationen von Mdg1(1-221)-EGFP und EGFP-Mdg1(1-222) gezeigt hat, dass die Maskierung der Enden des Mdg1-Proteins die Verteilung stark beeinflusst, wurde nun ein Plasmid von Mdg1 untersucht, bei dem sowohl der N- als auch der C-Terminus frei vorliegen. Dieses Plasmid enthält einen internen myc-tag (Konstrukt wurde von Diana Schätzle zur Verfügung gestellt) und wurde im Western-Blot durch den Erstantikörper anti-myc detektiert. Die Hintergrundfärbung dieses Antikörpers kann vernachlässigt werden, da allenfalls sehr schwache Banden nach einer Inkubation des Films für zwei Minuten sichtbar wurden. Die Inkubation zur Detektion der myc-Banden transfizierter Zellen betrug jedoch nur 10 bis 20 Sekunden.

Mdg1-myc-intern zeigt sich unter Kontrollbedingungen vor allem in der Membranfraktion, ist aber auch in allen anderen Fraktionen zu finden (Abb. 28). Die Konzentration dieses Proteins in der zytosolischen Fraktion ist jedoch deutlich geringer als bei den EGFP-Fusionsproteinen. Nach Hitzeschock liegt das Protein ebenso in allen vier Fraktionen vor, jedoch nimmt die Intensität der zytosolischen Fraktion deutlich zu. Auch eine leichte Verstärkung der Kernbande ist zu erkennen. Unter Kontrollbedingungen zeigen sich mehrere Banden geringerer Größe in der Kernfraktion. Nach Hitzeschock ist lediglich eine kleinere Bande erkennbar, welche wesentlich schwächer ausfällt als unter Kontrollbedingungen.

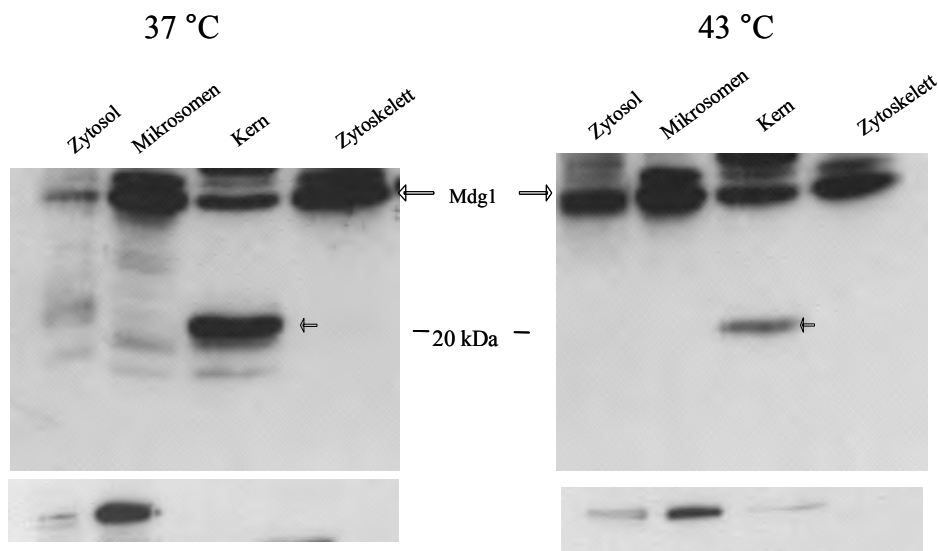


Abb. 28: *Western-Blot-Analyse von Mdg1-myc-intern (26,9 kDa) nach Zellfraktionierung transfizierter COS7-Zellen*
Detektion mit dem Erstantikörper anti-myc (oben), Kontrolle durch den Antikörper anti-BiP/GRP78 (unten).
Die Banden von Mdg1-myc-intern sind bei 37°C und bei 43°C in allen vier Fraktionen nachweisbar, wobei bei 43°C die Stärke der Banden in der Zytosol- und Kernfraktion zunimmt.

Um nun zu untersuchen, ob sich das Verteilungsmuster durch Deletion des Mdg1-Proteins verändert, wurde der Gesamt-C-Terminus untersucht. Dabei wurden COS7-Zellen mit den beiden Plasmiden, bei denen EGFP N- bzw. C-terminal an den Gesamt-C-Terminus fusioniert wurde (Abb. 18), transfiziert. Wiederum erfolgte nach der Zellfraktionierung eine Detektion mittels anti-GFP. Unter Kontrollbedingungen zeigt sich eine deutliche Lokalisation der Proteine am Zytoskelett. In der Membranfraktion ist keine Bande erkennbar, auch in der Kernfraktion sind diese Deletionsproteine unter Kontrollbedingungen nicht zu finden (Abb. 29). Mdg1(96-221)-EGFP zeigt im Zytoskelett lediglich eine Bande. Im Zytosol sind drei weitere Banden nachweisbar, welche eine geringere Größe aufweisen. Die Banden liegen etwa bei 35 kDa, 32 kDa und 30 kDa (Abb. 29 Stern). Demgegenüber zeigt EGFP-Mdg1(96-222) keine Banden im Zytosol, jedoch mehrere Banden von unterschiedlicher Größe im Zytoskelett. Wiederum ist die kleinste dieser Banden 30 kDa groß. Die mittleren Banden weisen eine Größe von etwa 37 kDa und 35 kDa auf. Das Verhalten ist unabhängig von der Temperatur, bei der die Inkubation stattfindet. Dies macht der Vergleich der Ergebnisse unter Kontrollbedingungen mit denen nach Hitzeschock deutlich. Nach Hitzeschock sind die Proteine ebenfalls am Zytoskelett nachweisbar, ebenso treten die kleineren Banden, wie bei 37°C gesehen, auf. Ein geringer Anteil des EGFP-Mdg1(96-222)-Fusionsproteins ist nach Hitzeschock in der Kernfraktion zu finden. Dies ist bei Mdg1(96-221)-EGFP nicht nachweisbar. Bei diesem Protein ist bezüglich der Lokalisation unter Kontrollbedingungen und nach Hitzeschock keine Veränderung zu beobachten.

Die Ergebnisse nach Hitzeschock stimmen mit denen des Gesamt-Mdg1-Proteins überein. Auch dort wurde schon gezeigt, dass die CSGQ-Domäne für die Lokalisation in den Zellkernen frei vorliegen muss.

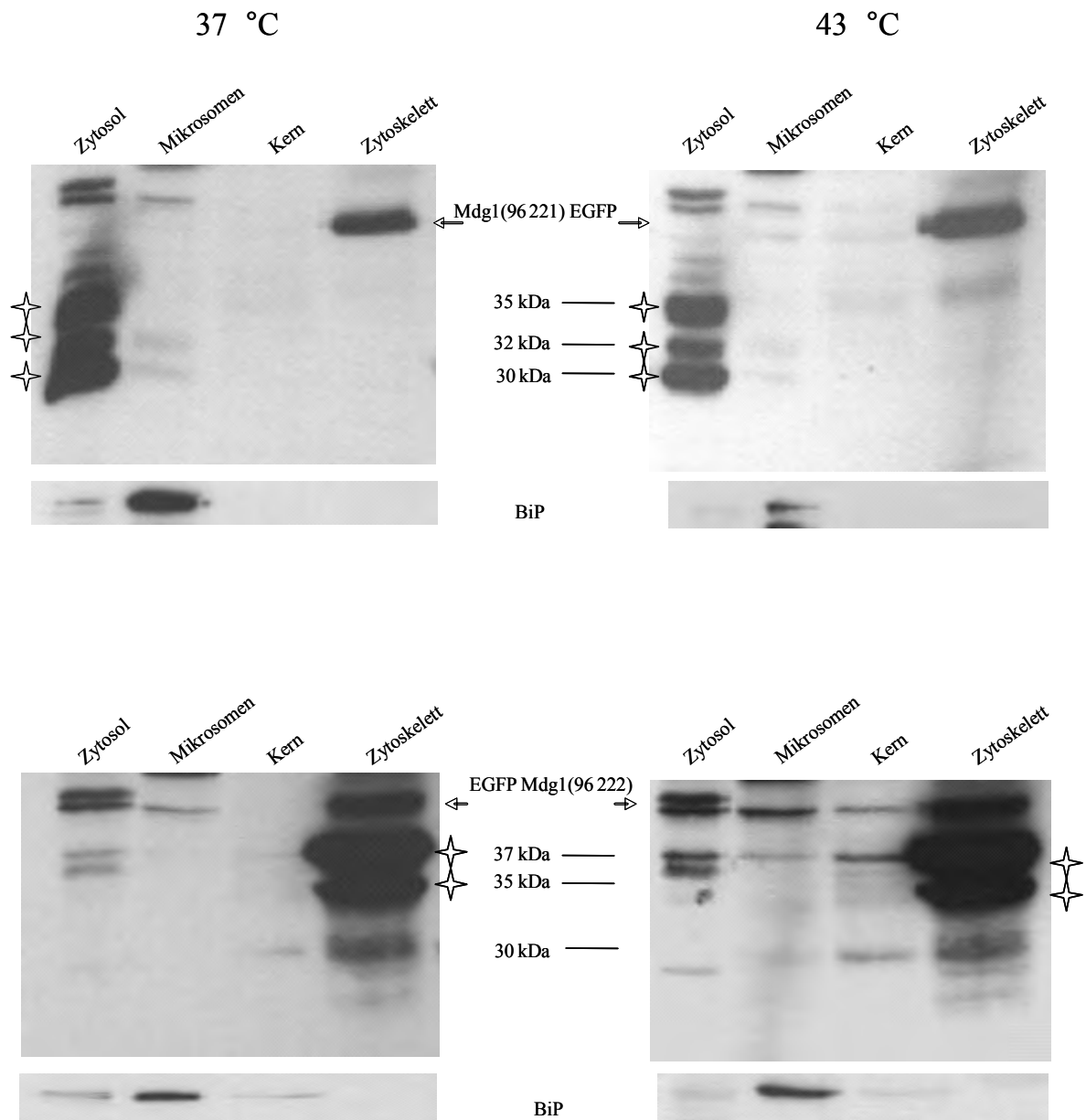


Abb. 29: Western-Blot-Analyse von Mdg1(96-221)-EGFP (41,6 kDa) und EGFP -Mdg1(96-222) (41,6 kDa) nach Zellfraktionierung transfizierter COS7-Zellen

Detektion mit anti-GFP, Kontrolle der Zellfraktionierung mit anti-BiP/GRP78.

Die Bande von Mdg1(96-221)-EGFP ist bei 37°C in der zytoskelettalen Fraktion zu finden. Weitere Banden geringerer Größe (etwa 35 kDa, 32 kDa und 30 kDa) (Stern) sind in der Zytosolfraction. Dasselbe Muster kann bei 43°C beobachtet werden. EGFP-Mdg1(96-222) ist bei 37°C ebenfalls in der Fraktion des Zytoskeletts nachweisbar, wobei in dieser Fraktion auch kleinere Banden (etwa 37 kDa, 35 kDa und 30 kDa) (Stern) zu erkennen sind. Ein ähnliches Muster wird bei 43°C beobachtet. Nach Hitzeschock liegt dieses Fusionsprotein auch in der Kernfraktion vor.

Im weiteren Verlauf wurde die Lokalisation unter Kontrollbedingungen genauer untersucht, um die Domänen, welche die Zytoskelettassoziation bewirken, zu identifizieren. Da sowohl das Konstrukt mit einer freien CSGQ-Domäne als auch jenes mit einer maskierten Domäne im Zytoskelett vorliegen, kann für diese Lokalisation nicht allein die Sequenz CSGQ verantwortlich sein. Um die entsprechenden Bereiche zu identifizieren, wurden Zellen mit den Konstrukten, welche aus jeweils etwa 60 Aminosäuren des C-Terminus von Mdg1 bestehen, transfiziert und fraktionell aufgearbeitet.

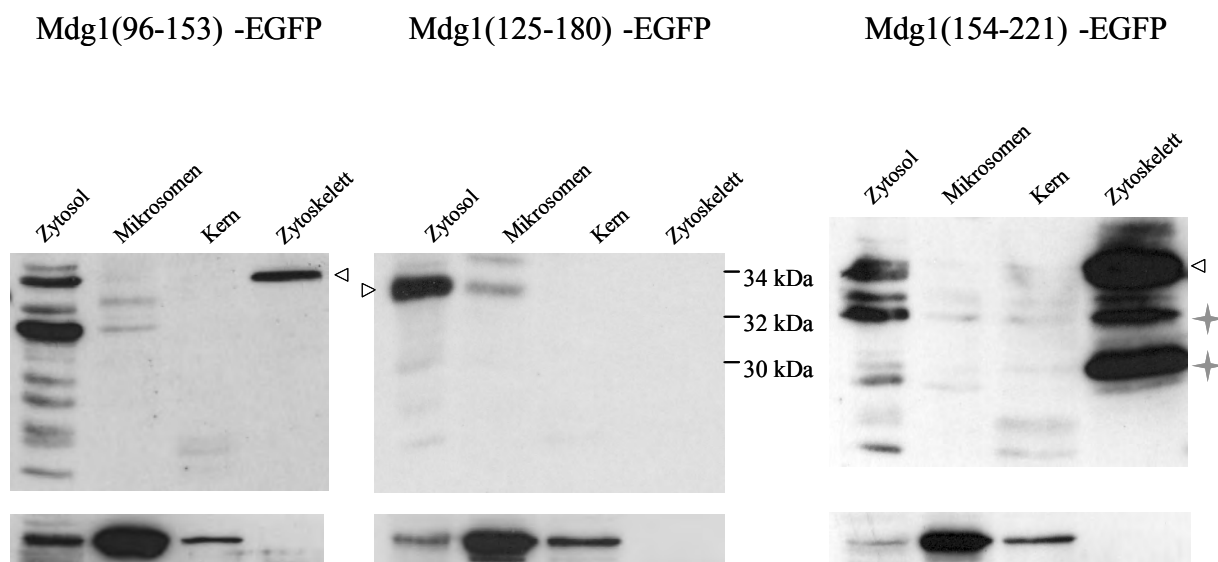


Abb. 30: Western-Blot-Analyse von Mdg1(96-153)-EGFP (33,6 kDa), Mdg1(125-180)-EGFP (33,4 kDa) und Mdg1(154-221)-EGFP (34,7 kDa) nach Zellfraktionierung transfizierter COS7-Zellen

Detektion mit anti-GFP, Kontrolle der Zellfraktionierung mit anti-BiP/GRP78 (unteres Bild). Die Banden der EGFP-Fusionsproteine sind jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Banden von Mdg1(96-153)-EGFP und Mdg1(154-221)-EGFP sind in den Fraktionen des Zytoskeletts zu erkennen, die des Mdg1(125-180)-EGFP in der Fraktion des Zytosols. Bei Mdg1(154-221)-EGFP sind neben der Bande des Fusionsproteins auch Banden geringerer Größe von etwa 32 kDa und 30 kDa im Zytoskelett nachweisbar (Stern).

Nach der Western-Blot-Analyse dieser Fraktionierungen und Detektion mit anti-GFP und anti-BiP fällt auf, dass Mdg1(96-153)-EGFP wie auch Mdg1(154-221)-EGFP in der zytoskelettalen Fraktion zu finden sind. Jenes Protein, welches aus den letzten C-terminalen 68 Aminosäuren (154-221) besteht, zeigt im Zytoskelett Banden unterschiedlicher Größe (Abb. 30). Ein vollkommen anderes Verhalten kann bei Mdg1(125-180)-EGFP, welches die mittleren 55 Aminosäuren des C-Terminus umfasst, beobachtet werden. Dieses Protein ist lediglich im Zytosol zu finden (Abb. 30). Diese Ergebnisse lassen die Aussage zu, dass die Domänen, welche eine Assoziation des Mdg1 am Zytoskelett bewirken, in den Aminosäurebereichen 96 bis 125 und auch im Abschnitt 180 bis 221 liegen.