

Funktionelle Analyse der lysosomalen integralen Membranproteine LIMP-1 und LIMP-2



**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel**

**vorgelegt von
Jenny Schröder**

Kiel, Mai 2008

Referent/in:

Korreferent/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt: Kiel, den

Der Dekan

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|---|-----------|
| | Inhaltsverzeichnis | 1 |
| | Abkürzungsverzeichnis | 5 |
| 1 | Einleitung | 9 |
| 1.1 | Das Lysosom | 9 |
| 1.2 | Der Mannose-6-Phosphatrezeptor-abhängige Transport lysosomaler Proteine..... | 10 |
| 1.3 | Der Mannose-6-Phosphatrezeptor-unabhängige Transport lysosomaler Proteine | 11 |
| 1.4 | Die lysosomale Membran und ihre Proteine | 13 |
| 1.5 | LIMP-1 | 14 |
| 1.5.1 | Tetraspanine | 14 |
| 1.5.2 | Die Struktur von LIMP-1..... | 16 |
| 1.5.3 | Vorkommen und postulierte Funktionen von LIMP-1 | 16 |
| 1.5.4 | Die Rolle von LIMP-1 bei pathologischen Prozessen | 19 |
| 1.6 | LIMP-2 | 20 |
| 1.6.1 | Struktur und Funktion von LIMP-2 | 20 |
| 1.6.2 | Die LIMP-2- <i>knock-out</i> -Maus | 22 |
| 1.7 | Lysosomale Speichererkrankungen und Morbus Gaucher | 23 |
| 1.7.1 | Lysosomale Speichererkrankungen | 23 |
| 1.7.2 | Sphingolipid-Katabolismus und Sphingolipidosen | 24 |
| 1.7.3 | Morbus Gaucher | 24 |
| 1.7.4 | Die β -Glukocerebrosidase | 27 |
| 2 | Fragestellung | 31 |
| 3 | Material und Methoden | 32 |
| 3.1 | Material | 32 |
| 3.1.1 | Chemikalien, Enzyme, Materialien | 32 |
| 3.1.2 | Bakterienstämme | 32 |
| 3.1.3 | Oligonukleotide | 32 |
| 3.1.4 | Plasmide | 33 |
| 3.1.5 | Antikörper | 36 |
| 3.1.6 | Zelllinien | 38 |
| 3.1.7 | Mausstämme | 39 |
| 3.2 | Methoden | 40 |
| 3.2.1 | Molekularbiologische Methoden | 40 |
| 3.2.1.1 | Konzentrationsbestimmung von DNA | 40 |
| 3.2.1.2 | Agarosegelelektrophorese | 41 |
| 3.2.1.3 | Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen | 41 |
| 3.2.1.4 | Transformation elektrisch kompetenter Bakterien (Elektroporation) | 41 |
| 3.2.1.5 | Plasmidamplifikation und -aufreinigung | 42 |
| 3.2.1.6 | Präparation genomischer DNA aus Schwanzgewebe | 42 |
| 3.2.1.7 | Polymerasekettenreaktion (PCR) | 43 |
| 3.2.1.7.1 | Genotypisierung | 43 |
| 3.2.1.7.2 | Klonierungs-PCR | 44 |
| 3.2.1.7.3 | Fusions-PCR | 45 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 3.2.1.7.4 | <i>Nested-PCR</i> (Mycoplasmendetektion) | 47 |
| 3.2.1.8 | Restriktionsverdau | 48 |
| 3.2.1.9 | Dephosphorylierung | 48 |
| 3.2.1.10 | Ligation | 48 |
| 3.2.1.11 | DNA-Sequenzierung | 49 |
| 3.2.2 | <i>Southern-Blot-Analyse</i> | 49 |
| 3.2.3 | <i>Northern-Blot-Analyse</i> | 51 |
| 3.2.4 | Reverse Transkriptase PCR | 51 |
| 3.2.5 | Zellkultur | 52 |
| 3.2.5.1 | Zellkulturbedingungen und –kultivierung | 52 |
| 3.2.5.2 | Einfrieren von Zellen zur Aufbewahrung | 53 |
| 3.2.5.3 | Auftauen von Zellen zur Kultivierung | 53 |
| 3.2.5.4 | Herstellung muriner embryonaler Fibroblasten | 53 |
| 3.2.5.5 | Mycoplasmendetektion | 54 |
| 3.2.6 | Gewinnung von Makrophagen aus der Peritonealhöhle | 55 |
| 3.2.7 | Zellzahlbestimmung | 56 |
| 3.2.8 | Isolierung von Sammelrohren aus der Mausniere | 56 |
| 3.2.9 | Transfektion | 58 |
| 3.2.9.1 | Transiente Transfektion | 58 |
| 3.2.9.2 | Transfektion von siRNA | 59 |
| 3.2.10 | SDS-PAGE und <i>Western Blot</i> | 59 |
| 3.2.10.1 | SDS-PAGE Probenvorbereitung | 59 |
| 3.2.10.2 | Proteinkonzentrationsbestimmung | 60 |
| 3.2.10.3 | Deglykosylierung mit N-Glykosidase F und Endoglykosidase H | 60 |
| 3.2.10.4 | TCA-Fällung | 60 |
| 3.2.10.5 | Koimmunopräzipitation | 61 |
| 3.2.10.6 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 61 |
| 3.2.10.7 | Coomassie-Färbung | 63 |
| 3.2.10.8 | <i>Western Blot</i> | 63 |
| 3.2.10.9 | Färben von <i>Western Blots</i> | 65 |
| 3.2.10.10 | <i>Strippen</i> von <i>Western Blots</i> | 66 |
| 3.2.11 | <i>Pulse-Chase-Experimente</i> | 66 |
| 3.2.12 | Quervernetzung (<i>Crosslink</i>) von Proteinen in lebenden Zellen | 67 |
| 3.2.13 | Enzymmessungen | 68 |
| 3.2.13.1 | β -Glukocerebrosidase | 69 |
| 3.2.13.2 | β -Hexosaminidase | 69 |
| 3.2.13.3 | β -Mannosidase | 69 |
| 3.2.13.4 | Arylsulfatase A | 69 |
| 3.2.14 | Mikroskopische Methoden | 70 |
| 3.2.14.1 | Axiovert 200M | 70 |
| 3.2.14.2 | Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie | 71 |
| 3.2.14.3 | <i>Lysotracker-Red-Färbung</i> | 72 |
| 3.2.14.4 | Immunohistochemie | 73 |
| 3.2.15 | <i>Fluorescence Activated Cell Scanning (FACS)</i> | 73 |
| 3.2.16 | Histologische Untersuchungen | 75 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 3.2.17 | Metabolische Käfige | 76 |
| 3.2.18 | Thrombozyten-Analyse | 77 |
| 3.2.18.1 | Thrombozyten-Präparation | 77 |
| 3.2.18.2 | <i>Fluorescence Activated Cell Scanning</i> (FACS) | 78 |
| 3.2.18.3 | Messung der Blutungszeit aus der Schwanzspitze | 78 |
| 3.2.18.4 | Thrombusbildung unter arteriellen Scherbedingungen..... | 78 |
| 3.2.18.5 | Aggregometrie | 79 |
| 4 | Ergebnisse | 80 |
| 4.1 | Charakterisierung einer LIMP-1-defizienten Maus | 80 |
| 4.1.1 | Vorüberlegungen zur Generierung der LIMP-1-defizienten Maus | 80 |
| 4.1.2 | Generierung der LIMP-1-defizienten Maus | 83 |
| 4.1.3 | Überprüfung der LIMP-1-Defizienz | 84 |
| 4.1.4 | Allgemeine Eigenschaften der LIMP-1-defizienten Maus | 86 |
| 4.1.5 | Immunocytochemische Untersuchung LIMP-1-defizienter Zellen | 87 |
| 4.1.6 | Immunoblot-Analyse LIMP-1-defizienter Zellen | 89 |
| 4.1.7 | Enzymatische Aktivität verschiedener lysosomaler Hydrolasen | 90 |
| 4.1.8 | Einfluss von LIMP-1-siRNA auf die Lysosomen von HeLa-Zellen | 91 |
| 4.1.9 | Analyse des Immunsystems LIMP-1-defizienter Mäuse | 91 |
| 4.1.10 | Untersuchung LIMP-1-defizienter Thrombozyten | 101 |
| 4.1.11 | Histologische Untersuchung der LIMP-1 ^{-/-} -Maus | 104 |
| 4.1.12 | Histologische Untersuchung der Niere der LIMP-1 ^{-/-} -Maus | 105 |
| 4.1.13 | Metabolische Untersuchung der LIMP-1 ^{-/-} -Maus | 107 |
| 4.1.14 | Analyse der Aquaporin-2-Verteilung in LIMP-1-defizienten Sammelrohrhauptzellen | 111 |
| 4.2 | Identifizierung von LIMP-2 als den intrazellulären Transporter der β-Glukocerebrosidase | 114 |
| 4.2.1 | Der Mannose-6-Phosphatrezeptor-unabhängige Transport der β -Glukocerebrosidase zum Lysosom | 114 |
| 4.2.2 | Die Expression der β -Glukocerebrosidase ist in LIMP-2-defizienten Geweben stark reduziert | 115 |
| 4.2.3 | Immunohistochemische Untersuchung LIMP-2-defizienter Gewebe | 118 |
| 4.2.4 | Ansammlung von Glukosylceramid in LIMP-2-defizienten Geweben | 119 |
| 4.2.5 | Untersuchung LIMP-2-defizienter Zellen | 119 |
| 4.2.6 | Die β GC-mRNA ist in LIMP-2-defizienten Zellen und Geweben unverändert | 122 |
| 4.2.7 | In LIMP-2-defizienten Zellen überexprimierte β -Glukocerebrosidase wird im endoplasmatischen Reticulum zurückgehalten | 122 |
| 4.2.8 | Die Retransfektion LIMP-2-defizienter Zellen mit LIMP-2 führt zu gesteigerter lysosomaler Expression der β -Glukocerebrosidase | 124 |
| 4.2.9 | Eine im endoplasmatischen Reticulum verbleibende LIMP-2-Mutante hält auch die β -Glukocerebrosidase im endoplasmatischen Reticulum fest | 126 |
| 4.2.10 | Eine Sekretionsmutante von LIMP-2 führt zur Abgabe der β -Glukocerebrosidase in den Zellkulturüberstand | 128 |
| 4.2.11 | Äquimolare Mengen von LIMP-2 sind für eine starke und lysosomale Expression der β -Glukocerebrosidase ausreichend | 129 |
| 4.2.12 | In LIMP-2-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten wird auch die endogene β -Glukocerebrosidase im endoplasmatischen Reticulum zurückgehalten | 131 |
| 4.2.13 | LIMP-2-defiziente Zellen sekretieren einen großen Teil der β -Glukocerebrosidase | 132 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 4.2.14 | <i>Pulse-Chase</i> -Experimente zeigen eine verminderte Reifung und verstärkte Sekretion der β -Glukocerebrosidase in mit LIMP-2-siRNA behandelten HeLa-Zellen | 135 |
| 4.2.15 | Proteasomale Inhibitoren haben keinen Einfluss auf die Menge der β -Glukocerebrosidase in LIMP-2-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten | 137 |
| 5 | Diskussion | 140 |
| 5.1 | Charakterisierung einer LIMP-1-defizienten Maus | 140 |
| 5.1.1 | Das LIMP-1-Pseudogen auf Mauschromosom 18 ist vermutlich transkriptionell inaktiv | 140 |
| 5.1.2 | Erfolgreiche Generierung eines LIMP-1-defizienten Mausmodells | 141 |
| 5.1.3 | LIMP-1-defiziente Mäuse weisen auf den ersten Blick keinen auffälligen Phänotyp auf. | 142 |
| 5.1.4 | LIMP-1-Defizienz hat keine offensichtlichen Auswirkungen auf lysosomale Funktionen | 145 |
| 5.1.5 | LIMP-1 ^{-/-} -Mäuse besitzen unveränderte Immunzellpopulationen in Knochenmark, Thymus, Milz, Lymphknoten und Peritoneum | 145 |
| 5.1.6 | Die Thrombozyten LIMP-1-defizienter Mäuse zeigen keine veränderte Aktivität | 150 |
| 5.1.7 | LIMP-1 ^{-/-} -Mäuse weisen Einschlüsse in den Hauptzellen der Sammelrohre der Niere auf, deren Funktion beeinträchtigt ist | 152 |
| 5.1.8 | Es liegt keine veränderte Expression oder Fehlverteilung des Wasserporenproteins Aquaporin-2 in LIMP-1-defizienten Sammelrohr-Hauptzellen vor | 153 |
| 5.1.9 | ROMK, CA-II und Integrine: Proteine, deren Funktion in der LIMP-1-defizienten Niere beeinträchtigt sein könnte | 156 |
| 5.2 | Die Identifikation von LIMP-2 als intrazellulärenTransporter der β-Glukocerebrosidase | 159 |
| 5.2.1 | Die Interaktion der β -Glukocerebrosidase mit LIMP-1 beginnt bereits im endoplasmatischen Reticulum | 160 |
| 5.2.2 | LIMP-2 ist für den effizienten Transport der β -Glukocerebrosidase aus dem endoplasmatischen Reticulum notwendig | 160 |
| 5.2.3 | Die β -Glukocerebrosidase wird bei Abwesenheit von LIMP-2 sekretiert | 161 |
| 5.2.4 | LIMP-2 verstärkt die Membranassoziation der β -Glukocerebrosidase | 161 |
| 5.2.5 | LIMP-2 interagiert mit der β -Glukocerebrosidase vermutlich im Verhältnis 2:2 | 162 |
| 5.2.6 | Recycling von LIMP-2 vom Lysosom zum Golgi-Apparat | 163 |
| 5.2.7 | Andere Bindungspartner von LIMP-2 | 164 |
| 5.2.8 | LIMP-2 als Krankheitsgen im Menschen | 164 |
| 5.2.9 | Modell der Interaktion von LIMP-2 und der β -Glukocerebrosidase | 165 |
| 5.2.10 | Die Bedeutung der Entdeckung von LIMP-2 als intrazellulärer Transporter der β -Glukocerebrosidase | 166 |
| 5.3 | Ausblick | 167 |
| 6 | Zusammenfassung | 170 |
| 7 | Summary | 171 |
| 8 | Literaturverzeichnis | 172 |
| 9 | Materialien | 193 |
| 10 | Lebenslauf | 205 |
| 11 | Danksagung | 207 |
| 12 | Erklärung | 208 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|--|
| Abb. | <u>Abbildung</u> |
| ACD | <u>Acide-Citrate-Dextrose</u> (-Puffer) |
| ACH | N ^α -(ε- <u>Aminocaproyl</u>)-DL- <u>homoarginin</u> -hexylester (-Sepharose) |
| ADP | <u>Adenosindiphosphat</u> |
| AEBSF | 4-(2- <u>Aminoethyl</u>)- <u>benzolsulfonylfluorid</u> , Serinprotease-Inhibitor |
| AF | <u>Alexa Fluor</u> |
| ALLN | N- <u>Acetyl-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Norleucinal</u> |
| AMRF | <u>Action Myoclonus Renal Failure Syndrom</u> |
| AP | <u>Adaptorprotein-Komplex</u> |
| APC | <u>Allophycocyanin</u> |
| APS | <u>Ammoniumperoxodisulfat</u> |
| AQP | <u>Aquaporin</u> |
| ATP | <u>Adenosintriphosphat</u> |
| AVP | <u>Arginin-Vasopressin</u> , antidiuretisches Hormon, ADH, Adiuretin |
| βGC | <u>β-Glukocerebrosidase</u> |
| bp | <u>Basenpaar</u> |
| BP | <u>Band Pass</u> Filter |
| BSA | bovines <u>Serumalbumin</u> |
| BGH p.A. | poly- <u>Adenylierungssignal</u> des bovinen Rinderwachstumshormons (<u>bovine growth hormone</u>) |
| bzw. | <u>beziehungsweise</u> |
| C- | <u>carboxy-</u> |
| ca. | <u>circa</u> |
| CA | <u>Carboanhydrase</u> |
| CD | <u>Cluster of Differentiation</u> |
| CD63-rs1 | <u>LIMP-1-related gene sequence</u> 1 |
| CD-MPR | <u>Cation-Dependent MPR</u> (Kationen-abhängiger Mannose-6-Phosphatrezeptor) |
| cDNA | <u>complementary DNA</u> |
| CHO | <u>Chinese Hamster Ovary</u> (-Zellen) |
| μCi | Mikrocurie (Maßeinheit der Aktivität eines radioaktiven Stoffes), 1Ci = 3,7·10 ¹⁰ Becquerel (Becquerel gibt die Anzahl der Atome an, die pro Sekunde zerfallen) |
| CIAP | <u>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</u> |
| CI-MPR | <u>Cation-Independent MPR</u> (Kationen-unabhängiger MPR) |
| CLPs | <u>Common Lymphoid Progenitors</u> (lymphozytäre Vorläuferzellen) |
| cm | Zentimeter |
| CMPs | <u>Common Myeloid Progenitors</u> (myeloide Vorläuferzellen) |
| CMV | <u>Cytomegalie-Virus</u> |
| CNBr | <u>Bromcyan</u> (-Sepharose) |
| cpm | <u>counts per minute</u> |
| CRP | <u>Collagen-related Peptide</u> |
| d | aus <u>Drosophila</u> stammend |
| D | <u>Deutschland</u> |
| DAPI | 4',6- <u>Diamidino-2-phenylindol</u> -dihydrochlorid |
| DABCO | <u>Diazobicyclooctan</u> |
| DC | <u>Dendritic Cell</u> (dendritische Zelle) |
| ddH ₂ O | deionisiertes Wasser |
| dE | Differenz der gemessenen <u>Extinktionswerte</u> |
| DEPC | <u>Diethylpyrocarbonat</u> |
| dFCS | <u>dialysiertes fetal calf serum</u> (fötales Kälberserum) |
| d. h. | das <u>heißt</u> |

| | |
|----------------|---|
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DMSO | <i>Dimethylsulfoxid</i> |
| DN | doppelt negativ (T-Zell-Entwicklungsstadium) |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure) |
| DSHB | <i>Developmental Studies Hybridoma Bank</i> |
| dNTPs | <i>Desoxynukleotidtriphosphate</i> |
| DSS | <i>Disuccinimidylsuberat</i> |
| EBSS | <i>Earle's Balanced Salt Solution</i> |
| EC1 | erste extrazelluläre Schleife von LIMP-1 |
| EC2 | zweite extrazelluläre Schleife von LIMP-1 |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | <i>Ethylendiamintetraacetat</i> |
| EE | <i>Early endosome</i> (frühes Endosom) |
| eGFP | <i>enhanced Green Fluorescent Protein</i> |
| <i>emp</i> | <i>epithelial membrane protein</i> (epitheliales Membranprotein) |
| Endo H | <i>Endoglykosidase H</i> |
| ER | <i>Endoplasmatisches Reticulum</i> |
| ERAD | <i>ER-Associated Degradation</i> |
| ERT | <i>Enzyme Replacement Therapy</i> (Enzym-Substitutions-Therapie) |
| ES | embryonale Stammzelle |
| FA | Formaldehyd |
| FACS | <i>Fluorescence Activated Cell Scanning</i> (Durchflusszytometrie) |
| FcεRI | hoch affiner IgE-Rezeptor |
| FCS | <i>Fetal Calf Serum</i> (fötales Kälberserum) |
| FITC | <i>Fluoresceinisothiocyanat</i> |
| FSC | <i>Forward Scatter</i> (Vorwärtsstreulicht) |
| g | Erdschwerebeschleunigung (Maßeinheit der Zentrifugalkraft) |
| GAPDH | <i>Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase</i> |
| GGAs | <i>Golgi-localized, γ-ear containing, ARF-binding proteins</i> |
| gKG | Gramm Körpergewicht |
| GlcNAc | <i>Glukose-N-Acetyl</i> (-Rest) |
| h | human |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure |
| HIV-1 | humaner Immundefizienz-Virus 1 |
| HRP | <i>Horse-Radish-Peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase) |
| ICD | <i>I-Cell-Disease</i> |
| Ig | Immunglobulin |
| IP | Immunopräzipitation |
| IVCs | <i>Individually Ventilated Cages</i> |
| kb | <i>Kilobasenpaar</i> |
| kDa | <i>Kilodalton</i> (Masseneinheit von Proteinen) |
| KDEL | Lysin-Aspartat-Glutamat-Leucin (ER-Retentionsmotiv) |
| KLH | <i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i> (Hämocanin der Schlüssellochnapfschnecke) |
| <i>ko</i> | <i>knock-out</i> |
| l | Liter |
| LAMP | <i>Lysosome-Associated Membrane Protein</i> (lysosomal assoziiertes Membranprotein) |
| LB | <i>Luria Broth</i> |
| LE | <i>Late endosome</i> (spätes Endosom) |
| LGP85 | <i>Lysosomal Glycoprotein of 85 kDa</i> |
| LIMP | <i>Lysosomal Integral Membrane Protein</i> (lysosomales integrales Membranprotein) |
| LPS | <i>Lipopolysaccharid</i> |
| m | murin |

| | |
|------------------|---|
| M | <u>m</u> olar, Mol/Liter |
| μm | <u>M</u> ikrometer |
| mM | <u>m</u> illimolar |
| μM | <u>m</u> ikromolar |
| mA | <u>M</u> illiampere (Stromeinheit) |
| mAb | <u>m</u> onoclonal <u>A</u> ntibody (monoklonaler Antikörper) |
| MΦ | Makrophage |
| MBP | <u>M</u> ye ^l <u>i</u> n <u>b</u> asisches <u>P</u> rotein |
| MCS | <u>M</u> ultiple <u>C</u> loning <u>S</u> ite |
| MEF | <u>m</u> urine <u>e</u> mbryonale <u>F</u> ibroblasten |
| MFI | <u>m</u> ittlere <u>F</u> luoreszenzintensität |
| mg | <u>M</u> illigramm |
| μg | <u>M</u> irkogramm |
| MHC-II | <u>M</u> ajor <u>H</u> istocompatibility <u>C</u> omplex class II (Haupthistokompatibilitätskomplex II) |
| min | <u>M</u> inute |
| ml | <u>M</u> illiliter |
| μl | <u>M</u> ikroliter |
| M6P | <u>M</u> annose- <u>6</u> - <u>P</u> hosphat (-Rest) |
| MPR | <u>M</u> annose- <u>6</u> - <u>P</u> hosphat <u>r</u> ezeptor |
| MPR46 | 46 kDa <u>M</u> annose- <u>6</u> - <u>P</u> hosphat <u>r</u> ezeptor |
| MPR300 | 300kDa <u>M</u> annose- <u>6</u> - <u>P</u> hosphat <u>r</u> ezeptor |
| mRNA | <u>m</u> essenger <u>R</u> NA |
| MVB | <u>M</u> ulti <u>V</u> esicular <u>B</u> ody |
| N- | amino- |
| NCS | <u>N</u> ewborn <u>C</u> alf <u>S</u> erum (Neugeborenes Kälberserum) |
| NET | <u>N</u> atriumchlorid- <u>E</u> DTA- <u>T</u> ris (-Puffer) |
| NK-Zellen | natürliche <u>K</u> iller <u>z</u> ellen |
| nm | <u>N</u> anometer |
| OD | <u>O</u> ptische <u>D</u> ichte |
| OVA | <u>O</u> valbumin |
| P0 | <u>P</u> rotein <u>Z</u> ero (Myelinprotein des peripheren Nervensystems) |
| p.a. | <u>p</u> ro <u>a</u> nalyse (= für analytische Zwecke) |
| PACS-1 | <u>P</u> hosphofurin <u>A</u> cidic <u>C</u> luster- <u>S</u> orting <u>P</u> rotein 1 |
| PAGE | <u>P</u> olyacrylamid- <u>G</u> elelektrophorese |
| PBS | <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung) |
| pCO ₂ | Kohlendioxidpartialdruck |
| PCR | <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction (Polymerasekettenreaktion) |
| PE | <u>P</u> hycoerythrin |
| PECAM-1 | <u>P</u> latelet/ <u>E</u> ndothelial <u>C</u> ell <u>A</u> dhesion <u>M</u> olecule 1 |
| PenStrep | 100U/ml <u>P</u> enicillin und 0,1mg/ml <u>S</u> treptomycin |
| PFA | <u>P</u> araformaldehyd |
| pH | <u>p</u> ondus <u>H</u> ydrogenii oder <u>p</u> otentia <u>H</u> ydrogenii (<u>p</u> ondus = Gewicht; <u>p</u> otentia = Kraft; <u>h</u> ydrogenium = Wasserstoff) |
| PI4-Kinase | Typ-II- <u>P</u> hosphoinositol- <u>4</u> - <u>K</u> inase |
| PMP22 | peripheres <u>M</u> ye ^l <u>i</u> nprotein 22kDa |
| PMN | <u>P</u> olymorphonuclear <u>l</u> eukocyte (neutrophiler Granulozyt) |
| PMSF | <u>P</u> henyl <u>m</u> ethylsulfonylfluorid, Serin- und Cystein-Proteaseinhibitor |
| PNGase F | N-Glykosidase F |
| pO ₂ | Sauerstoffpartialdruck |
| PPP | <u>P</u> latelet <u>P</u> oor <u>P</u> lasma (Thrombozyten-armes Plasma) |
| PRP | <u>P</u> latelet <u>R</u> ich <u>P</u> lasma (Thrombozyten-reiches Plasma) |
| PVDF | <u>P</u> olyvinylidendifluorid |

| | |
|--------|---|
| RNA | <u>R</u> ibonucleic <u>a</u> cid (Ribonukleinsäure) |
| ROMK | <u>R</u> enal <u>O</u> uter <u>M</u> edullary <u>P</u> otassium (<u>K</u> ⁺) <u>C</u> hannel (= <i>Inwardly Rectifying K⁺-Channel 1.1</i> , Kir1.1) |
| rpm | <u>r</u> otations <u>p</u> er <u>m</u> inute (Umdrehungen pro Minute) |
| RT | <u>R</u> oom <u>T</u> emperature (Zimmertemperatur) |
| RT-PCR | <u>R</u> everse- <u>T</u> ranskriptase <u>P</u> CR |
| s. | siehe |
| SAP | <u>S</u> phingolipid- <u>A</u> ktivatorprotein |
| SapC | <u>S</u> aposin <u>C</u> |
| SDS | <u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate (Natriumdodecylsulfat) |
| sec | <u>S</u> ekunde |
| SSC | <u>S</u> ideward <u>S</u> catter (Seitwärtsstreulicht) |
| siRNA | <u>s</u> mall <u>i</u> nterfering RNA |
| SR-BI | <u>S</u> cavenger- <u>R</u> eceptor class <u>B-I</u> |
| SRT | <u>S</u> ubstrat- <u>R</u> eduktions- <u>T</u> herapie |
| Std | <u>S</u> tunde |
| SV | <u>S</u> imian <u>V</u> irus |
| Tab. | <u>T</u> abelle |
| TAE | <u>T</u> ris- <u>A</u> cetate- <u>E</u> DTA (-Puffer) |
| TBS(T) | <u>T</u> ris <u>B</u> uffered <u>S</u> aline (Tris-gepufferte Kochsalzlösung) (+ 0,1% Tween-20) |
| TCA | <u>T</u> richloroacetic <u>a</u> cid (Trichloressigsäure) |
| Temed | <u>N</u> , <u>N</u> , <u>N</u> ', <u>N</u> '- <u>T</u> etramethylethylendi <u>a</u> min |
| TEMs | <u>T</u> etraspanin- <u>E</u> nriched <u>M</u> icrodomains |
| TIP47 | <u>T</u> ail <u>I</u> nteracting <u>P</u> rotein of <u>47</u> kDa |
| TGN | <u>t</u> rans- <u>G</u> olgi- <u>N</u> etzwerk |
| TLC | <u>T</u> hin- <u>L</u> ayer <u>C</u> hromatography (Dünnschicht-Chromatographie) |
| TM4 | <u>T</u> ransmembran <u>4</u> |
| TM4SF | <u>T</u> ransmembran <u>4</u> <u>S</u> uperfamilie |
| TNP | <u>T</u> rinetrophenol |
| TSP-1 | <u>T</u> hrombospondin-1 |
| TSSC6 | <u>T</u> umor- <u>S</u> uppressing <u>S</u> ubchromosomal <u>T</u> ransferable <u>F</u> ragment <u>c</u> DNA <u>6</u> |
| U46 | <u>U</u> 46619 (stabiles Thromboxan A ₂ Analog) |
| u. a. | unter <u>a</u> nderem |
| UK | <u>U</u> nited <u>K</u> ingdom (Großbritannien) |
| ∞ | unendlich |
| U | <u>U</u> nit (Einheit der enzymatischen Aktivität) |
| UV | <u>u</u> ltraviolett |
| V | <u>V</u> olt (Spannungseinheit) |
| wt | <u>W</u> ildtyp |
| x | -fach |
| z. B. | zum <u>B</u> eispiel |

1 Einleitung

1.1.1 Das Lysosom

Lysosomen wurden erstmalig 1959 von Christian de Duve beschrieben (de Duve, 1959; de Duve, 2005). Es handelt sich bei ihnen um Organellen der tierischen Zelle, die von einer einzelnen Membran umgeben sind, einen sauren pH-Wert von ca. 5 besitzen und sich durch einen hohen Gehalt an sauren Hydrolasen auszeichnen (de Duve, 1959). Der saure pH-Wert von ca. 5,0 wird von einer H^+ -ATPase des vakuolären Typs erzeugt, die ständig unter Hydrolyse von ATP Protonen aus dem Zytoplasma in das Innere des Lysosoms pumpt (Forgac, 2000). Lysosomen variieren in Abhängigkeit vom Zelltyp und den abzubauenen Substraten stark in ihrer Gestalt und Größe. Die meisten Lysosomen besitzen bei einem Durchmesser von $<1 \mu m$ eine sphärische, ovale oder tubuläre Form (Lüllmann-Rauch, 2005). Weitere Charakteristika von Lysosomen sind stark glykosylierte Membranproteine und die Abwesenheit von Mannose-6-Phosphatrezeptoren (Kornfeld, 1989).

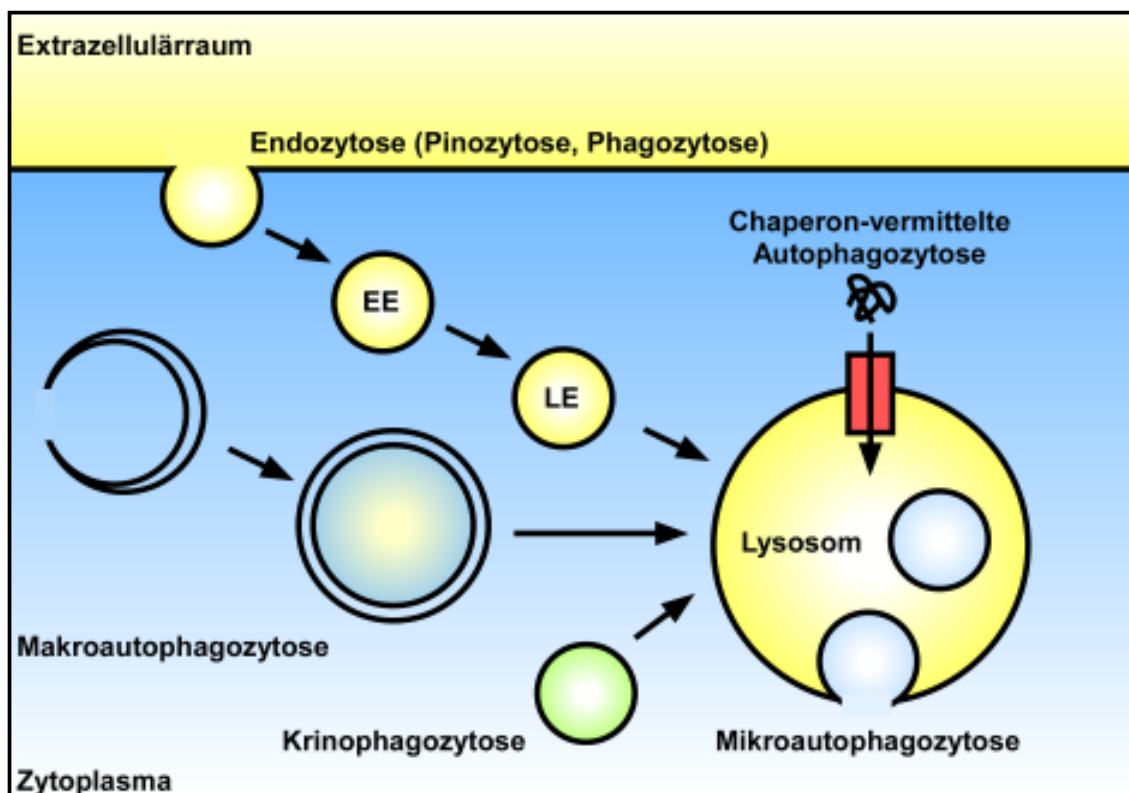


Abb. 1.1: Wege zum Lysosom (EE: frühes (*early*) Endosom, LE: spätes (*late*) Endosom) (modifiziert nach Cuervo und Dice, 1998)

Die Substrate, die im Lysosom abgebaut werden, stammen aus unterschiedlichen Quellen (s. Abb. 1.1). Extrazelluläre Substrate und Proteine der Plasmamembran gelangen durch endozytotische Wege zum Lysosom (Funato et al., 1997; Hare, 1990; Steinman et al., 1983). Sekretorische Vesikel fusionieren im Prozess der noch unverstandenen Krinophagozytose mit Lysosomen (Marzella und Glaumann, 1987). Intrazelluläre Substrate gelangen über den autophagozytotischen Weg in das Lysosom. Dieser unterteilt sich in die Chaperon-vermittelte Autophagozytose, in die Mikro- und in die Makroautophagozytose (Cuervo und Dice, 1998).

1.2 Der Mannose-6-Phosphatrezeptor-abhängige Transport lysosomaler Proteine

Mehr als 50 verschiedene saure Hydrolasen sind am Abbau von Proteinen, Kohlenhydraten, Lipiden und Nukleinsäuren im Lysosom beteiligt. Diese Hydrolasen werden als enzymatisch inaktive Vorläuferproteine im rauen endoplasmatischen Reticulum (ER) synthetisiert, wo sie an Asparaginresten mit Oligosacchariden versehen werden (N-Glykosylierung), die terminale Mannosereste enthalten (Storch und Braulke, 2005). Im *cis*-Golgi wird bei den meisten lysosomalen Enzymen eine Signalregion mit zwei oder drei Lysinresten von der Glukose-N-Acetyl (GlcNAc)-Phosphotransferase erkannt (Tikkanen et al., 1997). Diese überträgt auf die terminalen Mannosereste der N-Glykane der Hydrolasen - und auch anderer lysosomaler Proteine - Glukose-N-Acetyl (GlcNAc)-Phosphatreste. Bei anschließender Abtrennung des GlcNAc-Restes durch ein zweites Golgi-Enzym entsteht ein terminaler Mannose-6-Phosphatrest (M6P) (Lazzarino und Gabel, 1988). Die so markierten Proteine werden von den Mannose-6-Phosphatrezeptoren im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) erkannt.

Säugetierzellen besitzen zwei Arten von Mannose-6-Phosphatrezeptoren (MPRs): den 46 kDa großen MPR (MPR46) und den 300 kDa großen MPR (MPR300) (Ghosh et al., 2003). MPR46 wird auch als Kationen-abhängiger MPR (CD-MPR) genannt, da er zur Bindung seiner Liganden zweiwertige Kationen benötigt. Dagegen wird MPR300 als Kationen-unabhängiger MPR (CI-MPR) bezeichnet. Es handelt sich bei beiden Proteinen um Typ-I-Transmembranproteine (Wickner und Lodish, 1985). MPRs konnten in hohen Konzentrationen in den Membranen des *trans*-Golgi-Netzwerkes (TGN) sowie in endosomalen Membranen nachgewiesen werden, während sie in der Plasmamembran nur in geringen Konzentrationen auftreten und die lysosomale Membran durch das Fehlen von MPRs charakterisiert ist (Ghosh et al., 2003; Storch und Braulke, 2005).

Die Mannose-6-Phosphatreste der lysosomalen Hydrolasen binden im TGN an die MPRs. Die MPRs werden über ein bisher unbekanntes Motiv vom Adaptorprotein-Komplex 1 (AP-1) erkannt und es kommt zur Abschnürung von Clathrin-umhüllten Vesikeln, die die MPRs und deren „Fracht“ enthalten (Storch und Braulke, 2005). Für diesen anterograden Transport der MPRs sind außerdem die *Golgi-localized, γ -ear containing, ARF-binding proteins* (GGAs) erforderlich. Durch Ablösung der Clathrinhüllen entstehen Transportvesikel (Campbell et al., 1983; Lemansky et al., 1987), welche mit Endosomen fusionieren. Aufgrund der Senkung des pH-Wertes während der Reifung von frühen zu späten Endosomen dissoziieren die lysosomalen Proteine von den MPRs (Dahms und Kornfeld, 1989). In den späten Endosomen wird durch eine bisher nicht identifizierte Mannose-6-Phosphatase der terminale Phosphatrest von den Mannoseeinheiten der Proteine abgetrennt (Bresciani et al., 1997). Durch proteolytische Prozessierung in den späten Endosomen beginnt teilweise die Reifung der Hydrolasen zu ihrer enzymatisch aktiven Form, die in den Lysosomen abgeschlossen wird (Delbruck et al., 1994; Gieselmann et al., 1983; Hasilik, 1992).

Es wurde berichtet, dass MPRs vom *Tail Interacting Protein of 47 kDa* (TIP47), das an ein Phenylalanin-Tryptophan-Motiv im zytoplasmatischen Schwanz der MPRs bindet, am Übertritt in das lysosomale Kompartiment gehindert wird (Diaz und Pfeffer, 1998; Schweizer et al., 1997). In Interaktion mit AP-1, Rab9 und dem *Phosphofurin Acidic Cluster-Sorting Protein 1* (PACS-1) vermittelt TIP47 anschließend vermutlich den retrograden Transport der MPRs in Clathrin-umhüllten Vesikeln vom endosomalen Kompartiment zum TGN (Ghosh et al., 2003).

Die MPRs zyklisieren nicht nur zwischen späten Endosomen und dem TGN, sondern unterliegen zusätzlich einem Kreislauf zwischen dem TGN und der Plasmamembran. Lysosomale Hydrolasen/Proteine, die im TGN fehlsortiert und in den extrazellulären Raum sekretiert wurden, können so doch noch von MPRs gebunden und zum Lysosom transportiert werden. Obwohl sowohl MPR46 als auch MPR300 in der Plasmamembran nachgewiesen werden konnten, scheint nur der MPR300 zur Bindung und Endozytose lysosomaler Proteine an der Zelloberfläche fähig zu sein (Duncan und Kornfeld, 1988; Ma et al., 1991; Stein et al., 1987).

1.3 Der Mannose-6-Phosphatrezeptor-unabhängige Transport lysosomaler Proteine

Auch wenn die meisten lysosomalen Enzyme MPR-abhängig zum Lysosom transportiert werden, gibt es auch einige, die nicht diesen Weg nehmen. Wie diese MPR-unabhängigen Hydrolasen zum Lysosom gelangen, ist bisher weitestgehend unverstanden. Erste Hinweise auf den MPR-

unabhängigen Transport lysosomaler Hydrolasen wurden in Fibroblasten von Patienten gefunden, die unter der sogenannten *I-Cell-Disease* (ICD, Mukulipidose II, OMIM: #252500) leiden.

Bei der ICD liegen Mutationen im Gen der GlkNAc-Phosphotransferase vor, wodurch keine terminalen M6P-Reste auf lysosomale Enzyme übertragen werden. Daraufhin wird eine Vielzahl dieser Hydrolasen in den extrazellulären Raum abgegeben (Ginsel und Fransen, 1991; Glickman und Kornfeld, 1993; Neufeld, 1991). In vielen verschiedenen Zelltypen, z.B. B-Zellen, und Organen wie Leber, Milz, Niere und Gehirn werden aber dennoch normale Aktivitäten bestimmter lysosomaler Enzyme gemessen (Glickman et al., 1996; Kornfeld und Sly, 2000). Ein Beispiel hierfür ist die unveränderte α -L-Fukosidase-Aktivität in B-Lymphoblasten von ICD-Patienten (Dicioccio und Miller, 1993).

Ähnliche Beobachtungen eines MPR-unabhängigen Transportes wurden in $\text{MPR46}^{-/-}/\text{MPR300}^{-/-}$ -Mäusen gemacht, wo bestimmte Enzyme, z.B. die β -Hexosaminidase oder die β -Glukoronidase in Hepatozyten, Splenozyten und Thymozyten nach wie vor zum Lysosom transportiert werden, während der größte Teil anderer lysosomaler Enzyme fehlsortiert wird (Dittmer et al., 1998; Dittmer et al., 1999). Ein weiteres Beispiel für ein MPR-unabhängig transportiertes lysosomales Enzym ist die Protease Cathepsin D, die in MPR-defizienten Thymozyten nach wie vor ins Lysosom gelangt, während sie von Hepatozyten und Fibroblasten sekretiert wird (Dittmer et al., 1999).

Interessanterweise scheint in der Leberzelllinie HepG2 der Transport von Cathepsin D ebenfalls MPR-unabhängig zu erfolgen (Rijnboutt et al., 1991). Eine Behandlung der Zellen mit Tunikamycin, einer Substanz, die jegliche N-Glykosylierung vollständig unterbindet und dadurch auch keine M6P-Markierung stattfinden kann, hat keinen Einfluss auf die lysosomale Lokalisation von Cathepsin D. Ebenfalls scheint Cathepsin C in Morris Hepatoma 7777-Zellen MPR-unabhängig zum Lysosom zu gelangen (Mainferme et al., 1985).

Auch das lysosomale Protein Prosaposin wird MPR-unabhängig zu den Lysosomen transportiert. Bei Prosaposin handelt es sich um das Vorläuferprotein der vier Sphingolipid-Aktivatorproteine Saposin A, B, C und D, die im späten Endosom/Lysosom durch hydrolytische Spaltung entstehen (O'Brien und Kishimoto, 1991). Saposine dienen als Kofaktoren für verschiedene saure Lipidasen (Schuette et al., 2001). Der genaue Wirkungsmechanismus der Saposine ist bisher wenig verstanden. Saposin B scheint als eine Art „physiologische Detergenz“ 1:1-Komplexe mit Glykolipiden, z.B. sulfatiertem Galaktosylceramid, einer Membran einzugehen und macht diese so für Lipasen verfügbar (Schuette et al., 2001). Saposin C wirkt dagegen wahrscheinlich als

direkter allosterischer Aktivator der β -Glukocerebrosidase (Berent und Radin, 1981; Morimoto et al., 1990) und vermittelt darüber hinaus als eine Art Anker die Bindung des Enzyms an die Membran (Vaccaro et al., 1995; Vaccaro et al., 1999). Einige Hinweise deuten darauf hin, dass Prosaposin über Sortilin, ein Transmembranprotein des Golgi-Apparates, direkt zum endosomalen/lysosomalen Kompartiment transportiert wird (Lefrancois et al., 2003).

Ein weiteres MPR-unabhängig transportiertes lysosomales Protein ist die β -Glukocerebrosidase (β GC). In ICD-Fibroblasten bleibt die β GC nach wie vor intrazellulär lokalisiert, was darauf hindeutet, dass andere Signale als M6P-Reste für den Transport dieses Enzyms verantwortlich sind (Aerts et al., 1988; van Dongen et al., 1985). Wie die β -Glukocerebrosidase zum Lysosom transportiert wird, war bislang unbekannt.

1.4 Die lysosomale Membran und ihre Proteine

Eine der wichtigsten Aufgaben der lysosomalen Membran ist die Abtrennung der luminalen sauren Hydrolasen vom Rest der Zelle, um eine unkontrollierte Degradierung anderer Zellbestandteile zu verhindern (Eskelinen et al., 2003). Weitere Aufgaben der lysosomalen Membran sind die Ansäuerung der lysosomalen Matrix, die Weitergabe lysosomaler Enzyme, die Vermittlung der Verschmelzung von Lysosomen mit anderen Organellen und der Transport von Abbauprodukten ins Zytoplasma (Saftig, 2005). Die Membran der Lysosomen besteht aus Membranproteinen, Cholesterol und einer charakteristischen Zusammensetzung von Phospholipiden (Bleistein et al., 1980). Die Innenseite ist von einer Glykokalyx überzogen, die die Membran vor den lysosomalen Hydrolasen schützen soll (Lloyd und Forster, 1986; Neiss, 1984). Transporter in der lysosomalen Membran schleusen die von den sauren Hydrolasen gebildeten Monomere, z.B. Aminosäuren (Schneider et al., 1984), Fettsäuren (Rome et al., 1983), Kohlenhydrate (Renlund et al., 1986), Cholesterin (McGookey et al., 1983) und Nukleoside (Adra et al., 1996) ins Zytosol, wo diese (wieder)verwertet werden.

Über 50% der lysosomalen Transmembranproteine stellen die sogenannten LAMPs (*Lysosome-Associated Membrane Proteins*) und LIMPs (*Lysosomal Integral Membrane Proteins*) dar (Andrejewski et al., 1999; Marsh et al., 1987). Diese Proteine zeichnen sich durch eine ausgeprägte Glykosylierung und durch eine hohe Resistenz gegenüber der Degradierung durch lysosomale Hydrolasen aus.

Bei LAMP-1 und LAMP-2 handelt es sich um Typ I-Transmembranproteine mit einer großen luminalen Ektodomäne und einem kurzen zytoplasmatischen Schwanz, die eine 37 %-ige

Homologie in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen (Saftig, 2005). Während eine LAMP-1-defiziente Maus nur einen wenig auffälligen Phänotyp aufweist (Andrejewski et al., 1999), sterben LAMP-2-defiziente Mäuse häufig kurz nach der Geburt (Tanaka et al., 2000). Die Ansammlung von Autophagosomen in den Geweben dieser Mäuse ist ähnlich wie bei Patienten, die an der Danon-Krankheit leiden, und weist auf eine wichtige Rolle von LAMP-2 bei autophagozytotischen Prozessen hin (Eskelinen et al., 2002).

Lysosomale Membranproteine werden von zytosolischen Adaptorprotein (AP)-Komplexen AP-1 und AP-3 vermittelt zum Lysosom transportiert. Die Adaptorprotein-Komplexe binden an spezifische Erkennungssequenzen, d.h. Tyrosin- oder Di-Leucin-Motive, innerhalb der zytosolischen Domänen der lysosomalen Membranproteine (Bonifacino und Dell'Angelica, 1999; Marks et al., 1997; Schmid, 1997).

1.5 LIMP-1

1.5.1 Tetraspanine

Das *Lysosomal Integral Membrane Protein 1* (LIMP-1) gehört zur Familie der Tetraspanine (Transmembran 4 (TM4) Superfamilie, TM4SF, Tetraspanfamilie). Bis heute konnten über 33 verschiedene Familienmitglieder in Säugetieren identifiziert werden (Berditchevski und Odintsova, 2007), 37 in *Drosophila melanogaster* und 20 in *Caenorhabditis elegans* (Hemler, 2001). Fast alle Tetraspanine sind in großen Mengen in der Plasmamembran verschiedener Zelltypen anzutreffen (Le Naour et al., 2006). Sie kommen aber auch im endosomalen Kompartiment sowie in den internalisierten Vesikeln von *multivesicular bodies* (MVBs) vor (Berditchevski und Odintsova, 2007), wie u.a. für die Tetraspanine CD37, CD53, CD81 und CD82 in B-Lymphozyten gezeigt werden konnte (Escola et al., 1998).

Tetraspanine durchspannen viermal die Membran und bilden dabei eine kleine und eine große extrazelluläre Schleife (s. Abb. 1.2 A; Levy und Shoham, 2005a). Die zytoplasmatischen Amino- und Carboxytermini sind kurz. Sie bestehen typischerweise aus 8 - 21 Aminosäuren (Hemler, 2005). Konservierte polare Asparagin-, Glutamin- und Glutamatreste in den Transmembrandomänen 1, 3 und 4 könnten durch Ausbildung intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen zu einer Stabilisierung der Tertiärstruktur des Tetraspanins beitragen. Auf der anderen Seite könnten sie an der Bildung von homo- oder heteromeren Komplexen verschiedener Proteine beteiligt sein (Stipp et al., 2003). Alle bisher untersuchten Tetraspanine, u.a. CD9 und CD151, wiesen Palmitoylierungen an relativ konservierten, membrannahen Cysteinresten auf, die

vermutlich eine wichtige Rolle bei der Interaktion von Tetraspaninen miteinander und zu anderen Proteinen spielen (Charrin et al., 2002; Stipp et al., 2003).

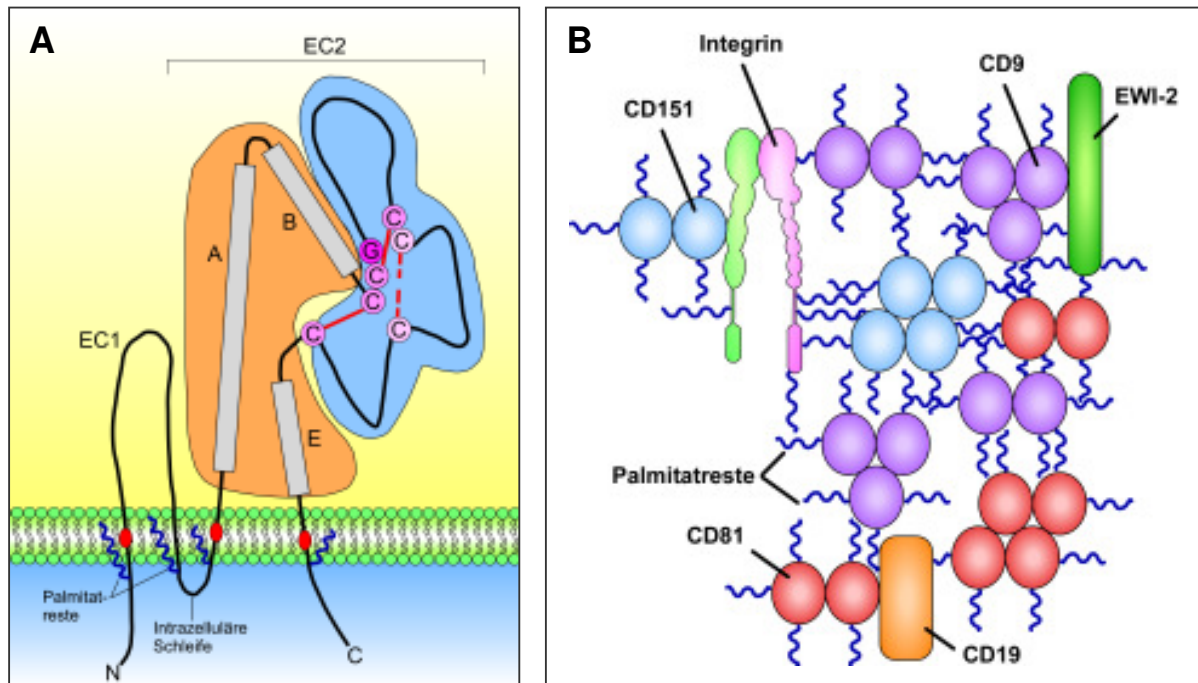


Abb. 1.2: Strukturelle Eigenschaften der Tetraspanine. A) Tetraspanine verfügen über vier Transmembrandomänen, eine kurze extrazelluläre Schleife (EC1), eine sehr kurze intrazelluläre Schleife (typischerweise vier Aminosäuren) und eine größere extrazelluläre Schleife (EC2). Die N- und C-Termini sind mit meistens 8 - 21 Aminosäuren relativ kurz. Die EC2 kann in eine konstante Region (orangefarben, enthält die Helices A, B und E) und in eine variable Region (blau) unterteilt werden, die Interaktionen zu verschiedenen anderen Proteinen vermittelt. Während die meisten Protein-Protein-Interaktionsstellen und die Epitope monoklonaler Antikörper in der EC2 liegen, ist wenig über die Struktur und Funktion der EC1 bekannt. Alle Tetraspanine weisen ein CCG-Motiv nach der Helix B und zwei weitere konservierte Cysteinreste auf, die intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden (rote Linien). Viele Tetraspanine enthalten zwei weitere Cysteinreste, die ebenfalls über eine Disulfidverbindung miteinander verbunden sind (gestrichelte rote Linie). Die Transmembrandomänen 1, 3 und 4 enthalten typischerweise polare Aminosäurereste, (Asparagin, Glutamin und Glutamat, rote Ovale), die vermutlich sowohl intra- als auch intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können. Fast alle Tetraspanine besitzen membrannahe Cysteinreste, die palmitoyliert werden (dunkelblaue „Schlangenlinien“). B) Tetraspanine bilden zahlreiche direkte Interaktionen mit verschiedenen Proteinen aus. Es werden Homodi-, -tri- und -tetramere gebildet, aber auch Heteromere mit anderen Transmembranproteinen wie Integrinen, dem B-Zell-Korezeptor CD19 oder dem zur Immunglobulin-Superfamilie gehörenden EWI-2. Darüber hinaus bilden die Tetraspanine ein großes Netzwerk, das durch Palmitoylierungen stabilisiert wird und wodurch zahlreiche Proteine indirekt miteinander verknüpft werden. (modifiziert nach Hemler, 2005)

Viele Tetraspanine zeigen die Tendenz, mit anderen Molekülen wie Proteinen der Immunoglobulinsuperfamilie, Proteoglykanen, Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren, Signalenzymen, Integrinen sowie anderen Tetraspaninen zu interagieren (Hemler, 2001; Hemler, 2005; Le Naour et al., 2006; Levy und Shoham, 2005a; Levy und Shoham, 2005b; Maecker et al., 1997). Diese Interaktionen führten zu der Theorie, dass Tetraspanine eine Rolle als „molekulare Vermittler“ spielen, indem sie spezifische Proteine auf der Zelloberfläche gruppieren und so die Bildung und Stabilität von funktionellen Signalkomplexen verstärken (s. Abb. 1.2 B). Solche Tetraspanin-Komplexe sind an verschiedenen zellulären und pathologischen Prozessen beteiligt wie der Zellaktivierung, Adhäsion, Motilität, Differenzierung und Krebs (Maecker et al., 1997; Yunta und Lazo, 2003).

1.5.2 Die Struktur von LIMP-1

LIMP-1 ist ein typisches Tetraspanin mit einem 26 kDa Proteinrückgrad, bestehend aus 237 Aminosäuren (Metzelaar et al., 1991). Es ist stark homolog zwischen Mensch, Maus und Ratte mit über 80 % Identität sowohl auf der Nukleotid- als auch auf der Aminosäureebene (Miyamoto et al., 1994). Drei mögliche N-Glykosylierungsstellen (N129, N149 und N171) wurden in der großen extrazellulären Schleife entdeckt (Hotta et al., 1988), die zumindest teilweise Oligosaccharide des komplexen Typs tragen (Barriocanal et al., 1986; Hildreth et al., 1991; Maecker et al., 1997). Die Glykosylierung führt zu einem Zuwachs der molekularen Masse auf ca. 65 kDa (Vennegoor et al., 1985). LIMP-1 scheint wie die meisten Tetraspanine zumindest eine Palmitoylierungsstelle im N-Terminus aufzuweisen (Charrin et al., 2002; Stipp et al., 2003). Ein Glycin-Tyrosin-Motiv im elf Aminosäuren langen zytoplasmatischen Carboxyterminus von LIMP-1 ist für den Adaptorprotein 3 (AP-3)-abhängigen Transport des Proteins zum Lysosom verantwortlich (Hunziker et al., 1996; Le Borgne et al., 1998; Peters und von Figura, 1994; Rous et al., 2002).

1.5.3 Vorkommen und postulierte Funktionen von LIMP-1

LIMP-1 ist in vielen verschiedenen Zelltypen im spät endosomalen/lysosomalen Kompartiment und teilweise in der Plasmamembran zu finden. Das Protein ist besonders stark in Leukozyten wie neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert, woher auch der alternative Name CD63 für LIMP-1 resultiert (Sincock et al., 1997). Außerdem kommt LIMP-1 in den multivesikulären Körperchen (MVBs) und in den daraus entstehenden α -Granula sowie in den

dichten Granula der Blutplättchen vor, die nach der Aktivierung der Thrombozyten mit der Plasmamembran fusionieren, wodurch das Protein an die Zelloberfläche gelangt. Die Präsenz auf den Blutplättchen führte zu weiteren, alternativen Namen: Granulophysin oder 40 kDa großes Blutplättchen-Glykoprotein (*platelet glycoprotein of 40 kDa*; Pltgp40, Azorsa et al., 1991; Heijnen et al., 1998; Hildreth et al., 1991; Israels et al., 1992; Nishibori et al., 1993).

Obwohl LIMP-1 bereits in den frühen 90er Jahren entdeckt wurde, ist wenig über die eigenständigen bzw. genauen Funktionen bekannt. An der Zelloberfläche befindliches LIMP-1 soll verschiedene Zelladhäsionsprozesse beeinflussen. Die LIMP-1-spezifischen monoklonalen Antikörper (mAb) 2.28 und 710F verstärkten die Anheftung und die Ausbreitung von Monozyten *in vitro* (Koyama et al., 1990). Auf der anderen Seite beeinträchtigte der gleiche Antikörper 2.28 die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten (PMN, *Polymorphonuclear leukocyte*) an Lipopolysaccharid (LPS)- oder Thrombin-stimuliertes Endothel (Toothill et al., 1990). Der monoklonale hLIMP-1-Antikörper FC5.01 führte zu einer schnellen Internalisierung des Tetraspanins, was von einer gesteigerten Migrationsfähigkeit dendritischer Zellen (DC) *in vitro* begleitet wurde (Mantegazza et al., 2004). Schließlich wurde LIMP-1 eine Rolle bei der Adhäsion und Ausbreitung von Blutplättchen zugeschrieben. Der mAb D545, der gegen ein Epitop in der zweiten extrazellulären Schleife (EC2) von LIMP-1 gerichtet ist, beeinträchtigte *in vitro* die Ausbreitung von Thrombozyten auf Fibrinogen (Israels und McMillan-Ward, 2004).

In all den von LIMP-1 beeinflussten Zelladhäsionsereignissen könnten Integrine eine wichtige Rolle spielen. Es wurden in verschiedenen Koimmunopräzipitations-Studien Interaktionen von LIMP-1 mit Integrinen beschrieben wie dem β_1 -Integrin in humanen Melanomzellen (Radford et al., 1996), dem α^3/β_1 -Integrinkomplex in Lymphozyten und Melanomzellen (Berditchevski et al., 1995; Berditchevski et al., 1996), dem α^4/β_1 -Komplex in T-Lymphoblasten (Mannion et al., 1996) und dem α^6/β_1 -Dimer in verschiedenen Zelllinien (Berditchevski et al., 1996).

In basophilen Granulozyten und Mastzellen ist LIMP-1 mit dem hoch affinen IgE-Rezeptor (Fc ϵ RI) assoziiert (Kitani et al., 1991). Der gegen LIMP-1 gerichtete mAb 12A10 inhibierte die Degranulierung von Mastzellen. Darauf basierend wurde LIMP-1 eine Bedeutung für die Weiterleitung von Signalen des Fc ϵ RI zugeschrieben, die zur Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren führen, die wiederum allergische Reaktionen auslösen (Kraft et al., 2005).

Der anti-LIMP-1-mAb 11C9 aktivierte stark zytotoxische T-Lymphozyten, was durch Zellteilung, Interleukin-2-Produktion und ausgeprägte Restimulierbarkeit charakterisiert war (Pfistershammer et al., 2004).

Tab. 1.1 Postulierte Funktionen von LIMP-1

| Funktion | Experiment | Autor |
|---|---|---|
| Anheftung von Monozyten an Gewebekulturschalen | Zelladhäsions-Assay in An- und Abwesenheit der mAb 2.28 und 710F | Koyama et al., 1990 |
| Anheftung von PMNs an Endothel | Zelladhäsions-Assay in An- und Abwesenheit des mAb 2.28 | Toothill et al., 1990 |
| Migrationsfähigkeit von DCs | Migrations-Assay in An- und Abwesenheit des mAb FC 5.01 | Mantegazza et al., 2004 |
| Ausbreitung von Thrombozyten auf Fibrinogen | <i>Spreading-Assay</i> in An- und Abwesenheit des mAb D545 | Israels und McMillan-Ward, 2004 |
| Interaktion mit β 1-Integrinen in humanen Melanomzellen | Koimmunopräzipitation (endogen) | Radford et al., 1996 |
| Interaktion mit α^3/β_1 -Integrinen in Lymphozyten und Melanomzellen | Koimmunopräzipitation (endogen) | Berditchevski et al., 1995; Berditchevski et al., 1996 |
| Interaktion mit α^4/β_1 -Integrinen in T-Lymphoblasten | Koimmunopräzipitation (endogen) | Mannion et al., 1996 |
| Interaktion mit α^6/β_1 -Integrinen in verschiedenen Zelllinien | Koimmunopräzipitation (endogen) | Berditchevski et al., 1995 |
| Degranulierung von Mastzellen | <i>in vitro</i> Degranulations-Assay in An- und Abwesenheit des mAb 12A10 | Kraft et al., 2005 |
| Aktivierung von T-Zellen | <i>in vitro</i> Proliferations-Assay in An- und Abwesenheit des mAb 11C9 | Pfistershammer et al., 2004 |
| Interaktion mit PI4-Kinase | Koimmunopräzipitation (endogen) | Berditchevski et al., 1997; Yauch und Hemler, 2000 |
| Interaktion mit dem MHC-II-Komplex in dendritischen Zellen und B-Lymphozyten | Koimmunopräzipitation (endogen) | Engering et al., 2003; Engering und Pieters, 2001; Hammond et al., 1998 |
| Endozytose der H^+, K^+ -ATPasen des Magens und des Kolons | <i>Yeast-two-Hybrid-Screen</i> , Ko-Immunopräzipitation, IHC, siRNA | Codina et al., 2005; Duffield et al., 2003 |

Die Bedeutung von LIMP-1 für Signalwege innerhalb der Zelle wird durch die Beobachtung hervorgehoben, dass LIMP-1 in verschiedenen Zelllinien sowohl in intrazellulären Vesikeln als auch in fokalen Adhäsionskontakten an der Plasmamembran mit der 55 kDa großen Typ-II-Phosphoinositol-4-Kinase (PI4-Kinase) assoziiert ist (Berditchevski et al., 1997; Yauch und

Hemler, 2000). Die zweitgenannte Interaktion schließt auch die Integrine $\alpha^3\beta_1$ sowie das Tetraspanin CD81 ein (Berditchevski et al., 1997).

Weitere Bedeutung könnte LIMP-1 in dendritischen Zellen haben, da es in unreifen dendritischen Zellen und in B-Lymphozyten einen Komplex mit dem intrazellulären Haupthistokompatibilitätskomplex II (*major histocompatibility complex class II*, MHC-II) bildet (Engering et al., 2003; Engering und Pieters, 2001; Hammond et al., 1998).

Schließlich könnte LIMP-1 auch eine wichtige Funktion als Transporter für verschiedene Membranproteine besitzen. Duffield *et al.* haben 2003 eine Rolle für LIMP-1 bei der intrazellulären Sortierung der H^+,K^+ -ATPase des Magens beschrieben. In ähnlicher Weise soll LIMP-1 mit der H^+,K^+ -ATPase im Kolon interagieren und die Oberflächenexpression dieses Proteins kontrollieren (Codina et al., 2005).

Insgesamt deuten alle in Tab. 1.1 zusammengefassten Studien auf eine wichtige Rolle von LIMP-1 bei Zelladhäsions- und Signalprozessen an der Plasmamembran verschiedener Zelltypen hin. Aber auch intrazellulär, z.B. im MHC-II-Kompartiment könnte LIMP-1 eine wichtige Funktion haben. Allerdings beruhen die meisten Überlegungen zur Funktion von LIMP-1 lediglich auf der nachgewiesenen Interaktion mit anderen Proteinen oder auf Untersuchungen mit LIMP-1-spezifischen Antikörpern, bei denen Nebeneffekte nicht ausgeschlossen werden können. Deswegen können Untersuchungen an einem LIMP-1-defizienten Mausmodell wichtige Hinweise auf die eigentliche Funktion dieses Proteins *in vivo* ergeben.

1.5.4 Die Rolle von LIMP-1 bei pathologischen Prozessen

LIMP-1 konnte bereits 1992 in der Lipoproteinhülle des humanen Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1) nachgewiesen werden (Meerlo et al., 1992). Später konnte gezeigt werden, dass das HIV-1-Protein „Gag“ in Makrophagen und T-Helferzellen in sogenannten *Tetraspanin-enriched microdomains* (TEMs) angereichert ist, die sich sowohl in der Plasmamembran als auch in intrazellulären Vesikeln befinden (Denek et al., 2007; Jolly und Sattentau, 2007; Nydegger et al., 2006). In den TEMs sind die Tetraspanine CD9, CD81, CD82 und LIMP-1 lokalisiert und es wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich die HIV-1-Virionen in diesen TEMs formieren. Monoklonale Antikörper gegen die Tetraspanine der TEMs inhibierten die Bildung der HIV-1-Virionen (Jolly und Sattentau, 2007). Interessanterweise führte ein *knock-down* des LIMP-1-Proteins mittels siRNA weder zu einer geringeren Bildungsrate der HIV-Partikel in Makrophagen noch zu einer reduzierten Infektiosität (Ruiz-Mateos et al., 2008).

Aber nicht nur bei dem Austritt des HIV-1 aus der Wirtszelle scheint LIMP-1 eine wichtige Bedeutung zuzukommen. Auch für den Eintritt des Virus in eine Zelle spielt das Tetraspanin eine große Rolle. Ein monoklonaler Antikörper gegen LIMP-1 (CLB-gran12) verhinderte *in vitro* die Infektion von Makrophagen mit HIV-1 in einem Schritt nach der Fusion des Viruspartikels mit der Plasmamembran, aber noch vor der reversen Transkription des Virengenoms (von Lindern et al., 2003). Basierend auf diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass eine rekombinant hergestellte, lösliche Form der zweiten extrazellulären Domäne (EC2) von LIMP-1, aber auch von anderen Tetraspaninen (CD9, CD81 und CD82), die Virionen-Aufnahme und damit die Replikation von HIV-1 in Makrophagen unterbinden kann (Ho et al., 2006). Daneben führt eine N-terminale Deletionsmutante von LIMP-1 zu einer Fehlsortierung des HIV-1 Korezeptors CXCR4 in intrazelluläre Vesikel und einer damit einhergehenden Blockade des Vireneintritts in die Zellen (Yoshida et al., 2008).

Bereits 2005 postulierten japanische Forscher, dass LIMP-1 als ein anti-HI-viraler Faktor die Zytotoxizität von HIV-1 im Gehirn reduzieren kann (Miura und Koyanagi, 2005). Später konnte gezeigt werden, dass in aktivierten T-Lymphozyten im Vergleich zu unstimulierten Zellen weniger LIMP-1 in die Hülle des HI-Virus inkorporiert wird, was mit einer gesteigerten Infektiosität korreliert (Sato et al., 2008).

LIMP-1 wird stark in den frühen Stadien von Melanomen gebildet, was dem Protein einen weiteren alternativen Namen, nämlich *melanoma-associated antigen 491* (ME491), einbrachte (Atkinson et al., 1984; Atkinson et al., 1985; Smith et al., 1997). Es wird auch in anderen Krebsarten wie neuroendokrinen Tumoren, adeno- oder kolorektalen Karzinomen exprimiert (Atkinson et al., 1985; Ernst et al., 1986). Da die Menge des LIMP-1-Proteins invers mit einer zunehmenden Malignität korreliert war, wurde die Hypothese aufgestellt, dass LIMP-1 eine Tumor-supprimierende Aktivität besitzt (Atkinson et al., 1984; Hotta et al., 1991; Jang und Lee, 2003; Kondoh et al., 1993; Radford et al., 1995; Radford et al., 1997).

1.6 LIMP-2

1.6.1 Struktur und Funktion von LIMP-2

LIMP-2, auch LGP85 (*Lysosomal GlycoProtein of 85 kDa*) genannt, ist ein Typ-III-Transmembranprotein, das zweimal die lysosomale Membran durchspannt (s. Abb. 1.3). Es besitzt einen 54 kDa schweren Polypeptidkern, der aus 478 Aminosäuren besteht. Je nach Spezies

und Zelltyp ist das Protein in Abhängigkeit von der N-Glykosylierung 74 - 85 kDa schwer (Saftig, 2005).

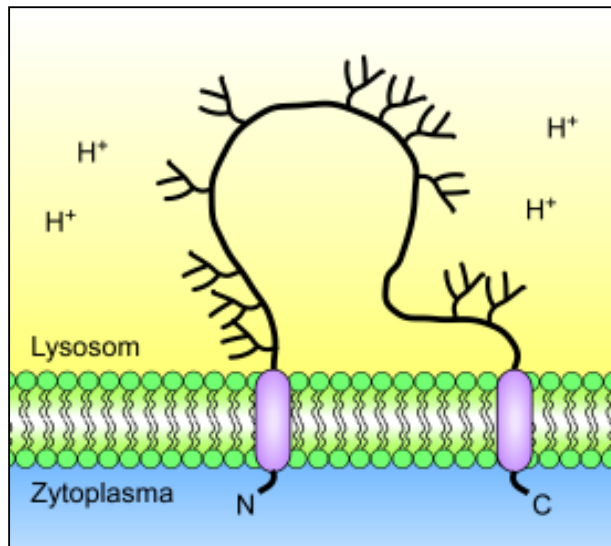


Abb. 1.3: Modell der Topologie von LIMP-2.

Die „Bäumchen“ stellen die poly-N-Acetyllaktosaminglykane und andere komplexe Oligosaccharide an den elf N-Glykosylierungsstellen dar. (modifiziert nach Eskelinen et al., 2003)

Die N-terminale Transmembrandomäne wird von einem Signalpeptid gebildet, das nicht von der endoplasmatischen Signalpeptidase geschnitten wird. Der große luminaire Bereich von LIMP-2 verfügt über elf N-Glykosylierungsstellen, die zumeist sialysierte Zuckerketten des komplexen Typs tragen. Der kurze zytoplasmatische C-Terminus ist ca. 20 - 21 Aminosäuren lang (Ogata und Fukuda, 1994; Sandoval et al., 1994). LIMP-2 wird über ein carboxyterminales Dileucin (Leucin-Isoleucin)-Motiv (DEXXXLI) zum Lysosom dirigiert (Ogata und Fukuda, 1994), an das der zytoplasmatische Adaptorkomplex AP-3 bindet (Höning et al., 1998; Vega et al., 1991).

LIMP-2 ist ein Mitglied der CD36-Familie. In Säugetieren gehört noch das Gen *Cla-1*, das auch CD36, LIMP-2 *analogous-1* (Calvo und Vega, 1993) oder *scavenger receptor class B-I* genannt wird (Acton et al., 1994), zur CD36-Familie. Bei CD36 handelt es sich um einen in der Plasmamembran befindlichen, multifunktionellen Rezeptor für u.a. Thrombospondin-1, Kollagen Typ I und IV, oxidierte *low-density* Lipoproteine, langkettige Fettsäuren und anionische Phospholipide (Krieger, 2001). Ebenfalls zählen die *Drosophila melanogaster*-Gene *Drosophila croquemort* (dCD36) (Franc et al., 1996) und *emp* (*epithelial membrane protein*) (Hart und Wilcox, 1993) sowie das *Caenorhabditis elegans*-Gen *cm08 h8* zur CD36-Familie (Sulston et al., 1992). Alle CD36-Familienmitglieder weisen eine ähnliche Topologie mit zwei Transmembrandomänen auf und die Aminosäureidentität liegt bei ca. 30 % (Kuronita et al., 2005).

Die transiente Überexpression von LIMP-2 in verschiedenen Zelllinien führte zu einer Vergrößerung früher und später Endosomen/Lysosomen, was vermutlich durch eine

Beeinträchtigung des endozytotischen Membranflusses aus den vergrößerten Zellkompartimenten heraus hervorgerufen wird (Kuronita et al., 2002). Freies Cholesterin sammelt sich in der Membran der vergrößerten Endosomen/Lysosomen an. Bei Überexpression anderer lysosomaler Membranproteine wie LAMP-1 oder LAMP-2 zeigten sich derartige Veränderungen nicht. Studien mit chimären Proteinen aus LIMP-2 und LAMP-1 zeigten, dass insbesondere der nahe der N-terminalen Transmembrandomäne gelegene Teil der luminalen Domäne von LIMP-2 wichtig für die Bildung vergrößerter Lysosomen ist, besonders wenn er durch die Transmembrandomäne nah an der lysosomalen Membran liegt (Kuronita et al., 2005). Diese Region weist große Ähnlichkeit mit dem *scavenger-receptor class B-I* (SR-BI) auf. Die N-terminale Transmembrandomäne selbst ist für den direkten Transport von LIMP-2 vom TGN zu den späten Endosomen/Lysosomen essentiell (Kuronita et al., 2005).

1.6.2 Die LIMP-2-knock-out-Maus

Das Gen, das LIMP-2 kodiert, liegt im Menschen auf Chromosom 4, in der Ratte auf Chromosom 14 und in der Maus auf Chromosom 5 (www.ensembl.org; ENSG00000138760, ENSRNOG00000002225 bzw. ENSMUST00000031377). Synonyme für *LIMP-2* sind *CD36L2*, *HLGP85*, *LIMP2*, *SR-BII* sowie *SCARB2*. Das LIMP-2-Gen umfasst in den verschiedenen Spezies jeweils zwölf Exone, von denen das erste das Startcodon und das letzte das Stoppcodon enthält. Sowohl die Nukleotidsequenz als auch das 478 Aminosäuren große Protein sind zwischen Mensch, Ratte und Maus zu $\geq 79\%$ identisch (Fujita et al., 1992; Tabuchi et al., 1997). LIMP-2-defiziente Mäuse zeichnen sich insbesondere durch drei unterschiedliche Merkmale aus. Sie entwickeln Hydronephrosen, Taubheit und eine periphere Neuropathie (Gamp et al., 2003). Vermutlich werden die Symptome der LIMP-2-defizienten Maus u.a. durch eine Fehlverteilung apikal lokalisierter Membranproteine hervorgerufen.

Die pathologische Veränderung der Niere, die Hydronephrose, wird vermutlich durch eine Fehlverteilung von Uroplakinen innerhalb der urothelialen Deckzellen verursacht. Dadurch können die Uroplakine das Epithel der Blase und des Ureters nicht mehr vor aggressiven Bestandteilen des Urins schützen und es kommt zu einer Hyperproliferation des Urothels. Die daraus resultierende Stenose führt zu einem Rückstau des Urins in die Nieren (Gamp et al., 2003).

Die Taubheit LIMP-2-defizienter Mäuse ist wahrscheinlich auf eine Fehlverteilung des Kaliumkanals KCNQ1, seiner β -Untereinheit KCNE1 und dem für viele Liganden als

Endozytoserezeptor-dienenden Protein Megalin in der *Stria vascularis* des Innenohres zurückzuführen (Knipper et al., 2006). Es kommt ab dem zweiten Lebensmonat zu einer Atrophie der *Stria vascularis* (Gamp et al., 2003). Diese dreischichtige Zellschicht in der *Scala media* ist für die Sezernierung von Kaliumionen in die Endolymphe verantwortlich. Dies ist für den Erhalt des endocochlearen Potentials essentiell und ohne dieses Potential findet kein Hörvorgang statt. Der Degeneration der *Stria vascularis* in den LIMP-2-defizienten Mäusen folgt im sechsten Lebensmonat ein Verlust der äußeren Haarzellen, gefolgt von einem Abbau der inneren Haarzellen (Gamp et al., 2003). Schließlich kommt es als Folge der nicht mehr vorhandenen Ausschüttung der Transmitter zu einer Reduktion der Neuronen im Spiralganglion (Gamp et al., 2003).

Des Weiteren sind die Durchmesser der peripheren Nerven der LIMP-2-defizienten Maus bis zu 150% dicker als die Nerven gleich alter Kontrolltiere. Dieser Effekt wird begleitet von einer Reduktion der Anzahl der einzelnen Nervenfasern in einem Nerv. Die Verdickung des Nervs kommt durch den stetigen Ab- und Aufbau der Myelinisierung durch die Schwann-Zellen zustande (Gamp et al., 2003). Es bilden sich sogenannte *onion bulbs* aus – zwiebelringartige Strukturen wie bei der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung Typ I (Suter und Scherer, 2003; Young und Suter, 2003), bei der Mutationen im PMP22- oder im P0-Gen vorliegen (Chapon et al., 1999; Maier et al., 2003; Naef und Suter, 1999; You et al., 1991). In zwölf Monate alten LIMP-2-defizienten Mäusen war die Expression der Myelinproteine PMP22, P0 und MBP reduziert (Gamp et al., 2003). Dadurch verlieren die konzentrischen Membranlamellen des Myelin den Kontakt zueinander.

1.7 Lysosomale Speichererkrankungen und Morbus Gaucher

1.7.1 Lysosomale Speichererkrankungen

Lysosomen sind, wie bereits beschrieben, neben dem Proteasom, das wichtigste Degradierungsorganell der tierischen Zelle. Die Fehlfunktion einer oder mehrerer lysosomaler Hydrolasen führt zu sogenannten lysosomalen Speichererkrankungen, bei denen sich die Substrate der jeweiligen Enzyme im Lysosom ansammeln und diese – teilweise dramatisch - anschwellen.

1.7.2 Sphingolipid-Katabolismus und Sphingolipidosen

Die häufigste lysosomale Speichererkrankung ist Morbus Gaucher. Morbus Gaucher gehört zur Untergruppe der Sphingolipidosen, bei denen der Abbau der Sphingolipide an verschiedenen Stellen im Degradationsweg unterbrochen ist (Beutler und Grabowski, 2001; Jmoudiak und Futerman, 2005; Zhao und Grabowski, 2002). Sphingolipide gehören neben den Glycerophospholipiden und Cholesterol zu den Lipidbausteinen der eukaryotischen Membran. Alle Sphingolipide enthalten die Base Sphingosin, die auf ihrem Weg durch den Golgi-Apparat mit verschiedenen Modifikationen, wie z.B. Zuckerresten, versehen werden kann.

Sphingolipide werden im Lysosom schrittweise degradiert (s. Abb. 1.4). Sie erreichen das Lysosom über den endozytotischen Vesikelfluss (Maxfield und McGraw, 2004), entweder als Teil intraendosomal/intralysosomaler Membranen oder als Teil der begrenzenden Membran (Fürst und Sandhoff, 1992).

In Anwesenheit von Sphingolipid-Aktivatorproteinen (SAPs), anderen Lipidtransferproteinen und negativ geladenen Lipiden werden die Sphingolipide der internen Vesikel dann schrittweise von lysosomalen Hydrolasen abgebaut (Kolter und Sandhoff, 2005). In Abwesenheit dieser Detergenzien sind Glykosphingolipide mit kurzen Kohlenhydratseitenketten nicht zugänglich für die löslichen, lysosomalen Hydrolasen. Bis heute wurden zwei Gene identifiziert, die für SAPs kodieren. Bei dem ersten Gen handelt es sich um das Gen für das GM2-Aktivator-Protein und bei dem zweiten um Prosaposin, das im Lysosom in die vier homologen, reifen Proteine Saposin A, B, C und D hydrolytisch gespalten wird (Kolter und Sandhoff, 2005). Das GM2-Aktivator-Protein verfügt über eine hydrophobe Tasche, in die es den Ceramidrest des Gangliosids GM2 aufnehmen kann. Auf diese Weise wird GM2 für die β -Hexosaminidase zugänglich (Fürst und Sandhoff, 1992; Wendeler et al., 2004; Wright et al., 2003).

1.7.3 Morbus Gaucher

Morbus Gaucher ist die häufigste lysosomale Speichererkrankung und gehört zur Untergruppe der Sphingolipidosen. Sie wird durch fehlende Aktivität des lysosomalen Enzyms β -Glukocerebrosidase (β GC) bedingt, was zu einer Ansammlung des Substrats Glukosylceramid führt (Brady et al., 1965; Patrick, 1965).

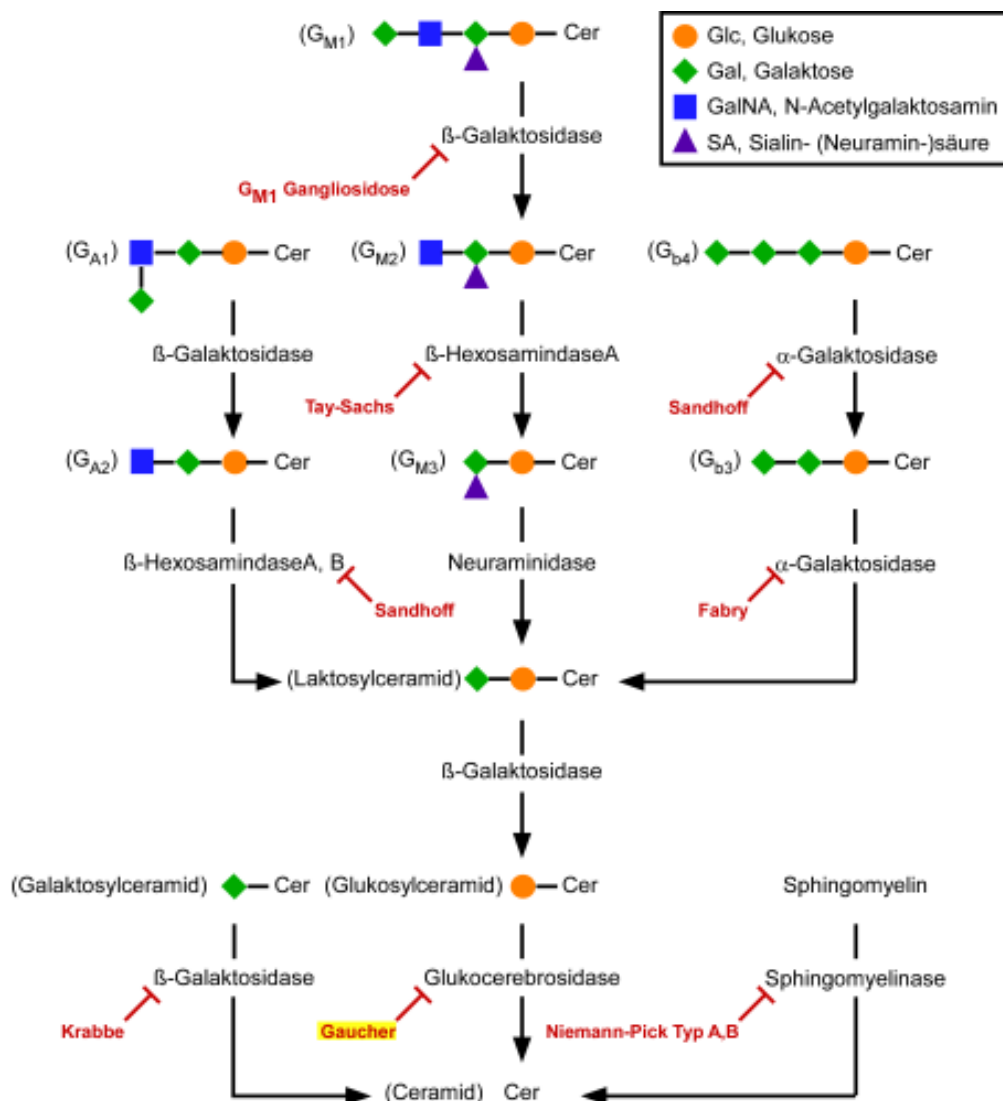


Abb. 1.4: Der Glykosphingolipid-Abbau einschließlich ausgewählter lysosomaler Speichererkrankungen (rot) wie Morbus Gaucher (gelb unterlegt), die durch Ausfall der entsprechenden Enzyme hervorgerufen werden. (modifiziert nach Sawkar et al., 2006)

Es werden drei Formen von Morbus Gaucher unterschieden (Kolter und Sandhoff, 2006). Der mildere Typ I (OMIM #230800) ist die häufigste Form von Morbus Gaucher, die durch einen nicht-neuropathischen Verlauf gekennzeichnet ist. Sie kommt mit einer Häufigkeit von 1: 50.000 - 200.000 Geburten vor. Bei den Ashkenazi-Juden ist jedes tausendste Neugeborene betroffen. Die Lebenserwartung der Betroffenen liegt zwischen 6 und 80 Jahren.

Der sehr seltene, panethnische Typ II (OMIM #230900) stellt eine akute Form von Morbus Gaucher dar, bei der das Nervensystem mit betroffen ist. Erste Symptome dieser Krankheitsform treten kurz nach der Geburt auf. Die Lebenserwartung der Patienten liegt bei unter 2 Jahren.

Die dritte Form von Morbus Gaucher (Typ III, OMIM #231000) wird als juvenil bezeichnet und stellt eine Zwischenform der beiden anderen Varianten dar. Die neurologischen Symptome setzen später ein und schreiten langsamer fort als beim Gaucher Typ II. Die Patienten haben eine Lebenserwartung von wenigen Jahren bis hin zu vier Jahrzehnten.

Bei einem kompletten Fehlen jeglicher Aktivität der β GC kommt es zu schweren Beeinträchtigungen der Hautfunktion. Die Neugeborenen werden als „*Colloidion-Babies*“ bezeichnet und versterben innerhalb des ersten Lebensjahres (Lui et al., 1988; Stone et al., 2000).

In allen Varianten von Morbus Gaucher können Hepatosplenomegalie, Anämie, Thrombozytopenie und Knochenschäden auftreten. Die Schwere der Symptome variiert stark und korreliert invers mit der restlichen Enzymaktivität der β GC (Meivar-Levy et al., 1994).

Obwohl die Enzymaktivität der β GC in allen Zelltypen reduziert ist, sind beim nicht-neuropathischen Morbus Gaucher Typ I vor allem die Makrophagen des retikuloendothelialen Systems betroffen, da diese Zellen große Mengen Glykolipide aus phagozytierten Erythrozyten abbauen müssen. Diese Makrophagen nehmen durch das sich ansammelnde Material eine typische Morphologie an, die durch eine Vergrößerung der Zelle und durch das Auftreten zytoplasmatischer linearer Einschlüsse charakterisiert ist (Kolter und Sandhoff, 2006). Nicht allein das Auftreten dieser sogenannten „Gaucher-Zellen“, sondern auch die von ihnen freigesetzten Zytokine und die damit verbundene inflammatorische Antwort (Hollak et al., 1997), könnten für die Hypertrophie der betroffenen Organe, den kortikalen Knochenverlust und die Schädigung des Knochenmarks verantwortlich sein.

In den Typen II und III von Morbus Gaucher ist zusätzlich das zentrale Nervensystem betroffen. Durch die Anhäufung von anscheinend neurotoxischem Glukosylsphingosin kommt es zu einem progressivem Verlust neuronaler Zellen (Nilsson und Svennerholm, 1982; Orvisky et al., 2000), was wiederum eine Entzündungsreaktion hervorruft (Mizukami et al., 2002).

Es gibt zur Zeit zwei wesentliche Ansätze zur Behandlung von Morbus Gaucher (Sawkar et al., 2006). Bei der Enzym-Substitutions-Therapie (*Enzyme Replacement Therapy*, ERT) wird den Patienten β -Glukocerebrosidase injiziert, die rekombinant in *chinese hamster ovary* (CHO)-Zellen (Cerezyme, Genzyme Corporation, Boston, MA, USA; Grabowski et al., 1995) hergestellt wurde. Diesem Enzym wurden enzymatisch Sialinsäuren, β -Galaktose und β -N-

Acetylgalaktosamine entfernt, sodass auf der Proteinoberfläche Mannosereste freigelegt werden, die wiederum von einem Mannoserezeptor auf den Makrophagen erkannt werden (Furbish et al., 1981). Große Nachteile dieser Behandlung sind auf der einen Seite die hohen Kosten von bis zu 500.000 US \$/Patient im Jahr (Sawkar et al., 2006). Auf der anderen Seite kann das substituierte Enzym nicht die Blut-Hirn-Schranke überwinden und ist so nicht zur Behandlung der neuropathischen Gaucher Formen II und III geeignet (Altarescu et al., 2001).

Eine weitere Möglichkeit der Behandlung von Morbus Gaucher liegt in der Substrat-Reduktionstherapie (SRT), bei der die an der Glykosylceramidbildung beteiligte Glykosyltransferase mit N-alkylierten Aminozuckern inhibiert wird (Butters et al., 2005). Die SRT ist im Vergleich zur ERT in den peripheren Organen weniger erfolgreich, aber es scheint die Glukosylceramid-Ansammlung im Gehirn reduziert zu werden (Cox et al., 2000).

Als dritte Therapie-Möglichkeit könnten kleine, gehirngängige Moleküle, die als chemische Chaperone bezeichnet werden, die Faltung bestimmter β GC-Mutanten korrigieren und ihnen Stabilität und Aktivität zurückgeben (Sawkar et al., 2006).

1.7.4 Die β -Glukocerebrosidase

Das lysosomale Enzym β -Glukocerebrosidase (β GC, Glukosylceramidase, D-Glukosyl-N-Acyl-Sphingosin-Glukohydrolase, EC 3.2.1.45) ist das Enzym, das bei der Erbkrankheit Morbus Gaucher durch Mutationen in seiner Aktivität beeinträchtigt ist. Die β GC gehört zur Familie der Glykosidhydrolasen Typ A und katalysiert die Spaltung von Glukosylceramid in β -D-Glukose und Ceramid (s. Abb. 1.5; Dvir et al., 2003). Das Enzym besteht aus 497 Aminosäuren und die glykosylierte Form hat ein molekulares Gewicht von 65 kDa (Beutler und Grabowski, 2001).

Die humane und die murine β GC sind auf Nukleotidebene zu 82 % und auf Aminosäureebene zu 86 % homolog (O'Neill et al., 1989). Während das Gen für die β GC im Menschen auf Chromosom 1 lokalisiert ist, befindet sich das Gen in der Maus auf Chromosom 3. Ein weiterer Unterschied liegt im Vorhandensein von zwei potenziellen Startcodons in der mRNA der humanen β GC (Sorge et al., 1987), während bei der Maus nur ein Startcodon identifiziert werden konnte (O'Neill et al., 1989).

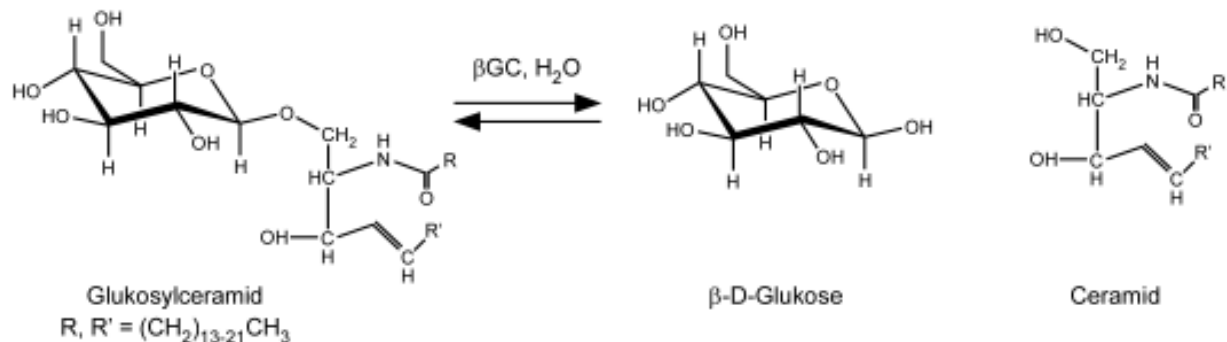


Abb. 1.5: Die β -Glukocerebrosidase katalysiert die Hydrolyse der β -glykosidischen Verbindung zwischen D-Glukose und Ceramid. (modifiziert nach Dvir et al., 2003)

Die Aufklärung der 3-dimensionalen Struktur der humanen β GC ergab, dass das Protein aus drei Domänen besteht (s. Abb. 1.6; Dvir et al., 2003). Die Domäne I setzt sich aus den Aminosäuren 1 - 27 und 383 - 414 zusammen und besteht im Wesentlichen aus drei anti-parallelen β -Faltblattsträngen. Des Weiteren befinden sich in der Domäne I zwei Disulfidbrücken und eine N-Glykosylierungsstelle, die für die *in vivo* Aktivität des Enzyms essenziell ist (Bergfussman et al., 1993). Die Domäne II setzt sich aus mehreren β -Faltblattsträngen zusammen, die eine Immunglobulin-ähnliche Gesamtstruktur ausbilden. Die katalytische Domäne III hat die Struktur eines $(\beta/\alpha)_8$ -TIM-barrels, die Homologie zu der Glykosidhydrolase-A-Familie aufweist. Mutationen, die bei Morbus Gaucher-Patienten identifiziert wurden, sind in allen drei Domänen der β GC lokalisiert (vergl. Abb. 1.6; Dvir et al., 2003).

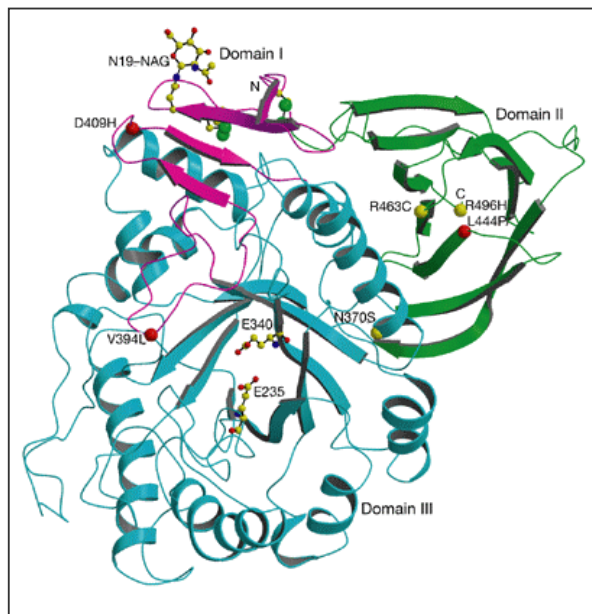


Abb. 1.6: 3-dimensionale Struktur der β -Glucocerebrosidase. Die Domäne I ist in Magenta dargestellt und enthält zwei Disulfidbindungen, deren Cysteinreste als grüne „Bälle“ eingezeichnet sind. Die Glykosylierungsstelle N19 ist im Kugel-Stab-Modell wiedergegeben. Die Immunglobulin-ähnliche Domäne II ist in Grün abgebildet. Die katalytische Domäne III (blau) weist die Faltung eines „TIM-barrels“ auf. Die Aminosäuren des aktiven Zentrums E235 und E340 sind im Kugel-Stab-Modell wiedergegeben. Die sechs am häufigsten auftretenden Mutationen sind als rote bzw. gelbe „Bälle“ dargestellt. Sie stehen für die Schwere des resultierenden Gaucher-Phänotyps: rot = schwer, Typ 2 oder 3, gelb = leicht, Typ 1. (aus Dvir et al., 2003)

Die β GC allein hat keinen direkten Zugang zu seinem Substrat Glukosylceramid, das dicht gepackt in der Lipiddoppelschicht der internen Vesikel von Endosomen und Lysosomen vorliegt (Fürst und Sandhoff, 1992). Um ihre volle Aktivität zu entfalten, benötigt die β GC die Hilfe des Sphingolipid-Aktivatorproteins Saposin C (SapC) sowie von anionischen Phospholipiden (Kolter und Sandhoff, 2006).

SapC wirkt im Gegensatz zu den anderen Sphingolipid-Aktivatorproteinen nicht als Detergenz, sondern es kann direkt an die Domänen II und III der β GC binden (Atrian et al., 2008). Dadurch kann SapC die direkte Assoziation der β GC an Membranen vermitteln, wodurch das Substrat Glukosylceramid für das Enzym besser erreichbar wird (s. Abb. 1.7; Alattia et al., 2007; Berent und Radin, 1981; Wilkening et al., 1998). Auf diese Weise wirkt SapC als eine Art allosterischer Aktivator der β GC (Fabbro und Grabowski, 1991). Außerdem schützt die Interaktion mit SapC die β GC vor proteolytischer Degradierung (Sun et al., 2003).

Ebenfalls haben negativ geladene Phospholipide (Vaccaro et al., 1997) einen stimulierenden Einfluss auf die β GC. Das lysosomale Bis(monoacylglycero)phosphat scheint das physiologisch bedeutendste aktivierende Phospholipid zu sein (Wilkening et al., 1998). Der Mechanismus dieser Aktivierung ist noch unverstanden.

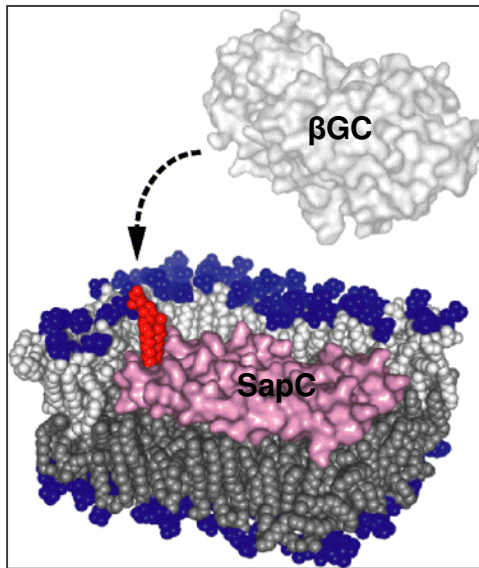


Abb. 1.7: Schematisches Modell der Saposin C-vermittelten Membraninteraktion der β -Glukocerebrosidase. Die β GC (weiß) kann allein nicht das Glukosylceramid in einer Membran erreichen. Saposin C (rosa) soll helfen, das eingebettete Glukosylceramid (rot) für die lösliche β GC zugänglich zu machen, indem es sich in die Membran einlagert. Dadurch käme es zur Bildung von „Kanten“ in der Lipiddoppelschicht, an denen das Glukosylceramid exponiert wird. (modifiziert nach Alattia et al., 2007)

Ebenfalls ist bis heute unerforscht wie die β GC überhaupt zum Lysosom transportiert wird. Aus Untersuchungen von Fibroblasten von *I-Cell-Disease*-Patienten, denen die Glukose-N-Acetyl (GlcNAc)-Phosphotransferase-Aktivität im Golgi-Apparat fehlt, war bekannt, dass die β GC Mannose-6-Phosphat-unabhängig zum Lysosom transportiert wird (Aerts et al., 1988; van Dongen et al., 1985).

2 Fragestellung

Ein Merkmal von Lysosomen, einem wichtigen Degradierungskompartiment innerhalb der tierischen Zelle, sind die stark glykosylierten Transmembranproteine, zu denen u. a. die lysosomalen integralen Membranproteine LIMP-1 und LIMP-2 gehören.

LIMP-1 (auch CD63 genannt) gehört zur Proteinfamilie der Tetraspanine, die die Tendenz haben, mit anderen Proteinen zu interagieren und große Netzwerke auszubilden. Auf diese Weise beeinflussen Tetraspanine verschiedene zelluläre und pathologische Prozesse wie Zellaktivierung, Adhäsion, Motilität und Differenzierung.

Für LIMP-1 wurden verschiedene Funktionen postuliert, u. a. die Beeinflussung der β 1-Integrin-vermittelten Adhäsion und Migration von Leukozyten oder Thrombozyten sowie die Kontrolle der Endozytose der Magen- bzw. Kolon-spezifischen H^+,K^+ -ATPase. Bei allen bisher durchgeführten Studien zur Funktion von LIMP-1 handelt es sich um *in vitro* Experimente, die im wesentlichen auf Koimmunopräzipitation oder dem Einfluss LIMP-1-spezifischer monoklonaler Antikörper oder siRNA auf verschiedene Zelleigenschaften beruhen.

In dieser Arbeit soll erstmals die Bedeutung von LIMP-1 *in vivo* anhand eines LIMP-1-*knock-out*-Mausmodells untersucht werden. Hierbei geht es zunächst um die generelle, histologische und biochemische Charakterisierung des Phänotyps. Des Weiteren soll der Effekt der LIMP-1-Defizienz auf die Funktion der Lysosomen untersucht werden. Weitere Schwerpunkte liegen in der Untersuchung des Immunsystems der LIMP-1^{-/-}-Mäuse sowie in der Analyse LIMP-1-defizienter Thrombozyten.

In einem zweiten Teil dieser Arbeit geht es um die Identifizierung des intrazellulären Transporters der lysosomalen Hydrolase β -Glukocerebrosidase (β GC). Die β GC ist das Enzym, dessen Funktion bei der lysosomalen Speichererkrankung Morbus Gaucher beeinträchtigt ist. Es kommt zur Akkumulation von Glukosylceramid, in Lysosomen insbesondere von Makrophagen und Neuronen. Bisher war unbekannt, wie die β GC an ihren Zielort in der Zelle, in das Lysosom transportiert wird, da der Transport unabhängig von Mannose-6-Phosphatrezeptoren erfolgte.

In dieser Arbeit vorausgegangenen *in vitro* Experimenten konnte eine Interaktion der β GC mit LIMP-2 nachgewiesen werden. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Rolle von LIMP-2 für den Transport der β -Glukocerebrosidase mithilfe einer LIMP-2^{-/-}-Maus und aus dieser gewonnenen Zellen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien, Enzyme und Materialien

Eine ausführliche, alphabetische Auflistung der verwendeten Geräte, Chemikalien, Kits, Materialien und Puffer findet sich im Anhang.

3.1.2 Bakterienstämme

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen und Plasmidamplifikationen wurden mit dem Bakterienstamm *XLI-blue Escherichia coli* (Stratagene, LaJolla, CA, USA) durchgeführt, der folgenden Genotyp aufweist: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]* (Bullock et al., 1987).

3.1.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Primer wurden zur Klonierung (Tab. 3.1), zur Genotypisierung der verwendeten Mäuse und Zelllinien (Tab. 3.2), für reverse Transkriptase-Reaktionen (Tab. 3.3) sowie zur Mycoplasmandetektion (Tab. 3.4) verwendet. Die Primer wurden von Sigma Genosys (Steinheim, D) bezogen und als 100 μM, 50 μM oder 10 μM Stammlösungen in autoklaviertem ddH₂O kurzfristig bei 4° C gelagert und zur längerfristigen Aufbewahrung bei –20° C eingefroren.

Die RNAi-Duplexes zum *knock-down* des LIMP-2 (SCARB2)- bzw. LIMP-1 (CD63)-Gens in HeLa-Zellen stammten von Invitrogen (Paisley, UK) und wurden nach Angaben des Herstellers bei –20° C gelagert (Tab. 3.5).

Tab. 3.1: Primer zur Klonierung

| Bezeichnung | Länge (bp) | Sequenz 5' → 3' |
|--------------------------|------------|---|
| mLIMP1Klonfw-EcoRI | 33 | <u>TTG AAT TCT</u> TCC ATG GCG GTG GAA GGA GGA ATG |
| mLIMP1Chr10Klonbw_ BamHI | 33 | T <u>TGG ATC CTT</u> CCA GCC CTA CAT TAC TTC ATA GC |
| mLIMP1Chr18Klonbw_ BamHI | 33 | T <u>TGG ATC CTT</u> CCA GCC CTA CAT TAC TTC ATG GC |
| mgba_seq2-h | 20 | GGA TGG ACG GAC TGG AAC CT |
| pTLN_HpaI_r | 21 | GCT GGC AGG ACA GGT TTC CCG |
| βGC-HA-fw | 45 | <i>CCT TAT GAC GTC CCA GAT TAT GCG TGA CTC GAG</i> AGA TCT GGT TAC |
| βGC-HA-bw | 40 | <i>ATC TGG GAC GTC ATA AGG GTA CTG GCG ACG CCA</i> AGG TAA G |

Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind unterstrichen (GAATTC = EcoRI; GGATCC = BamHI); Start- und Stoppcodons sind fett hervorgehoben. Die Codons für das HA-tag sind kursiv dargestellt.

Tab. 3.2: Primer zur Genotypisierung

| Bezeichnung | Länge (bp) | Sequenz 5' → 3' |
|--------------------|------------|---|
| neo_Kiel_3 | 30 | GTT GTC ACT GAA GCG GGA AGG GAC TGG CTG |
| neo_Kiel_4 | 30 | GCG AAC AGT TCG GCT GGC GCG AGC CCC TGA |
| LIMP1/CD63_1 | 21 | GGA GAC GTG GGT CTG ACC GCG |
| LIMP1/CD63_2 | 21 | CCA GCT GCC TTC ATC TCT GGT |
| Limp2-5'- Intron 7 | 21 | TCT ATG TCA ACC ACT GCA GGT |
| Limp2-3'- Intron 8 | 21 | CAG TGA GAA GTG TGT ACT CAC |

Tab. 3.3: Primer zur RT-PCR

| Bezeichnung | Länge (bp) | Sequenz 5' → 3' |
|-------------|------------|---------------------------------|
| LIMP1fw-1 | 20 | CGG TGG AAG GAG GAA TGA AG |
| LIMP1bw-1 | 24 | CTA CAT TAC TTC ATA GCC ACT TCG |
| ACTMRH_V5 | 20 | GAC GAG GCC CAG AGC AAG AC |
| ACTMRH_R5 | 20 | ATC TCC TTC TGC ATC CTG TC |

Tab. 3.4: Primer zur Mycoplasmandetektion

| Bezeichnung | Länge (bp) | Sequenz 5' → 3' |
|--------------|------------|-------------------------------------|
| PCR1: Myc f1 | 20 | ACA CGG TGG GAG CTG GTA AT |
| PCR1: Myc r1 | 27 | CTT CWT CGA CTT YCA GAC CCA AGG CAT |
| PCR2: Myc f2 | 18 | GTT CTT TGA AAA CTG AAT |
| PCR2: Myc r2 | 18 | GCA TCC ACC AWA WAC TCT |

Tab. 3.5: RNAi-Duplexes

| Bezeichnung | Länge (bp) | Sequenz 5' → 3', 3' → 5' |
|---------------------------|------------|-----------------------------------|
| SCARB2HSS101572(3_RNAi) | 25 | UAA UGU CUC CCG UUU CAA CAA AGU C |
| 10620312 111556 G01/2 | 25 | AUU ACA GAG GGC AAA GUU GUU UCA G |
| SCARB2HSS101573(3_RNAi) | 25 | UAG GGU CUC CAA CAG AUU GGU CUC G |
| 10620312 111556 G03/4 | 25 | AUC CCA GAG GUU GUC UAA CCA GAG C |
| SCARB2HSS101574(3_RNAi) | 25 | AAA CAU AGU CUC CAU CAU UAG UCC C |
| 10620312 111556 G05/6 | 25 | UUU GUA UCA GAG GUA GUA AUC AGG G |
| CD63HSS101614 (3_RNAi) | 25 | ACA GCU UGU CCU GAG UCA GAC CAU A |
| 10620318/9 123946 D01/D02 | 25 | UGU CGA ACA GGA CUC AGU CUG GUA U |
| CD63HSS101615 (3_RNAi) | 25 | GGC CUG CAA GGA GAA CUA UUG UCU U |
| 10620318/9 123946 D03/D04 | 25 | CCG GAC GUU CCU CUU GAU AAC AGA A |
| CD63HSS101616 (3_RNAi) | 25 | GAG GAA UGA AAU GUG UGA AGU UCU U |
| 10620318/9 123946 D05/D06 | 25 | CUC CUU ACU UUA CAC ACU UCA AGA A |

3.1.4 Plasmide

Die Lagerung von Plasmiden erfolgte in autoklaviertem ddH₂O. Für kürzere Zeiträume wurden die Vektoren bei 4° C gelagert, langfristig wurden sie bei -20° C verwahrt. Zur Expression in den Säugetierzelllinien wurden verschiedene Plasmide verwendet, die das jeweilige Protein allein oder in Fusion mit einem eGFP, myc- oder HA-tag exprimierten. Das Protein wurde jeweils mit Hilfe eines starken CMV (*Cytomegalie-Virus*)- bzw. T7-Promotors exprimiert. Daneben enthielten die Plasmide eine Ampicillin- oder Kanamycinresistenz, die zusammen mit einem bakteriellen Replikationsursprung eine Amplifikation der Vektoren in Bakterien erlaubten. Das

Polyadenalierungssignal des SV40-Virus (SV = *Simian Virus*) führte zur erforderlichen Prozessierung des 3'-Endes der mRNA. Der SV40-ori ermöglichte eine Replikation des Vektors in Säugetierzelllinien, die das SV40-T-Antigen exprimieren. Durch das Vorhandensein mehrerer Kopien des Vektors ist die Expression in Zellen, die über das SV40-T-Antigen verfügen, stärker als in anderen Zellen, die lediglich die transfizierte DNA besitzen. Die in den Plasmiden enthaltenen Neomycin- bzw. Hygromycinresistenzgene ermöglichen eine Selektion der Säugetierzellen, die über das Plasmid verfügen. Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurden auf ihre Richtigkeit durch Sequenzierung überprüft (MWG Biotech AG, Martinsried, D) und sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

Zur Herstellung der eGFP-LIMP-1-Expressionsplasmide wurde die Gesamt-RNA aus Wildtyp murinen embryonalen Fibroblasten (C57/BL6J) mithilfe der „RNAeasy“ Säulen von Qiagen (Hilden, D) entsprechend der Herstellerangaben isoliert. Die mRNA wurde mittels des „Omniscript Reverse Transcriptase“-Systems (Qiagen, Hilden, D) und Oligo(dT)₁₅-Primern (Promega, Madison, WI, USA) in cDNA umgeschrieben. Zur spezifischen Amplifizierung der LIMP-1-cDNA von Chromosom 10 wurden in einer Standard-PCR-Reaktion (s. Abschnitt 3.2.1.7.2) Primer verwendet, die EcoRI- bzw. BamHI-Restriktionsschnittstellen enthielten (mLIMP1Klon.fw-EcoRI; mLIMP1Chr10Klonbw_BamHI, s. Tab. 3.1).

Zur Klonierung der LIMP-1-related gene-Sequenz Cd63-rs1 von Chromosom 18 wurde DNA aus Wildtyp murinen embryonalen Fibroblasten (C57/BL6J) mithilfe des „InnuPrep DNA Mini Kit“ (AJ Innuscreen; Jena, D) isoliert. Die LIMP-1-related gene-Sequenz Cd63-rs1 wurde mit den folgenden Primern amplifiziert: mLIMP1Klonfw-EcoRI und mLIMP1Chr18Klonbw_BamHI (s. Tab. 3.1).

Die gebildeten PCR-Produkte wurden mittels der entsprechenden Restriktionsenzyme in den Expressionsvektor pEGFP-C1 (Invitrogen, Paisley, UK) einkloniert.

Der Expressionsvektor pFrog3-hβGC wurde von Ullrich Klostermeier (Kiel, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Zur Klonierung muriner βGC-Expressionskonstrukte diente als Ausgangsmaterial der Vektor pTLN-mβGC (Michael Schwake, Kiel, Deutschland). Aus ihm wurde mithilfe der Restriktionsenzyme HindIII und HpaI der mβGC-codierende Bereich ausgeschnitten und in zwei Schritten in den pFrog3-Leervektor (Gunther et al., 1998) eingefügt. Über Fusions-PCR mit entsprechenden Primern wurde in den pFrog3-mβGC-Vektor ein C-

terminales HA-tag (YPYDVPDYA) angefügt. Eine Übersicht über den pFrog3-Expressionsvektor ist in Abb. 3.1 gegeben.

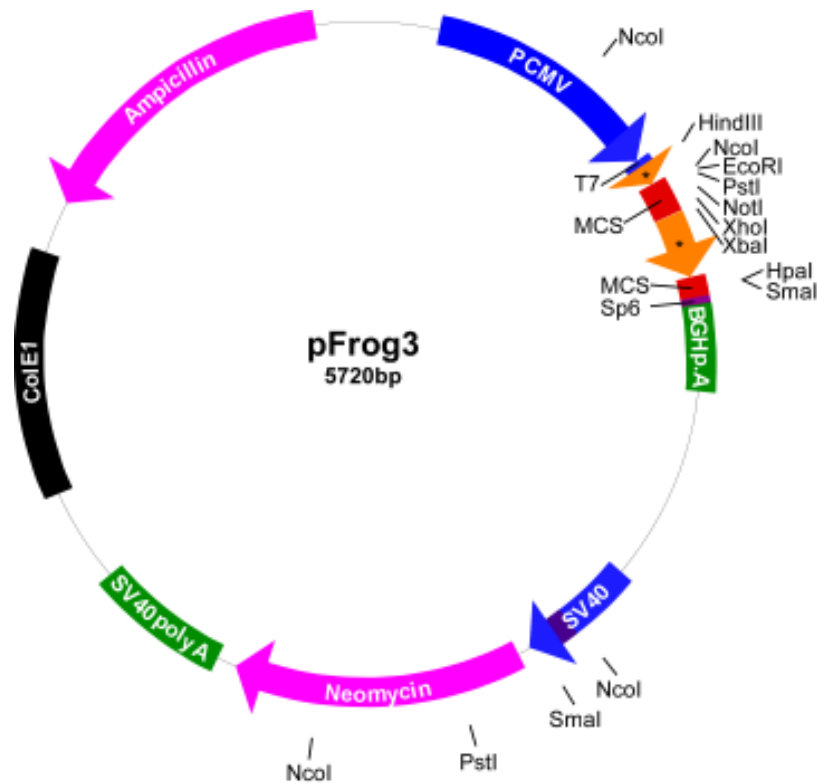


Abb. 3.1: Karte des Expressionsvektors pFrog3. Der Expressionsvektor pFrog3 (Michael Schwake, Kiel, Deutschland) basiert auf dem pcDNA3-Vektor der Firma Invitrogen (Paisley UK). Er enthält die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen der β -Globin-cDNA des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis*, wodurch eine verstärkte Proteinexpression in Säugetierzellen erreicht wird (orange, mit Sternchen). Innerhalb dieses Bereichs liegt eine *Multiple Cloning Site* (MCS, rot). Die Transkription erfolgt unter Kontrolle eines T7- und eines *Cytomegalie-Virus* (CMV)-Promotors (blau). Das Transkript trägt zur Stabilisierung ein poly-Adenylierungssignal des bovinen Rinderwachstumshormons (*bovine growth hormone*, BGH p.A, grün). Eine Neomycin-Phosphotransferase-Expressionskassette (Neomycin, pink) erlaubt die Selektion transfizierter eukaryotischer Zellen. Eine β -Laktamase-Expressionskassette vermittelt eine Ampicillinresistenz (Ampicillin, pink), die zusammen mit dem bakteriellen Replikationsursprung ColE1 eine Amplifikation des Vektors in Bakterien erlaubt.

Der Expressionsvektor pFrog3-mLIMP-2-myc stammte von Michael Schwake (Kiel, Deutschland). Es wird das murine LIMP-2 mit einem C-terminalen myc-tag (EQKLISEEDL) unter der Kontrolle eines T7-Promotors exprimiert.

Zur Generierung der LIMP-2-myc-Mutante mit einem starken ER-Retentionssignal wurden die C-terminalen 14 Aminosäuren des humanen $\alpha 2C$ -adrenergen Rezeptors (-KHILFRRRRRGFRQ) C-terminal an das LIMP-2-myc-Protein mit Hilfe von PCR-Techniken fusioniert (Michael Schwake, Kiel, D; Schwappach et al., 2000; Zerangue et al., 1999).

Das Expressionskonstrukt aus der luminalen Domäne (Aminosäuren 32 - 118) des murinen LIMP-2 mit einem C-terminalen myc-tag und der N-terminal-lokalisierten Signalsequenz der murinen β GC (MAARLIGFFLFQAVSWAYG-; O'Neill et al., 1989) wurde ebenfalls auf PCR-basierend aus dem pFrog3-mLIMP-2-myc-Konstrukt hergestellt (Michael Schwake, Kiel, D).

Tab. 3.6: Verwendete Plasmide

| Plasmid | Resistenz | codiertes Protein | Tag | Herkunft |
|--------------------------|-----------|--------------------|--------|----------------------|
| pEGFP-mLIMP-1-10-C1 | Kan | mLIMP-1 (Chrom.10) | N-eGFP | eigene Herstellung |
| pEGFP-mLIMP-1-18-C1 | Kan | mLIMP-1 (Chrom.18) | N-eGFP | eigene Herstellung |
| pFrog3-h β GC | Amp | h β GC | - | Ullrich Klostermeier |
| pFrog3-m β GC | Amp | m β GC | - | eigene Herstellung |
| pFrog3-m β GC-HA | Amp | m β GC | C-HA | eigene Herstellung |
| pFrog3-mLIMP-2-myc | Amp | mLIMP-2 | C-myc | Michael Schwake |
| pFrog3-mLIMP-2-ERret-myc | Amp | mLIMP-2-ERret | C-myc | Michael Schwake |
| pFrog3-mLIMP-2-LD-myc | Amp | mLIMP-2-LD | C-myc | Michael Schwake |

3.1.5 Antikörper

Tab. 3.7 und Tab. 3.8 enthalten eine Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörper und der Verdünnungen, mit denen sie in den verschiedenen Applikationen eingesetzt wurden. Alle Antikörper wurden kurzfristig in wässriger Lösung bei 4° C und längerfristig bei -20° C oder -80° C gelagert, soweit es vom Hersteller nicht anders empfohlen wurde. Die Alexa-Fluor (AF)-Sekundärantikörper wurden zusätzlich unter Lichtausschluss verwahrt.

Der Kaninchen-anti-mLIMP-1-Antikörper wurde von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) hergestellt. Dazu wurden synthetische Peptide verwendet, die den Aminosäuren 132-143 (C-ATILDKLQKENN) und 176-189 (CGNDFKESTIHTQG) des murinen LIMP-1-Proteins entsprachen. Zwei spezifisch keimfreie Kaninchen wurden jeweils mit einer Mischung der beiden Peptide immunisiert. Ein Teil der finalen Seren wurde von der Firma Eurogentec gepoolt und affinitätsaufgereinigt. Dazu wurden die Peptide, die auch zur Antikörpergenerierung verwendet wurden, an N^α-(ϵ -Aminocaproyl)-DL-homoarginin-hexylester (ACH)- und Bromcyan (CNBr)-Sephrose gekoppelt. Der gegen das Peptid 132 - 143 aufgereinigte Antikörper erwies sich zur Detektion des murinen LIMP-1-Proteins am geeignetsten (Daten nicht gezeigt).

Tab. 3.7: Verwendete Primärantikörper

| Bezeichnung | Herkunft | erzeugt in | IF-Verd. | WB-Verd. | FACS-Verd. |
|--|--|------------|----------|----------|------------|
| α -AQP-2 | Alomone Labs, Jerusalem, Israel | Kaninchen | 1:50 | 1:500 | - |
| α -Maus- β GC | D. Reczek, Boston, USA | Kaninchen | 1:50 | 1:500 | - |
| α -Mensch- β GC | J.M. Aerts, Amsterdam, NL | Maus | 1:200 | 1:1.000 | - |
| α -Mensch-Cathepsin D | A. Hasilik, B. Schröder | Kaninchen | 1:200 | - | - |
| α -Maus-Cathepsin D | Pohlmann et al., 1995 | Kaninchen | 1:50 | 1:500 | - |
| α -Maus-F4/80 (Cl:A3-1) | Serotec, Oxford, UK | Ratte | 1:50 | - | 1:50 |
| α -HA (3F10) | Roche, Penzberg, D | Ratte | 1:200 | 1:1.000 | - |
| α -KDEL | Stressgen, Ann Arbor, MI, USA | Maus | 1:50 | - | - |
| α -Maus-LAMP-1 (1D4B) | DSHB, Iowa City, USA | Ratte | 1:50 | 1:500 | - |
| α -Maus-LAMP-2 (ABL93) | DSHB, Iowa City, USA | Ratte | 1:50 | 1:500 | - |
| α -Mensch-LIMP-1 (H5C6) | DSHB, Iowa City, USA | Maus | 1:100 | - | - |
| α -LIMP-1 (aff. pur.) | Eurogentec | Kaninchen | 1:50 | 1:500 | - |
| α -LIMP-2 (aff. pur.) | Eurogentec | Kaninchen | 1:50 | 1:500 | - |
| α -Maus-MPR46 (MSC1) | Klumperman et al., 1993 | Kaninchen | 1:50 | - | - |
| α -Ratte-MPR300 | K. von Figura | Kaninchen | 1:50 | - | - |
| α -Mensch c-myc Epitop (9B11) | Cell Signaling, Danvers, MA, USA | Maus | 1:200 | 1:1.000 | - |
| α - β -Tubulin (E7) | DSHB, M. Klymkowsky | Maus | - | 1:500 | - |
| α -poly-Ubiquitin (FK1) | Biotrend, Köln, D | Maus | 1:200 | 1:1.000 | - |
| α -Maus-CD3 ϵ (145-2C11) | BD Pharmingen* | Hamster | - | - | 1:500 |
| α -Maus-CD4 (RM4-5) | BD Pharmingen* | Ratte | - | - | 1:2.000 |
| α -Maus-CD8 α (53-6.7) | BD Pharmingen* | Ratte | - | - | 1:1.000 |
| α -Maus-CD69 (H1.2F3) | BD Pharmingen* | Hamster | - | - | 1:1.000 |
| α -Maus-B220 (RA3-6B2) | BD Pharmingen* | Ratte | - | - | 1:2.000 |
| α -Maus-IgM (R6-60.2) | BD Pharmingen* | Ratte | - | - | 1:1.000 |
| α -Maus-IgD (11-26c.2a) | BD Pharmingen* | Ratte | - | - | 1:1.000 |
| α -Maus-CD31 (390) | Southern Biotechnologies Assoc. | Ratte | - | - | 1:1.000 |
| α -Maus-Ly6C (HK1.4) | Southern Biotechnologies Assoc. | Ratte | - | - | 1:1.000 |
| α -Maus-CD49b (DX5) | BD Pharmingen* | Ratte | - | - | 1:1.000 |
| α -Maus-CD11b (M1/70) | BD Pharmingen* | Ratte | - | - | 1:1.000 |
| α -Maus-GPVI (JAQ1) | Bernhard Nieswandt Nieswandt et al., 2000 | Ratte | - | - | 1:10 |
| α -Maus- α 2-Integrin (12C10) | Bernhard Nieswandt ^o | Ratte | - | - | 1:10 |
| α -Maus- β 1-Integrin (9EG7) | BD Pharmingen* | Ratte | - | - | 1:100 |
| α -Maus-GPIIbIIIa (J6C10) | Bernhard Nieswandt ^o | Ratte | - | - | 1:10 |
| α -Maus-GPV (89H11) | Bernhard Nieswandt ^o | Ratte | - | - | 1:10 |
| α -Maus-GPIb (15E2) | Bernhard Nieswandt ^o | Ratte | - | - | 1:10 |
| α -Maus-CD9 (96H10) | Bernhard Nieswandt ^o | Ratte | - | - | 1:10 |
| α -Maus- α IIb β 3 (4H5) | Bernhard Nieswandt ^o | Ratte | - | - | 1:10 |
| α -Maus-P-Selektin (89H11) | Bernhard Nieswandt ^o | Ratte | - | - | 1:10 |
| α -Maus-GPIX (5C8) | Bernhard Nieswandt ^o | Ratte | - | - | 1:10 |
| α -Maus-Gr1 (RB6-8C5) | BD Pharmingen* | Ratte | - | - | 1:1.000 |

*BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA, ^o B. Nieswandt, Rudolf-Virchow-Zentrum, Würzburg

Die LIMP-2-Antikörper wurden ebenfalls von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) hergestellt. Dazu wurden synthetische Peptide verwendet, die den Aminosäuren 382-394 (C-RFQINTYVRKLDD) und 464-478 (C-MDEGTADERAPLIRT) des murinen LIMP-2 entsprachen. Die Peptide wurden so gewählt, dass sie 92% Identität zum humanen LIMP-2 aufwiesen. Der gegen das Peptid 464-478 aufgereinigte Antikörper erwies sich zur Detektion sowohl des murinen als auch des humanen LIMP-2 am geeignetsten (Daten nicht gezeigt).

Tab. 3.8: Verwendete Sekundärantikörper/Sekundärreagenzien

| Bezeichnung | Herkunft | erzeugt in | IF-Verd. | WB-Verd. |
|---|--|------------|-----------------------------|----------|
| α -Kaninchen-IgG AF350, AF488, AF594 | Molecular Probes/ Invitrogen, Karlsruhe | Ziege | 1:300 | - |
| α -Maus-IgG AF350, AF488, AF594 | | Ziege | 1:300 | - |
| α -Ratten-IgG AF350, AF488, AF594 | | Ziege | 1:300 | - |
| α -Kaninchen-IgG HRP | Santa Cruz, Heidelberg | Esel | - | 1:10.000 |
| α -Maus-IgG HRP | Dianova, Hamburg | Schaf | - | 1:10.000 |
| α -Ratten-IgG HRP | Santa Cruz, Heidelberg | Esel | - | 1:10.000 |
| Streptavidin APC, FITC, PE | BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA | | FACS-Verdünnung: 1:1.000 | |

3.1.6 Zelllinien

Die in Tab. 3.9 aufgeführten Zelllinien wurden bei 37° C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Tab. 3.9: Verwendete Zelllinien

| Zelllinie | Eigenschaften | Referenz |
|-------------------------------|--|----------------------|
| 10.1 ^{+/+} SV | embryonale Mausfibroblasten, immortalisiert mit dem großen SV-40-Antigen | Eigene Herstellung |
| 10.10 ^{+/+} SV | embryonale Mausfibroblasten, immortalisiert mit dem großen SV-40-Antigen | Eigene Herstellung |
| 10.2-LIMP-1 ^{-/-} SV | embryonale Mausfibroblasten, immortalisiert mit dem großen SV-40-Antigen | Eigene Herstellung |
| 10.6-LIMP-1 ^{-/-} SV | embryonale Mausfibroblasten, immortalisiert mit dem großen SV-40-Antigen | Eigene Herstellung |
| 10.9-LIMP-1 ^{-/-} SV | embryonale Mausfibroblasten, immortalisiert mit dem großen SV-40-Antigen | Eigene Herstellung |
| 583-3 ^{+/+} | primäre embryonale Mausfibroblasten | Eigene Herstellung |
| 583-4 ^{+/+} | primäre embryonale Mausfibroblasten | Eigene Herstellung |
| 583-2-LIMP-2 ^{-/-} | primäre embryonale Mausfibroblasten | Eigene Herstellung |
| 583-5-LIMP-2 ^{-/-} | primäre embryonale Mausfibroblasten | Eigene Herstellung |
| 583-7-LIMP-2 ^{-/-} | primäre embryonale Mausfibroblasten | Eigene Herstellung |
| 583-8-LIMP-2 ^{-/-} | primäre embryonale Mausfibroblasten | Eigene Herstellung |
| #5 ^{+/+} | embryonale Mausfibroblasten, spontan oder mit dem großen SV-40-Antigen immortalisiert | eigene Arbeitsgruppe |

Tab. 3.9 (Fortsetzung): Verwendete Zelllinien

| Zelllinie | Eigenschaften | Referenz |
|--------------------------|--|--|
| HeLa | menschliche epithelartige Zelllinie aus einem Zervix-Karzinom | Eeva-Liisa Eskelinen, Helsinki, Finnland |
| LIMP2 ^{-/-} E2 | embryonale Mausfibroblasten, spontan immortalisiert | Cathrin Claussen, Kiel |
| LIMP2 ^{-/-} E5 | | Cathrin Claussen, Kiel |
| LIMP2 ^{-/-} E6 | | Cathrin Claussen, Kiel |
| LIMP2 ^{-/-} E7 | | Cathrin Claussen, Kiel |
| MPR46/300 ^{-/-} | embryonale Mausfibroblasten, immortalisiert mit dem großen SV-40-Antigen | Pohlmann et al., 1995 |
| PS1 ^{+/+} | embryonale Mausfibroblasten, immortalisiert mit dem großen SV-40-Antigen | D. Hartmann, Leuven, Belgien |

3.1.7 Mausstämme

Die in Tab. 3.10 aufgeführten Mausstämme wurden in der tierexperimentellen Einrichtung der Universität Kiel in individuell belüfteten Käfigen (*individually ventilated cages*, IVCs) gehalten. Die Temperatur in den Mäusräumen betrug 19 - 21° C und die Luftfeuchtigkeit 45 - 60 %. Es wurde ein Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Std (6 – 18 Uhr) Helligkeit und 12 Std Dunkelheit eingehalten. Die Tiere erhielten Wasser und Trockenfutter (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, D) *ad libitum*. Die Versuche wurden gemäß den Richtlinien der Europäischen Union durchgeführt und von der deutschen Tierschutzbehörde genehmigt.

Der LIMP-1-defiziente Mausstamm wurde von Paul Saftig generiert. Dazu wurde eine λ -EMBL3-129SV-Maus-Phagen-Bibliothek von Stratagene Inc. (LaJolla, CA, USA) mit einer partiellen cDNA, die die Exons 2 - 5 des murinen LIMP-1 umfasste, durchsucht. Der identifizierte Phage enthielt die Exons 1 - 6 des murinen LIMP-1 Gens. Ein die Exons 1 - 4 des Maus-LIMP-1-Gens umfassendes HindIII-Fragment der Phagen-DNA wurde in den Vektor pBluescript KS (Stratagene; LaJolla, CA, USA) eingefügt. Die eine Neomycinresistenzvermittelnde Neomycin-Phosphotransferase-Expressionskassette (Stratagene; LaJolla, CA, USA) wurde als ein XbaI-Fragment in eine NheI-Schnittstelle eingefügt, die durch Mutations-PCR erzeugt wurde. Die NheI-Schnittstelle befand sich in Exon 2 im Codon, welches die dritte Aminosäure des LIMP-1-Proteins Valin codiert (vergl. Abb. 4.3). Der daraus entstehende Vektor wurde in die embryonale Stammzelllinie E14 durch Elektroporation eingebracht (K. Rajewsky, Köln; Hooper et al., 1987). Eine Thymidinkinasekassette am 3'-Ende von Exon 4 erlaubte eine negative Selektion durch 25 μ g/ml Gancyclovir. 335 μ g/ml G418-resistente embryonale Stammzellklone (ES-Zellklone) wurden mittels *Southern Blot* auf die Insertion der

Neomycinresistenzkassette hin untersucht. Dazu wurde die genomische DNA mit den Restriktionsenzymen BglII, XbaI oder NheI verdaut. Als Sonde diente ein die Exons 5 und 6 des LIMP-1-Gens umfassendes HindIII/BamHI-Fragment. Die mutierte ES-Zelllinie Eli32 wurde in Blastozysten von C57BL/6J-Mäusen injiziert. Chimäre Männchen wurden mit C57BL/6J-Weibchen gekreuzt. Die Nachkommen wurden auf die Veränderung im LIMP-1 Gen mittels *Southern-Blot*-Analyse oder PCR untersucht (s. Abschnitt 4.1.3).

Tab. 3.10: Verwendete Mausstämme

| Stamm | Eigenschaften |
|-----------------------|---|
| Wildtyp | CD53S ^{+/+} , Wildtyp mit einem gemischten genetischen Hintergrund aus C 57 BL/6J x 129 SV/J; eigene Auszucht |
| LIMP-1 ^{-/-} | LIMP-1-defizienter Stamm mit einem gemischten genetischen Hintergrund aus C 57 BL/6J x 129 SV/J (s. oben); eigene Auszucht |
| LIMP-2 ^{-/-} | LIMP-2-defizienter Stamm mit einem gemischten genetischen Hintergrund aus C 57 BL/6J x 129 SV/J; Gamp et al., 2003; eigene Auszucht |

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Methoden wurden, soweit nicht anders angegeben, nach den Standardprotokollen von Sambrook, Fritsch und Maniatis durchgeführt (Sambrook et al., 1989).

3.2.1.1 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Nukleinsäurekonzentration in einer Lösung wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch in einer 10 mm-Quarzküvette (Amersham, Little Chalfont, UK) bestimmt (GeneQuant pro, Biochrom, Cambridge, UK). Eine OD von 1,0 bei dieser Wellenlänge entspricht einem Doppelstrang-DNA-Gehalt von 50 µg/ml. Aus dem Verhältnis der OD bei 260 nm zu der OD bei 280 nm konnte die Reinheit der DNA abgeschätzt werden. Reine Doppelstrang-DNA weist ein Verhältnis OD_{260}/OD_{280} von 1,8 auf. Das Verhältnis sollte für doppelsträngige DNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Abweichende Werte deuteten auf Verunreinigungen besonders durch Proteine hin.

3.2.1.2 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mit 1-2 %-igen Agarosegelen in einer horizontalen Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer (s. Anhang) als Laufmittel. Zur Herstellung der Gele wurde Agarose (Ultraqualität, Roth, Karlsruhe, D) unter Erhitzen in TAE-Puffer gelöst und mit 1 %-iger Ethidiumbromid-Lösung (Roth, Karlsruhe, D) in einer Endkonzentration von 0,8 µg/ml versetzt. Die leicht abgekühlte noch flüssige Agarose wurde in eine zu diesem Zweck abgeklebte Gelkammer gegossen. Daraufhin wurde der Kamm möglichst luftblasenfrei eingesteckt und das Gel zum Erstarren etwa 45 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Proben wurden im Verhältnis 6 : 1 mit Auftragspuffer versetzt (Fermentas, St. Leon-Rot, D). Das maximale Ladevolumen betrug 50 – 55 µl. Ein 1 kb-Molekulargewichtsmarker diente als Standard (Roche, Mannheim, D), von dem 10 µl aufgetragen wurden. Die Auftrennung wurde für ca. 30 min bei einer konstanten Spannung von 120 V durchgeführt.

In dem Fall, dass die Fragmente nicht weiterverwendet werden sollten, wurde die DNA durch das gebundene Ethidiumbromid bei Beleuchtung mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 312$ nm sichtbar gemacht. Die beleuchteten Gele wurden mithilfe der Geldokumentationsanlage Gel Jet Imager (Intas, Göttingen, D) fotografiert und die Fotos ausgewertet. Sollte mit der DNA weitergearbeitet werden, wurde das entsprechende Fragment zum Schutz vor Mutationen aus dem Gel entfernt (vergl. Abschnitt 3.2.1.3), bevor das restliche Gel zur Auswertung fotografiert wurde.

3.2.1.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Aufreinigung wurde das Gelstück mit der gewünschten DNA-Bande mithilfe eines ethanolgesäuberten Skalpells auf einem UV-Tisch bei Beleuchtung mit einer Wellenlänge von 366 nm (Reprostar, Camag, Muttenz, Schweiz) aus dem Gel herausgeschnitten. Die Verwendung von UV-Licht geringerer Intensität verminderte das Risiko der Mutationsentstehung. Die in den Gelstücken enthaltene DNA wurde mit dem „High Pure PCR Product Purification Kit“ (Roche, Mannheim, D) isoliert.

3.2.1.4 Transformation elektrisch kompetenter Bakterien (Elektroporation)

Diese Methode wurde sowohl für die Transformation von Ligationsansätzen als auch zur Erzeugung größerer Plasmidmengen (Retransformation) verwendet. Vor der Elektroporation wurden die bei -80° C gelagerten elektrokompenten *E. coli*-Bakterien des Stammes XL1-Blue (Stratagene, LaJolla, CA, USA) auf Eis aufgetaut. Die Bakterien wurden mit 1 µl des

Ligationsansatzes bzw. des Plasmides versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV, 400 Ω und 25 μ F im Gene Pulser (BioRad, Hercules, USA). Anschließend wurden die transformierten Bakterien in 1 ml antibiotikafreies LB-Medium überführt und für 30 min bei 37° C im Thermoblock geschüttelt. Bei der Erzeugung größerer Plasmidmengen durch Retransformation wurden 100 μ l der Bakteriensuspension je nach Resistenz des Plasmides auf 50 μ g/ml ampicillin- oder 30 μ g/ml kanamycinhaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen. Die mit einem Ligationsansatz transformierten *E. coli* wurden nach der Inkubation in 1 ml LB-Medium 1 min bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Es wurden 900 μ l des Überstandes abgenommen und die pelletierten Bakterien in den restlichen 100 μ l LB-Medium resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde sodann auf einer ampicillin- oder kanamycinhaltigen LB-Agarplatte ausgestrichen. Die LB-Agarplatten wurden bei 37° C für 12-16 Std inkubiert. Die Platten wurden bis zur weiteren Plasmidamplifikation mit Parafilm verschlossen und bei 4° C aufbewahrt (Parafilm „M“, American National CanTM, Chicago, IL, USA).

3.2.1.5 Plasmidamplifikation und –aufreinigung

Die über Nacht gewachsenen Kolonien der transformierten, auf LB-Agarplatten ausgestrichenen Bakterien wurden mit sterilen Pipettenspitzen gepickt. Je nach Bedarf wurden 4 ml oder 100 ml ampicillin- oder kanamycinhaltiges LB-Medium (50 μ g/ml Ampicillin oder 30 μ g/ml Kanamycin) angeimpft und über Nacht unter heftigem Schütteln bei 37° C inkubiert. Die Plasmide wurden bei 4 ml-Ansätzen mit dem „E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I“ (peqlab, Erlangen, D) und bei 100 ml-Ansätzen mit dem „Pure Yield Plasmid Midiprep System“ (Promega, Mannheim, D) entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt.

3.2.1.6 Präparation genomischer DNA aus Schwanzgewebe

Zur Genotypisierung der LIMP-1- und LIMP-2-defizienten Mäuse wurde im Alter von ca. drei Wochen ein etwa 0,5 cm langes Stück der Schwanzspitze mit einer scharfen Schere abgeschnitten. Die DNA wurde mit Hilfe des „Invisorp Spin Tissue Kit“ (Invitex, Berlin, D) entsprechend den Herstellerangaben isoliert, wobei mit einmal 200 μ l ddH₂O (Millipore, Schwalbach, D) eluiert wurde. Die DNA-Menge wurde anschließend photometrisch bestimmt (s. Abschnitt 3.2.1.1). In identischer Weise wurde DNA aus Leber, embryonalen Köpfen und Zellpellets isoliert, um diese zu genotypisieren.

3.2.1.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Genotypisierung der LIMP-1- und LIMP-2-defizienten Mäuse (Abschnitt 3.2.1.7.1), zur Klonierung verschiedener Expressionskonstrukte (Abschnitte 3.2.1.7.2 und 3.2.1.7.3) sowie zum Nachweis einer möglichen Mycoplasmeninfektion verwendet (Abschnitt 3.2.1.7.4).

3.2.1.7.1 Genotypisierung

Die präparierte DNA aus den Schwanzbiopsien (s. Abschnitt 3.2.1.6) wurde zur Überprüfung des Genotyps eingesetzt. Dabei wurde die Neomycinresistenzkassette, die zur Unterbrechung des LIMP-1- bzw. LIMP-2-Gens verwendet wurde, mit „Neo-spezifischen“ Primern nachgewiesen (s. Tab. 3.2), die bei erfolgreicher PCR ein 328 bp großes PCR-Produkt erzeugten (s. Abb. 3.2).

Zur weiteren Charakterisierung der LIMP-1-defizienten Mäuse wurden Primer verwendet, deren Zielsequenzen sich kurz vor bzw. nach dem zweiten Exon des LIMP-1-Gens auf Chromosom 10 befanden (s. Tab. 3.2), in das die Neomycinresistenzkassette inseriert worden war. Auf diese Weise ergab sich für das Wildtyp-Allel ein 335 bp großes PCR-Fragment, welches aufgrund der eingefügten Neomycinresistenzkassette für das LIMP-1-*ko*-Allel nicht auftrat. Im *ko*-Allel war die zu amplifizierende Sequenz durch die Neomycinresistenzkassette zu lang, um effizient vervielfältigt zu werden (s. Abb. 3.2).

Zur Charakterisierung der LIMP-2-defizienten Mäuse wurden neben den „Neo-Primern“ Primer verwendet, deren Zielsequenzen sich direkt vor und hinter dem Exon 8 des LIMP-2-Gens befanden (s. Tab. 3.2), in dem bei den LIMP-2-defizienten Mäusen die Neomycinresistenzkassette (1200 bp) liegt. Bei LIMP-2-defizienten Mäusen wurde in dieser PCR ein Fragment von 1320 bp amplifiziert, während bei Wildtyp-Mäusen ein 120 bp-Fragment und bei heterozygoten Mäusen beide Fragmente auftraten (s. Abb. 3.2).

Tab. 3.11: Genotypisierungs-Mix

| Substanz | 1x |
|--------------------|---------|
| DNA | 1,5 µg |
| Primer 1 (50 µM) | 1 µl |
| Primer 2 (50 µM) | 1 µl |
| DMSO | 1 µl |
| dNTPs (2 mM) | 5 µl |
| 10x-Puffer | 5 µl |
| Taq-Polymerase | 0,5 µl |
| ddH ₂ O | → 50 µl |

Tab. 3.12: Genotypisierungs-PCR-Programm

| | | |
|-------|--------|-----|
| 95° C | 5 min | |
| 96° C | 30 sec | |
| 58° C | 30 sec | 36x |
| 72° C | 2 min | |
| 72° C | 3 min | |
| 10° C | ∞ | |

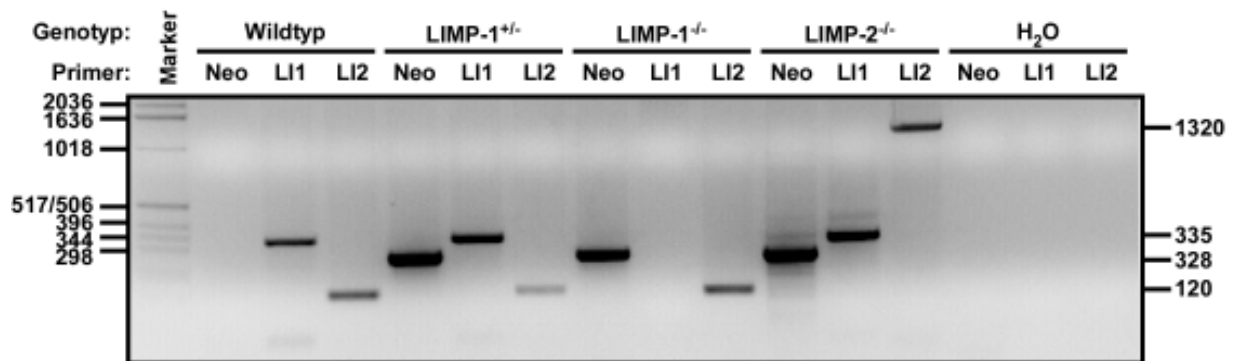


Abb. 3.2: Genotypisierung von LIMP-1- und LIMP-2-defizienten Mäusen. Die PCR-Proben wurden in einem 2 %-igen Agarosegel durch Elektrophorese aufgetrennt. Der Genotyp, der sich nach Auswertung des Gels ergab, ist über den einzelnen Gelspuren angegeben. In der ersten Bahn befindet sich jeweils die Neo-PCR, in der zweiten die LIMP-1-PCR und in der dritten die LIMP-2-PCR. Eine Wasserprobe (H₂O), bei der der Premix ohne DNA-Zugabe für die PCR benutzt wurde, wurde ebenfalls analysiert. Die Zahlen an der Seite geben jeweils die polynukleotidlänge in Basenpaaren an.

Der Reaktionsansatz für die Genotypisierungs-PCR ist in Tab. 3.11 und das PCR-Programm in Tab. 3.12 wiedergegeben. Nach der PCR folgte eine Zugabe von 6x DNA Loading Buffer (Fermentas, St. Leon-Rot). Die Proben wurden auf ein 2 %-iges Agarosegel aufgetragen und das Ergebnis dokumentiert (3.2.1.2).

3.2.1.7.2 Klonierungs-PCR

Zur Herstellung der pEGFP-mLIMP-1-C1-Vektoren (Chromosom 10 und Chromosom 18) wurden Primer verwendet, die an ihren 5'-Enden jeweils die Schnittstelle des entsprechenden Restriktionsenzym (EcoRI bzw. BamHI) enthielten (s. Tab. 3.1). Für die Klonierungs-PCR wurde die Pfu-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot, D) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Dank ihrer 3'→5'-Exonukleaseaktivität verfügt die Pfu-Polymerase im Gegensatz zur Taq-Polymerase über eine Korrekturlesefunktion, mit der das Risiko des Auftretens von Punktmutationen minimiert wurde. Die Pfu-Polymerase besitzt im Vergleich zur Taq-Polymerase eine geringere Synthesegeschwindigkeit von ca. 500 bp/min. Die Elongationsperioden der PCR-Programme wurden an diese Geschwindigkeit angepasst. Der Reaktionsansatz für die Klonierungs-PCR ist in Tab. 3.13 und das PCR-Programm in Tab. 3.14 wiedergegeben. Nach der PCR folgte eine Zugabe von 6x DNA Loading Buffer (Fermentas, St. Leon-Rot) und die Proben wurden auf einem 1 %-igen oder 2 %-igen Agarosegel aufgetragen und das

Amplifikationsprodukt wie in Abschnitt 3.2.1.3 beschrieben aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt.

Tab. 3.13: Klonierungs-PCR-Mix

| Substanz | 1x |
|--------------------|---------|
| DNA (30 ng/μl) | 1 μl |
| Primer 1 (10 μM) | 1 μl |
| Primer 2 (10 μM) | 1 μl |
| DMSO | 1 μl |
| dNTPs (2 mM) | 5 μl |
| 10x-Puffer | 5 μl |
| Pfu-Polymerase | 0,5 μl |
| ddH ₂ O | 35,5 μl |

Tab. 3.14: Klonierungs-PCR-Programm

| | | |
|-------|---------|-----|
| 95° C | 5 min | |
| 96° C | 30 sec | |
| 58° C | 30 sec | 36x |
| 72° C | 2-3 min | |
| 72° C | 3 min | |
| 10° C | ∞ | |

3.2.1.7.3 Fusions-PCR

Im Vektor pFrog3-mβGC (s. Tab. 3.6, s. Abschnitt 3.1.4) wurde mithilfe einer Fusions-PCR das Stoppcodon durch ein C-terminales HA-tag ersetzt (s. Abb. 3.3). Als Template diente der Vektor pTLN-mβGC (Michael Schwake, Kiel, D) Es wurden zwei PCR-Protokolle verwendet, die als PCR1 und PCR2 bezeichnet wurden. Im PCR-Schritt 1a wurden mit den Primern mgba_seq2-h und βGC-HA-bw (s. Tab. 3.1) die letzten 362 Basen des murinen βGC-Gens inklusive einer BamHI-Schnittstelle und die ersten Codons des HA-tags vervielfältigt. Im PCR-Schritt 1b wurden mit den Primern βGC-HA-fw und pTLN_HpaI_r die Codons 2-9 des HA-tags, ein Stoppcodon sowie ein Teil des pTLN-Vektors inklusive einer HpaI-Schnittstelle amplifiziert. Die Primer βGC-HA-fw und βGC-HA-bw waren folglich über einen Bereich von 18 Basen komplementär. Durch diese Komplementarität konnte in einer zweiten PCR-Reaktion mit den Primern mgba_seq2-h und pTLN_HpaI_r ein PCR-Produkt amplifiziert werden, das dem 3'-Ende des βGC-Gens mit einem C-terminalen HA-tag entsprach. Nach der Aufreinigung aus dem Agarosegel konnte das Produkt der PCR2 mithilfe der Restriktionsenzyme BamHI und HpaI in den Vektor pFrog-mβGC inseriert werden, sodass das pFrog-mβGC-HA-Expressionskonstrukt entstand. Der Reaktionsansätze für die Fusions-PCR-Schritte 1 und 2 sowie die PCR-Programme sind in den Tab. 3.15 - 3.18 wiedergegeben.

Tab. 3.15: Fusions-PCR-Mix 1

| Substanz | 1x |
|-------------------------|------------|
| DNA (30 ng/ μ l) | 1 μ l |
| Primer 1/3 (10 μ M) | 1 μ l |
| Primer 2/4 (10 μ M) | 1 μ l |
| DMSO | 1 μ l |
| dNTPs (2 mM) | 5 μ l |
| 10x-Puffer | 5 μ l |
| Pfu-Polymerase | 1 μ l |
| ddH ₂ O | 35 μ l |

Tab. 3.17: Fusions-PCR-Mix 2

| Substanz | 1x |
|-----------------------|------------|
| PCR-1a-Produkt | 7 μ l |
| PCR-1b-Produkt | 7 μ l |
| Primer 1 (10 μ M) | 1 μ l |
| Primer 4 (10 μ M) | 1 μ l |
| DMSO | 1 μ l |
| dNTPs (2 mM) | 5 μ l |
| 10x-Puffer | 5 μ l |
| Pfu-Polymerase | 1 μ l |
| ddH ₂ O | 22 μ l |

Tab. 3.16: Fusions-PCR-Programm 1

| | | |
|-------|----------|-----|
| 95° C | 5 min | |
| 96° C | 15 sec | |
| 58° C | 30 sec | 20x |
| 72° C | 2 min | |
| 72° C | 3 min | |
| 10° C | ∞ | |

Tab. 3.18: Klonierungs-PCR-Programm

| | | |
|-------|----------|-----|
| 95° C | 5 min | |
| 96° C | 15 sec | |
| 58° C | 30 sec | 20x |
| 72° C | 3 min | |
| 72° C | 3 min | |
| 10° C | ∞ | |

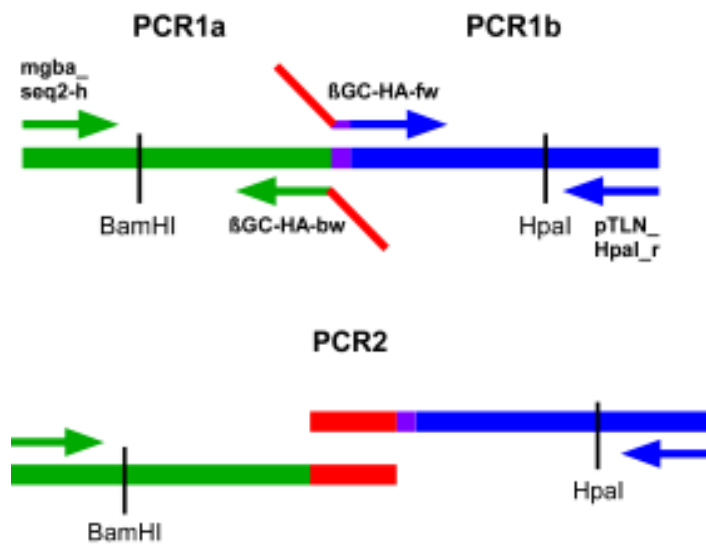


Abb. 3.3: Strategie der Fusions-PCR.

Das Prinzip der Fusions-PCR ist im Text erläutert. (s. Abschnitt 3.2.1.7.3)

3.2.1.7.4 *Nested*-PCR (Mycoplasmendetektion)

Die PCRs für die Mycoplasmendetektion wurden mit Primerpaaren (Tab. 3.3) durchgeführt, die komplementär zu DNA-Bereichen des Mycoplasmengenoms waren. Wie bei der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Fusions-PCR wurden zwei PCR-Schritte, PCR1 und PCR2, durchgeführt, wobei mycoplasmenspezifische DNA-Bereiche amplifiziert wurden.

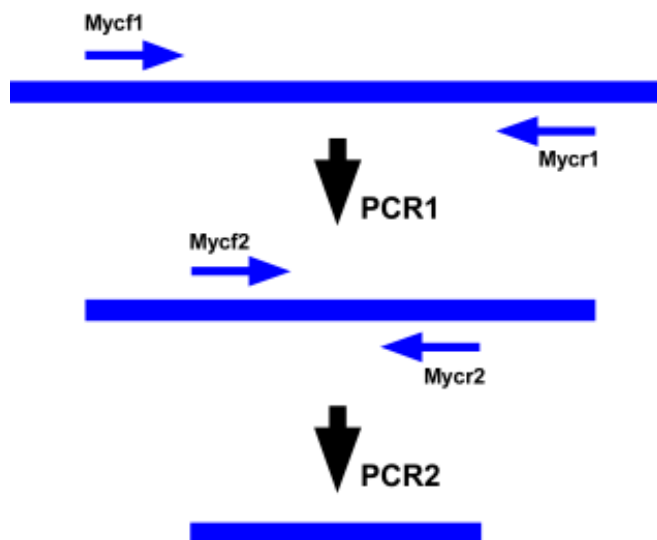


Abb. 3.4: Strategie für eine *Nested*-PCR Das Prinzip der *Nested*-PCR ist im Text erläutert. (s. Abschnitt 3.2.1.7.4)

Das Produkt der ersten PCR wurde dabei als Template für die zweite PCR verwendet (s. Abb. 3.4). Dazu lag das Primerpaar für die zweite PCR innerhalb des ersten Primerpaares, wodurch die unspezifischen Amplifikationsprodukte der ersten Runde wegselektiert wurden. Auf diese Weise konnten sehr geringe Ausgangs-DNA-Mengen nachgewiesen werden, was zu der hohen Sensitivität des Nachweises führte. Da die Produkte der Mycoplasmen-PCR nicht für Klonierungsreaktionen benötigt wurden, wurde diese mit der Taq-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot, D) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. In den Tab. 3.19 - 3.22 sind die Standardprotokolle für diese Methode aufgeführt.

Tab. 3.19: *Nested*-PCR 1

| Substanz | 1x |
|----------------------|--------|
| Zellkulturüberstand | 1 µl |
| Primer Mycf1 (10 µM) | 1 µl |
| Primer Mycr1 (10 µM) | 1 µl |
| dNTPs (2 mM) | 2,5 µl |
| 10x-Puffer | 5 µl |
| Taq-Polymerase | 0,5 µl |
| ddH ₂ O | 39 µl |

Tab. 3.20: *Nested*-PCR-Programm 1

| | | |
|-------|--------|-----|
| 94° C | 3 min | |
| 96° C | 15 sec | |
| 55° C | 2 min | 36x |
| 72° C | 1 min | |
| 72° C | 6 min | |
| 10° C | ∞ | |

Tab. 3.21: Fusions-PCR-Mix 2

| Substanz | 1x |
|----------------------|--------|
| PCR1-Produkt | 1 µl |
| Primer Mycf2 (10 µM) | 1 µl |
| Primer Mycr2 (10 µM) | 1 µl |
| dNTPs (2 mM) | 2,5 µl |
| 10x-Puffer | 5 µl |
| Taq-Polymerase | 0,5 µl |
| ddH ₂ O | 39 µl |

Tab. 3.22: Klonierungs-PCR-Programm

| | | |
|-------|--------|-----|
| 94° C | 3 min | |
| 94° C | 30 sec | |
| 55° C | 2 min | 36x |
| 72° C | 1 min | |
| 72° C | 6 min | |
| 10° C | ∞ | |

3.2.1.8 Restriktionsverdau

Die Reaktionsbedingungen für die verwendeten Enzyme entsprachen weitgehend den Angaben des Herstellers Fermentas (St. Leon-Rot, D). Restriktionsverdaue, die zur Klonierung verwendet wurden, wurden in einem Ansatzvolumen von 50 µl durchgeführt. Dabei wurde die gesamte Menge des durch PCR erzeugten DNA-Fragmentes bzw. 4 µg des Zielvektors mit 20 U Enzym 3 Std bei 37° C lang verdaut.

Um die richtige Orientierung und Größe des bei Umklonierungen in einen anderen Vektor eingefügten Fragmentes zu überprüfen, wurden Kontroll-Restriktionsverdaue durchgeführt. Dabei wurden 1,5 µg DNA in einem 30 µl Ansatz mit 10 U Enzym verdaut und anschließend im Agarosegel aufgetrennt.

3.2.1.9 Dephosphorylierung

Vor Ligationen wurde der verdaute Leervektor dephosphoryliert, um die Religation des Vektors ohne *Insert* zu vermeiden. Die Dephosphorylierung wurde mit der alkalischen Phosphatase CIAP (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*, Fermentas, St. Leon-Rot, D) durchgeführt. Es erfolgte eine 15-minütige Inkubation des Restriktionsansatzes bei 37° C mit 2 U CIAP im Thermoblock, gefolgt von einer 15-minütigen Inaktivierung der CIAP bei 85° C. Anschließend wurde die DNA durch Agarosegelelektrophorese von den Restriktionsendonukleasen und der CIAP getrennt und anschließend wie in Abschnitt 3.2.1.3 beschrieben aufgereinigt.

3.2.1.10 Ligation

Für Ligationen wurden 1 µl (entspricht 1 U) T4 DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot, D) und 1 µl 10x Ligasepuffer mit variablen Mengen an geschnittenem *Insert* und verdaulichem, dephosphoryliertem Leervektor zusammenpipettiert und mit autoklaviertem ddH₂O auf 10 µl aufgefüllt. Bei allen durchgeführten Ligationen handelte es sich um *sticky-end*-Ligationen. Bei allen Reaktionen

wurde ein ungefährender siebenfacher Überschuss an *Insert*-Molekülen gegenüber dem Leervektor eingesetzt. Das Verhältnis von *Insert*-Molekülen zu Vektor-Molekülen wurde durch Agarosegelelektrophorese abgeschätzt, wobei grob berücksichtigt wurde, dass die Ethidiumbromidintensität sowohl zur DNA-Menge als auch zur DNA-Länge proportional ist. Es erfolgte eine Über-Nacht-Inkubation bei 17° C im Wasserbad. Als Negativkontrolle wurde anstelle des *Inserts* Wasser eingesetzt, um die Religationsfähigkeit des Vektors abzuschätzen. Nach Ablauf der Ligation wurde der Ansatz zur Inaktivierung der Ligase 10 min bei 65° C erhitzt.

3.2.1.11 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden von der MWG-Biotech AG (Ebersberg, D) durchgeführt. Sie erfolgten nach dem Kettenabbruchverfahren (Sanger et al., 1977) mithilfe fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide (*Dyeterminators*). Die Sequenzen wurden mit den Programmen DNASTAR (Lasergene, Madison, WI, USA) ausgewertet.

3.2.2 Southern-Blot-Analyse

Die *Southern-Blot*-Analyse wurde mit genomischer DNA aus embryonalen Stammzellklonen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen einer konfluenten 3 cm-Schale in 700 µl NET-Puffer (s. Anhang) resuspendiert. 70 µl Proteinase K-Lösung (2 mg/ml Proteinase K in NET-Puffer) und 70 µl 10 %-ige SDS-Lösung wurden hinzugegeben und die Ansätze über Nacht bei 56° C unter Schütteln im Thermoblock inkubiert.

Zur Entfernung von Proteinen und Lipiden aus der DNA-Präparation wurde der Ansatz mit 840 µl einer Mischung aus 50 % Phenol, 48 % Chloroform und 2 % Isoamylalkohol versetzt, gut gemischt und 3 min bei 14.000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit 800 µl einer Mischung aus 96 % Chloroform und 4 % Isoamylalkohol versetzt, gut gemischt und erneut zentrifugiert. Aus der wässrigen Phase wurde durch Zugabe von 1600 µl reinem Ethanol die DNA gefällt und mit einer Pasteurpipette entnommen. Die DNA wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 200 - 500 µl ddH₂O aufgenommen.

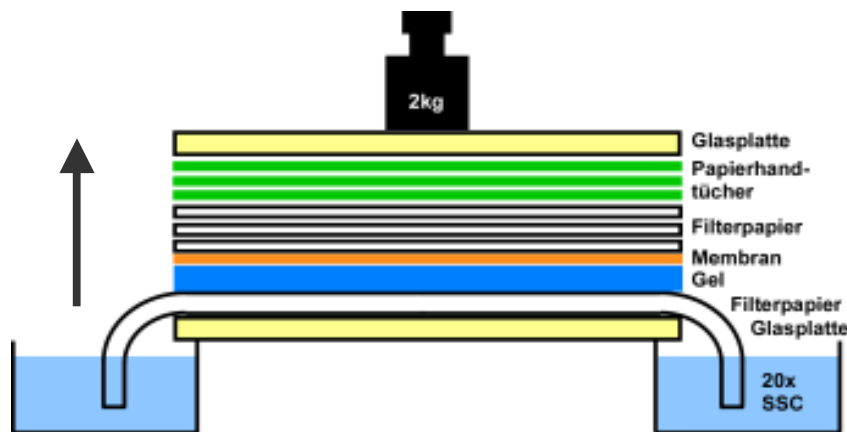


Abb. 3.5: Versuchsaufbau für einen Southern Blot. Die Abbildung zeigt die Technik des Transfers von Nukleinsäuren aus Agarosegelen auf Hybond-N+-Nylon-Membranen. Der Pfeil zeigt die Richtung des Flüssigkeitsstroms an, durch den die DNA aus Agarosegelen auf die darüberliegende Membran übertragen wird.

Die Konzentration der isolierten DNA und deren Reinheit wurde wie in Abschnitt 3.2.1.1 beschrieben photometrisch bestimmt. 15 µg der genomischen DNA wurden wie in Abschnitt 3.2.1.8 dargestellt mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und wie in Abschnitt 3.2.1.2 erläutert in einem 0,8 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wird die DNA im Agarosegel denaturiert. Dazu wurde das Gel zweimal 15 min in Denaturierungslösung (s. Anhang) geschwenkt und danach zweimal 15 min in Neutralisierungslösung (s. Anhang) inkubiert. Abschließend wurde das Gel 10 min in 20x SSC-Puffer (s. Anhang) äquilibriert und die DNA über Nacht auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham, Little Chalfont, UK) transferiert (s. Abb. 3.5). Die Nylonmembran wurde getrocknet und die DNA durch 15-sekündige Bestrahlung mit UV-Licht (BioLink 254 nm, Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, Frankreich) fest an die Membranoberfläche gebunden. Zur weiteren Fixierung wurde die Membran zusätzlich 30 min bei 80° C gebacken.

Die Hybridisierungssonde wurde nach Angaben des Herstellers mit dem „Megaprime-Kit“ (Amersham, Little Chalfont, UK) mit α -³²P-dCTP radioaktiv markiert. Die Membran wurde 10 min mit 5 ml Hybridisierungspuffer (s. Anhang) in einem 50 ml-Röhrchen auf einem Rollkippschüttler vorinkubiert. Sodann wurde die radioaktiv-markierte DNA-Sonde zusammen mit Lachsspermien-DNA (Invitrogen, Paisley, UK, Endkonzentration 100 µg/ml) 5 min bei 95° C denaturiert und in den Hybridisierungspuffer zur Membran gegeben. Es wurden 1 - 2x 10⁶ cpm DNA-Sonde pro Milliliter Hybridisierungspuffer eingesetzt. Die Röhrchen wurden über Nacht bei 42° C in einem Wärmeschrank gerollt.

Am nächsten Morgen wurde der radioaktive Hybridisierungsmix abgenommen und die Filter zweimal 10 min bei Zimmertemperatur (RT) mit 2x SSC-Puffer/0,1 % SDS gewaschen.

Anschließend erfolgten zwei Waschschrte in 0,2x SSC-Puffer/0,1 % SDS für 20 min bei 65° C. Die Filter wurden in Folie eingeschweißt und zwischen zwei Verstärkerfolien (Cronex, Dupont Co., Wilmington, DE, USA) bei -70° C mit einem XAR-Röntgenfilm (Kodak, Rochester, NY, USA) autoradiographiert.

3.2.3 Northern-Blot-Analyse

Die Gesamt-RNA wurde nach Herstellerangaben mit „RNAeasy“ Säulen (Qiagen, Hilden, D) aus den entsprechenden Zellen und Geweben isoliert. Diese RNA wurde in einem 1,2 %-igen FA-Agarosegel (s. Anhang) aufgetrennt und wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben auf Hybond-N+-Nylonfilter (Amersham, Little Chalfont, UK) geblottet und fixiert. Die Sonden wurden mit dem „Prime-It II Random Primer Labelling Kit“ (Stratagene, LaJolla, CA, USA) nach Angaben des Herstellers mit α -³²P-dCTP radiaktiv markiert und mithilfe der „ProbeQuant G-50 Micro Columns“ (Amersham, Little Chalfont, UK) aufgereinigt. Die Filter wurden wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben über Nacht mit den radioaktiv markierten DNA-Sonden inkubiert, gewaschen und auf eine *Imaging*-Platte (Fuji BAS-MP 2025P, Fujifilm, Tokyo, Japan) gelegt, die mit dem Fuji FLA-5000 Phosphoimager (Fujifilm, Tokyo, Japan) entwickelt wurde.

Eine mLIMP1-mRNA-spezifische Hybridisierungsprobe wurde durch Amplifikation eines 368 bp großen Fragmentes aus cDNA des Mausstamms SV129 hergestellt, welches die Exons 2 - 5 der mLIMP-1-cDNA umfasst (Primer: M-CD63-4: 5'-GCGGTGGAAGGAGGAATGA-3', M-CD63-3: 5'-ATAGTGGCTGTTTTGTTGT-3'). Die GAPDH-spezifische Hybridisierungsprobe wurde mit folgenden Primern amplifiziert: GAPDH_mus_F2: CGCATCTTCTTGTGCAGTGC; GAPDH_mus_R3: GGTGGTCCAGGGTTTCTTAC. Die mβGC-spezifische Sonde wurde aus dem Vektor pTLN-mβGC hergestellt. In diesem Vektor war eine NcoI-Schnittstelle bei Base 422 der mβGC-cDNA durch Fusions-PCR mutiert worden (CCATGG → CGATGG). Durch Verdau des Vektors pTLN-mβGC mithilfe der Restriktionsenzyme NcoI und AvrII entstand eine 850 bp große Sonde.

3.2.4 Reverse-Transkriptase-PCR

Die Ausgangs-mRNA zur Durchführung einer Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) wurde entsprechend den Herstellerangaben mittels „RNAeasy“ Säulen (Qiagen, Hilden, D) aus murinen embryonalen Fibroblasten isoliert. Zur Eliminierung von in der Präparation verbliebender DNA wurde die isolierte RNA mit DNase behandelt („RNase-Free DNase Set“; Qiagen, Hilden, D).

2 µg dieser mRNA wurden mit dem „Omniscript Reverse Transcriptase System“ (Qiagen, Hilden, D) und „Oligo(dT)15-Primern“ (Promega, Madison, WI, USA) entsprechend dem Herstellerprotokoll in cDNA umgeschrieben. Zur Amplifikation der LIMP-1- bzw. der Aktin-cDNA wurden spezifische Primer (s. Tab. 3.3) in einer Standard-PCR-Reaktion verwendet, wie sie auch zur Genotypisierung durchgeführt wurde (s. Abschnitt 3.2.1.7.1).

3.2.5 Zellkultur

3.2.5.1. Zellkulturbedingungen und -kultivierung

Der Umgang mit lebenden Säugerzelllinien erfolgte an einer Sterilbank. Unsterile Materialien und Geräte wurden vor Gebrauch autoklaviert, sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße) oder mit 70 %-igem Ethanol desinfiziert. Alle Gefäße mit sterilem Inhalt wurden nur unter der Arbeitsbank geöffnet. Hände und Arbeitsfläche wurden bei jedem Arbeitsgang mit „Pursept-A“ (Merz Pharma, Frankfurt a. M., D) desinfiziert. Medien und Trypsin wurden bei 4° C aufbewahrt und vor jeder Anwendung auf 37° C erwärmt. Die Zelllinien wurden in 25 mm²-Kulturflaschen in „DMEM High Glucose“ (PAA Laboratories, Linz, Österreich) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) (30 min hitzeinaktiviert bei 56° C, PAA Laboratories, Linz, Österreich), 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin, im Folgenden auch (vollständiges) Zellkulturmedium genannt, in einem Begasungsbrutschrank mit 5 %-iger CO₂- und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre bei 37° C kultiviert. Da im Rahmen dieser Arbeit alle Brutschrankinkubationen mit 5 %-iger CO₂- und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre bei 37° C stattfanden, wird dieses im Folgenden nicht gesondert erwähnt. Nach Erreichen der Konfluenz wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, um das Trypsininhibitoren enthaltende FCS zu entfernen. Es folgte eine etwa vierminütige Inkubation im Brutschrank mit 500 µl 0,25 % Trypsin in 0,03 % EDTA (PAA Laboratories, Linz, A). Sodann wurden die Zellen durch leichtes Schütteln und Klopfen vom Boden der Zellkulturflasche abgetrennt und die Enzymreaktion durch Zugabe von 4,5 ml vollständigem Zellkulturmedium beendet. Anschließend wurden die Zellen sorgfältig mit Zellkulturpipetten zu Einzelzellsuspensionen resuspendiert. Je nach Wachstumseigenschaften der jeweiligen Zelllinie fand eine 2 - 20-fache Verdünnung der Zellen in vollständigem Zellkulturmedium statt, bevor die Zellen wieder ausgesät wurden. Für die verschiedenen Versuche wurden die Zellen auf 100 mm-Schalen (10 ml Medium), 6 mm-Schalen (5 ml Medium) oder 35 mm-Schalen (2 ml Medium) ausgesät.

3.2.5.2 Einfrieren von Zellen zur Aufbewahrung

Die einzufrierenden Zellen wurden auf 100 mm-Schalen bis zu einer etwa 80 %-igen Konfluenz kultiviert, wie in Abschnitt 3.2.5.1 beschrieben trypsinisiert und wieder in vollständigem Zellkulturmedium aufgenommen. Zum Entfernen des Trypsins wurde die Zellsuspension zentrifugiert (600 rpm, 5 min, Universal 32, Typ 1605, Hettich, Tuttlingen, D) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in vollständigem Zellkulturmedium aufgenommen, resuspendiert und auf Eis abgekühlt. Dabei entsprach das Volumen an zugegebenem Zellkulturmedium der Hälfte des einzufrierenden Gesamtvolumens. Die andere Hälfte wurde nach Abkühlen der Zellsuspension mit Gefriermedium (20 % DMSO in vollständigem Zellkulturmedium) aufgefüllt. Aus einer 100 mm-Schale wurden insgesamt 2 ml Zellsuspension hergestellt, die zu je 1 ml auf 1,5 ml-Schraubdeckelampullen verteilt wurden. Es folgte eine eintägige Abkühlphase der Ampullen in Styroporbehältern im -80°C -Gefrierschrank. Anschließend wurden die Zellen zur langfristigen Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingelagert.

3.2.5.3 Auftauen von Zellen zur Kultivierung

Die aufzutauenden Ampullen wurden aus dem Behälter mit flüssigem Stickstoff entnommen und nach einer kurzen Zeit des Auftauens bei Raumtemperatur unter der Sterilbank kurz geöffnet, um bei der Lagerung möglicherweise entstandenen Druck durch eingedrungenen flüssigen Stickstoff abzulassen. Das verschlossene Gefäß wurde anschließend im 37°C -Wasserbad aufgewärmt, bis nur noch ein kleines Eisstück in der Ampulle sichtbar war. Das Gefäß wurde mit „Pursept-A“ (Merz Pharma, Frankfurt a. M., D) desinfiziert, unter der Sterilbank mit 5 ml vollständigem Zellkulturmedium resuspendiert und 3 min zentrifugiert (600 rpm, Universal 32, Typ 1605, Hettich, Tuttlingen, D). Das Pellet wurde in 5 ml vollständigem Zellkulturmedium aufgenommen und zur Kultivierung in einer 25 mm^2 -Flasche in den Brutschrank gestellt. Am folgenden Tag wurde das Anwachsen der aufgetauten Zellen kontrolliert und beim Vorhandensein vieler toter Zellen das Medium gewechselt.

3.2.5.4 Herstellung muriner embryonaler Fibroblasten

Zur Gewinnung muriner embryonaler Fibroblasten (MEF) wurden eine männliche und eine weibliche Maus gegen 18.00 Uhr zusammen in einen Käfig gesetzt. Am nächsten Morgen wurde kontrolliert, ob sich ein *Plug* in der Vagina des Weibchens als Zeichen der erfolgten Paarung gebildet hat. 13,5 Tage später wurde das Weibchen durch aus Trockeneis freigesetztem CO_2

erstickt und der Uterus chirurgisch herauspräpariert. Die Embryonen wurden in PBS aus dem Uterus und der Amnionhöhle herausgelöst und nochmals in frischem PBS gereinigt. Vom Embryonalgewebe wurden die roten Organe (Herz, Leber, Milz) mit einer Pinzette entfernt und jeder Embryo einzeln in eine 3cm-Schale gesetzt. Der Kopf wurde zur Genotypisierung (s. Abschnitte 3.2.1.6 und 3.2.1.7.1) mit einem Skalpell abgeschnitten. Die Embryonen wurden mit einem sterilen Skalpell in möglichst kleine Stücke geschnitten, wobei auch das Plastik der Schale angeritzt wurde. An diesen Schnitten konnten die Gewebestücke gut an- und auswachsen. Bis zum Auswachsen der Embryonenstücke wurden die Fibroblasten in vollständigem Zellkulturmedium mit 50 % FCS kultiviert, bevor der FCS-Gehalt langsam auf 20 % und anschließend auf 10 % FCS gesenkt wurde.

Die MEF wurden entweder zwischen Passage drei und sechs als primäre Zelllinien verwendet oder mit dem großen SV-40-Antigen immortalisiert.

3.2.5.5 Mycoplasmendetektion

Es wurde in regelmäßigen Abständen untersucht, ob die kultivierten Zellen mit Mycoplasmen infiziert waren. Die Detektion erfolgte auf zwei Wegen.

DAPI-Färbung: Es wurde eine Färbung mit dem DNA-Farbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) (Sigma Aldrich, Steinheim, D) durchgeführt (Russel et al., 1975). Der Vorteil dieser Methode besteht in der einfachen Durchführung. Die Sensitivität des Verfahrens beschränkt sich aber auf ein relativ spätes Stadium der Infektion. Die auf Deckgläschen ausgesäten Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und in einem Mowiol/Diazobicyclooctan (DABCO)-Gemisch (s. Anhang), das 1 µg/ml DAPI enthielt, auf Objektträgern fixiert. Waren zusätzlich zu den Zellkernen weite Bereiche des Zytoplasmas und zum Teil auch extrazelluläre Bereiche unregelmäßig angefärbt, wurde auf eine Infektion mit Mycoplasmen geschlossen.

Nested-PCR: Für einen genaueren Nachweis wurde ein Mycoplasmen-Test mit Hilfe einer *Nested-PCR* (s. Abschnitt 3.2.1.7.4) durchgeführt, bei der in Anwesenheit von Mycoplasmen Fragmente mit einer Länge von 300 - 500 bp entstanden. Den Zellkulturgefäßen wurden zwei Tage nach dem Aussäen der Zellen 200 µl Medium entnommen und das Medium 5 min bei 95° C im Thermoblock inaktiviert. Anschließend wurden die Eppendorfgefäße mit dem Medium 1 min bei 4000 rpm in einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5415C oder 5415D, Eppendorf, Hamburg, D) zentrifugiert. 1 µl des Überstandes wurde für die PCR verwendet. Bei jedem Versuch wurden eine Positivkontrolle mit dem Überstand einer Zelllinie, bei der früher eindeutiger

Mycoplasmenbefall nachgewiesen werden konnte, und eine Negativkontrolle, bei der anstelle des Überstandes 1 µl autoklaviertes ddH₂O eingesetzt wurde, mitgeführt. Die hohe Sensitivität des Verfahrens ermöglichte eine sichere Mycoplasmandetektion schon in frühen Infektionsstadien.

Während der Arbeit konnte bei keiner der verwendeten Zelllinien eine Mycoplasmeninfektion festgestellt werden.

3.2.6 Gewinnung von Makrophagen aus der Peritonealhöhle

Aufgrund des geringen Blutvolumens einer Maus (ca. 1 - 1,5 ml), gestaltet sich die Isolation von Makrophagen aus dem Blut schwierig und erfordert eine hohe Zahl an Tieren. Eine wesentlich einfachere Methode zur Gewinnung von Makrophagen stellt die Isolation von infiltrierenden Makrophagen aus der Peritonealhöhle nach Induktion einer Peritonitis dar. In der Regel lassen sich ca. 1×10^7 Makrophagen pro Maus aus der Peritonealhöhle isolieren. Die physiologischen Eigenschaften peritonealer Zellen können allerdings durch die Exposition mit inflammatorischen Agentien verändert sein (Elzouki et al., 1994). Die Induktion mit Thioglykolat liefert parziell aktivierte Zellen.

Ca. sechs Monate alten Mäusen wurde zunächst 1 ml 4 %-ige Thioglykolatlösung intraperitoneal injiziert. Nach vier Tagen wurden die Mäuse auf Trockeneis getötet und 15 ml eiskaltes PBS/0,02 % EDTA in die Peritonealhöhle gespritzt. Anschließend wurden die Mäuse sorgfältig massiert. Nachdem das Peritoneum chirurgisch freigelegt wurde, wurde das PBS/0,02 % EDTA wieder aus der Peritonealhöhle gesaugt. Die gesammelte Peritonealflüssigkeit wurde 5 min bei 200 g zentrifugiert. Verunreinigungen durch Erythrozyten wurden durch eine 5-minütige Inkubation mit 3 ml Erythrozyten-Lysispuffer (s. Anhang) entfernt. Die Reaktion wurde durch Hinzugabe von 10 ml PBS abgestoppt und die Zellsuspension erneut 5 min bei 200 g zentrifugiert. Die Zellen wurden in DMEM-Medium (10 % FCS, mit Pen/Strep) aufgenommen und die Zellzahl des Peritonealexsudats wurde in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt (s. Abschnitt 3.2.7). Jeweils 5×10^6 Zellen wurden in einer 6 cm-Schale ausgesät und bei 37° C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach 3 Std wurden die Zellen zur Entfernung nicht- bzw. wenig-adhärenter Zellen dreimal mit DMEM-Medium gewaschen und anschließend ein bis vier weitere Tage kultiviert.

Die Identität der isolierten Makrophagen wurde entweder mittels FACS (s. Abschnitt 3.2.15) oder über immunozytochemische Färbungen (s. Abschnitt 3.2.14.2) mithilfe eines Antikörpers

sichergestellt, der gegen das Makrophagen-spezifische, 160 kDa große Glykoprotein F4/80 (Austyn und Gordon, 1981) gerichtet ist.

3.2.7 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Um die Zellzahl einer Zellsuspension zu bestimmen, wurden die Zellen zunächst 1:1 mit 0,4 %-iger Trypanblau-Lösung gemischt und in die Zählkammer pipettiert. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Er dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Zytosol und färbt diese Zellen tiefblau. Bei der Auszählung wurden nur die lebenden Zellen berücksichtigt. Die durchschnittliche Anzahl von Zellen in einem Großquadrat $\times 10^4$ entspricht der Zellzahl pro Milliliter. Bei der Berechnung der Zellzahl wurde der Verdünnungsfaktor, der durch das Mischen mit Trypanblau entstand, berücksichtigt.

3.2.8 Isolierung von Sammelrohren aus der Mausniere

Sammelrohre aus der Mausniere wurden in Zusammenarbeit mit Nina Himmerkus und Markus Bleich (Physiologisches Institut, Universität Kiel) isoliert. Das Prinzip der Tubuli-Präparation (modifiziert nach Schafer et al., 1997) beruht auf einem nahezu vollständigen Bindegewebsverdau der Niere mit den Enzymen Kollagenase Typ II und Protease Typ XIV, bei dem nur noch einzelne Tubulusfragmente erhalten bleiben. Diese können unter einem Binokular identifiziert, sortiert und danach primär kultiviert werden. Ausgewachsene Mäuse wurden mit 2,5 % Isofluran in 500 - 1000 ml/min Luft (1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyl-difluoromethylether, Forene®, Abbott GmbH, Wiesbaden, D) mithilfe eines „Dräger Vapor® 19.n Narkosemittel-Verdunsters“ (Dräger AG, Lübeck, D) in Narkose versetzt und die Aorta und die Nieren chirurgisch freigelegt. Die Aorta wurde ca. 0,7 cm unter dem Abzweigungspunkt der renalen Arterien kurz oberhalb der Bifurkation mit einer Gefäßklemme verschlossen. Anschließend wurde die Aorta von dem umgebenden Bindegewebe freipräpariert und mit einer feinen Gefäß-Federschere senkrecht zum Gefäßverlauf zu ungefähr zwei Dritteln des Durchmessers eingeschnitten, während der Blutfluss gleichzeitig oberhalb der Schnittstelle manuell mit Hilfe eines Wattestäbchens unterbunden wurde. Ein auf ca. 0,05 cm Durchmesser ausgezogener Katheter aus Polyethylen (Innendurchmesser: 0,5 mm, Außendurchmesser: 1 mm, Eydam, Kiel, D) wurde vorsichtig in das Gefäß eingeführt. Bei korrekter Lage des Katheters kam es nach Lösen des Drucks mit dem Wattestäbchen zum retrograden Einstrom von Blut in den Katheter.

Mit einer über eine Augenkannüle auf den Katheter aufgesetzten 1 ml-Spritze wurden zügig ca. 1 ml 38° C warme Enzymlösung (1 mg/ml Kollagenase Typ II, 1 mg/ml Protease Typ XIV in Inkubationslösung, s. Anhang) über den Katheter in die Aorta und die Nieren perfundiert. Die Nieren wurden danach sofort entnommen, von ihrer Kapsel befreit und der mittlere Teil der Nieren mit einem frischen Skalpell in feine Scheiben geschnitten (Dicke: 0,02 - 0,05 cm). Die Scheiben wurden in ein Eppendorfgefäß mit 1 ml Enzymlösung überführt und 10 min in einem Thermoblock (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg, D) unter leichtem Schütteln (850 rpm) bei 38° C inkubiert. Der Überstand wurde in ein frisches 2 ml- Eppendorfgefäß auf Eis überführt und mit eiskalter Sortierlösung (5 mg/ml Albumin in Inkubationslösung) auf 2 ml aufgefüllt. Dieses Eppendorfgefäß wurde auf Eis gelagert, während das noch nicht vollständig verdaute Nierengewebe mit noch ausreichend vorhandenem Enzym mit 1 ml Inkubationslösung aufgefüllt und bei 38° C für weitere 5 min inkubiert wurde. Diese Prozedur wurde noch zwei weitere Male wiederholt, so dass man pro Niere insgesamt drei Eppendorfgefäße mit verschiedenen lang verdauten Tubulusgemischen erhielt. Sammelrohrabschnitte fanden sich vornehmlich in der zweiten und dritten Präparation. Diese wurden in eine Petrischale mit Sortierlösung überführt und bei 4° C unter dem Binokular anhand ihrer Morphologie identifiziert und sortiert. Als Identifikationsmerkmale dienten die im Vergleich zu anderen Tubulusabschnitten unruhige Morphologie mit ins Lumen vorgewölbten Schaltzellen, Verzweigungen und der Zusammenhang mit anderen Abschnitten des distalen Nephrons sowie die vorhandenen Kaliberänderungen und Verjüngung in Richtung Mark.

Die isolierten Sammelrohre wurden entweder direkt mit Satavaptan oder Vasopressin stimuliert und fixiert oder zunächst kultiviert. Für die direkte Stimulation wurden die Sammelrohre in ein Eppendorfgefäß überführt, das 0,2 ml Quantum-286-Medium für Epithelzellen (PAA Laboratories, Linz, Österreich, mit L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin) enthielt. Zur Kultivierung wurden die Tubuli in Gewebekulturplatten mit 24 Vertiefungen auf Deckgläschen in 0,4 ml Quantum-286-Medium gegeben und drei Tage lang bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Inkubation mit Satavaptan (Endkonzentration 10⁻⁸ M, Sanofi-Aventis, Frankfurt, D) oder Vasopressin (AVP = Arginin-Vasopressin, Endkonzentration: 100 µU/ml, Sigma Aldrich, Steinheim, D) erfolgte jeweils für 20 min bei 37° C und 5 % CO₂.

Anschließend wurden die Sammelrohre wie in Abschnitt 3.2.14.2 beschrieben mit 4 % PFA/PBS fixiert und immunozytochemisch gefärbt. Für die nicht kultivierten, sondern direkt stimulierten Tubuli wurde die Färbung im Eppendorfgefäß durchgeführt, indem die Lösungen auf die

Sammelrohre gegeben wurden. Es wurde jeweils gemischt, gewartet bis sich die Sammelrohre wieder abgesetzt hatten, der Überstand abgenommen und die neue Lösung hinzugegeben.

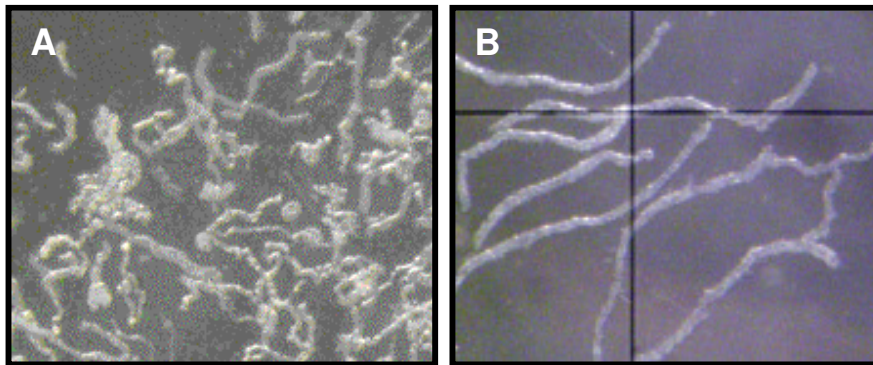


Abb. 3.6: Isolierung von Sammelrohren aus der Mausniere. A) Unsortierte Nierentubuli B) Sammelrohre (Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Dr. Nina Himmerkus (Physiologisches Institut, Universität Kiel, D))

3.2.9 Transfektion

3.2.9.1 Transiente Transfektionen

Bei allen in dieser Arbeit durchgeführten transienten Transfektionen wurden die Vektoren durch Lipofektion in Säugerzellen eingeführt. Bei dieser Methode wird die Vektor-DNA mit kationischen Lipiden zu Liposomen komplexiert. Die DNA enthaltenden Liposomen fusionieren mit der Säugerzelle, woraufhin die Vektor-DNA in die Zelle entlassen wird (Felgner et al., 1987). Das Lipofektionsreagenz Fugene6 wurde von Roche (Basel, Schweiz) bezogen.

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen je nach Verwendungszweck auf vier Deckgläschen in 35 mm-Schalen oder in 35 mm-, 60 mm- oder 100 mm-Schalen ohne Deckgläschen ausgesät. Die Zellen wiesen am Tag der Transfektion eine Konfluenz von ca. 10 % für immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen und eine Konfluenz von ca. 60 % für eine Verwendung im *Western Blot* auf. Die Transfektion erfolgte mit 1 µg - 1,5 µg DNA pro 35 mm-Schale, 3 µg DNA pro 60 mm-Schale und 3 µg - 4,5 µg DNA pro 100 mm-Schale. Für die Komplexierung wurden 3 µl Fugene6 pro 1 µg DNA verwendet. Bei der weiteren Durchführung wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. 48 - 72 Std nach Transfektion wurden die Deckgläschen für (immun)fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen fixiert oder die Zellen für *Western Blot* oder Immunopräzipitation geerntet (vergl. Abschnitt 3.2.10).

3.2.9.2 Transfektion von siRNA

HeLa-Zellen wurden in 6-well-Platten ausgesät und bis zum Erreichen einer 80 %-igen Konfluenz wachsen gelassen. Die Zellen wurden mit jeweils 60 pmol siRNA (s. Tab. 3.5) bzw. Kontroll-siRNA (Invitrogen, Paisley, UK) und 10 µl Lipofectamin2000 entsprechend den Herstellerangaben transfiziert (Invitrogen, Paisley, UK).

3.2.10 SDS-PAGE und Western Blot

3.2.10.1 SDS-PAGE Probenvorbereitung

Die im folgenden beschriebenen Schritte wurden alle auf Eis durchgeführt, um eine proteolytische Degradierung der Proteine zu vermeiden. Ein weiterer Schutz vor Proteindegradierung wurde erreicht, indem den Lysaten *Complete*-Proteaseinhibitor (Roche, Basel, Schweiz) zugesetzt wurde. Das Proteaseinhibitorgemisch wurde als 25-fache, wässrige Stammlösung bei -20° C gelagert. Für die Detektion der untersuchten Proteine wurden entweder Zell- oder Gewebeextrakte verwendet.

Zur Untersuchung von Zellen wurden diese pelletiert. Dazu wurden die Zellkulturschalen auf Eis gestellt und die Zellen nach Absaugen des Mediums einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem biegsamen Zellschaber abgeschabt und mit 500 µl eiskaltem PBS in 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt. Die Eppendorfgefäße wurden 10 min bei 4° C und 14.000 rpm (13.000 g) in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet entweder direkt weiterverwendet oder bis zur Weiterverarbeitung bei -20° C eingefroren. Das Zellpellet wurde je nach Größe mit 50 - 500 µl Lysispuffer (0,1 - 0,5 % Triton X-100 in PBS mit *Complete* Proteaseinhibitor) durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren mit einer 100 µl-Eppendorfpipette lysiert.

Zur Untersuchung von Mausgeweben wurden einzelne Organe chirurgisch aus der Maus entnommen. Die Organe wurden mit einem Skalpell grob zerkleinert und mit 5 µl Lysispuffer pro 1 µg Gewebe versetzt. Die Proben wurden mit Hilfe des „precellis 24“-Gewebehomogenisators (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich) homogenisiert (zweimal 15 sec, Stufe 3000, 30 sec Pause).

Sowohl Zell- als auch Gewebeproben wurden zweimal 20 sec mit 30 % der Maximalkapazität eines Ultraschallbades (Branson Sonifier 450, G. Heinemann, Schwäbisch-Gmünd, D) behandelt. Im Anschluss wurde das Lysat 10 min bei 4° C und 14.000 rpm (13.000 g) zur Abtrennung von Zellkernen und anderem Zelldebris in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde

verworfen und mit dem Überstand eine Proteinbestimmung (vergl. Abschnitt 3.2.10.2) durchgeführt. Das Lysat wurde mit fünffach konzentriertem, reduzierendem SDS-PAGE Probenauftragspuffer (s. Anhang) versetzt und 3 min im Thermoblock bei 95° C erhitzt. Die Proben wurden entweder direkt auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen oder bei -20° C verwahrt.

3.2.10.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteingehaltsbestimmung erfolgte nach der Bicinchoninsäure (BCA)-Methode mit einem Kit der Firma Pierce (Rockford, USA) im 96-*well*-Format. Es wurde die Extinktion bei 562 nm gemessen. Als Standard dienten serielle BSA-Verdünnungen in ddH₂O. Es wurden Dreifachwerte gemessen und der Mittelwert wurde für die Berechnung der Proteinkonzentration verwendet.

3.2.10.3 Deglykosylierung mit N-Glykosidase F und Endoglykosidase H

Für die Deglykosylierung wurden N-Glykosidase F (PNGase F) und Endoglykosidase H (Endo H) von Roche (Mannheim, D) verwendet. Die gewählten Bedingungen entsprachen dabei den Angaben des Herstellers. Zuvor wurden Zelllysate wie in Abschnitt 3.2.10.1 beschrieben hergestellt und der Proteingehalt bestimmt (s. Abschnitt 3.2.10.2). Beim Verdau mit PNGase F wurden die Proteine des Zellextraktes zunächst in PNGase F-Puffer 1 (s. Anhang) durch eine 5-minütige Inkubation bei 95° C denaturiert. Anschließend wurden neun Teile PNGase F-Puffer 2 (s. Anhang) hinzugefügt. Bei der Deglykosylierung mit Endo H wurden Denaturierung und Verdau in 100 mM Natriumcitratpuffer (Endo H-Puffer, s. Anhang) durchgeführt. Es wurde jeweils 1 U PNGase F bzw. Endo H für 100 µg Protein verwendet. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37° C. Die Deglykosylierung konnte im *Western Blot* (s. Abschnitt 3.2.10.8) im Vergleich zu unverdaulichem Protein kontrolliert werden.

3.2.10.4 TCA-Fällung

Um die Proteine von Zellkulturüberständen aufzukonzentrieren, wurde eine Trichloressigsäure (TCA)-Fällung durchgeführt. Dazu wurde 1 ml Zellkulturüberstand mit 1 ml 20 %-iger Trichloressigsäure versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4° C (14.000 rpm, 13.000 g) in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde mit eiskaltem Aceton überschichtet, erneut zentrifugiert, getrocknet und in 1x SDS-PAGE Probenauftragspuffer aufgenommen.

3.2.10.5 Koimmunopräzipitation

Um die direkte Interaktion von Proteinen zu untersuchen, wurde ein Protein mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers sowie Protein G-Sepharose immunopräzipitiert. Im *Western Blot* wurde anschließend überprüft, ob weitere Proteine detektiert werden konnten, d.h. mit dem ersten Protein interagiert haben.

Dazu wurden Zellen wie in Abschnitt 3.2.10.1 dargestellt in 500 µl EBC-Puffer (s. Anhang) resuspendiert und homogenisiert. Ein Teil des Lysates wurde mit fünffachem reduzierendem SDS-Probenauftragspuffer versetzt, 5 min bei 95° C inkubiert und direkt für einen *Western Blot* eingesetzt (s. Abschnitte 3.2.10.6.und 3.2.10.8).

Für die Immunopräzipitation wurde Protein-G-Sepharose (*Immobilized Protein G*, Pierce, Rockford, IL, USA) zweimal mit je 1000 µl EBC-Puffer versetzt, gemischt und für 2 min bei 5.000 rpm (2.000 g) in einer Eppendorf-Tischzentrifuge pelletiert. Die Protein-G-Sepharose wurde in EBC-Puffer aufgenommen und je 50 µl dieser 1 : 1-Mischung zu 450 µl Proteinlysate gegeben. Es wurden jeweils 2 µl des primären Antikörpers hinzugegeben und die Mischung über Nacht bei 4° C auf einem Rollkippschüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Protein-G-Sepharose, mitsamt der an ihr haftenden Proteine, dreimal wie oben beschrieben mit EBC-Puffer gewaschen.

Die gebundenen Proteine wurden durch Zugabe von 25 µl fünffachem reduzierendem SDS-Probenauftragspuffer und anschließendem Aufkochen für 10 min bei 55° C eluiert. Dieser Vorgang wurde zur vollständigen Elution mit 25 µl einfachem reduzierendem SDS-Probenauftragspuffer wiederholt. Die eluierten Proteine wurde wie in den Abschnitten 3.2.10.6 und 3.2.10.8 beschrieben im SDS-Gel aufgetrennt und im *Western Blot* detektiert.

3.2.10.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht mit einem von Laemmli eingeführten SDS-haltigen Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Auftrennung erfolgte für bis zu 14 Proben in einem vertikalen „Mini-Protean 3-Electrophoresis-System“ (BioRad, Hercules, CA, USA), bei 15 - 19 aufzutrennenden Proteinproben in dem größeren vertikalen „Twin Model L“ (45-2019i) vonpeqLab Biotechnology (Erlangen, D). Es wurden 1,5 mm dicke 7,0 %-, 10,0 %-, 12,5 %- oder 15,0 %-ige Trenngele und 4,5 %-ige Sammelgele verwendet, deren Zusammensetzung in Tab. 3.23 angegeben ist.

Tab. 3.23: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele

| | Trenngel | | | | Sammelgel |
|--|----------|--------|--------|--------|-----------|
| | 7,0 % | 10,0 % | 12,5 % | 15,0 % | 4,5 % |
| ddH ₂ O | 5,1 ml | 4,1 ml | 3,3 ml | 2,5 ml | 5,8 ml |
| Trenngelpuffer | 2,5 ml | 2,5 ml | 2,5 ml | 2,5 ml | - |
| Sammelgelpuffer | - | - | - | - | 2,5 ml |
| 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid/ddH ₂ O | 2,3 ml | 3,3 ml | 4,1 ml | 5,0 ml | 1,6 ml |
| Temed | 30 µl | 30 µl | 30 µl | 30 µl | 30 µl |
| APS (10 %) | 60 µl | 60 µl | 60 µl | 60 µl | 60 µl |

Zur Herstellung der Gele wurden die Glasplatten mit 70 %-igem technischem Ethanol gereinigt und in eine Gießvorrichtung geklemmt. Zum Auspolymerisieren des Acrylamids wurden 0,3 % N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (Temed) (Roth, Karlsruhe, D) und als Radikalstarter 0,06 % Ammoniumperoxodisulfat (APS, Roth, Karlsruhe, D) zum Trenngelansatz gegeben. Das noch flüssige Trenngel wurde zügig zwischen die aufgestellten Glasplatten bis ca. 1,5 cm unter den oberen Rand gegossen. Direkt im Anschluss wurde das Trenngel für einen geraden und glatten Rand mit Isopropanol überschichtet. Je nach Acrylamidkonzentration dauerte es 15 - 30 min zum Auspolymerisieren des Trenngels. Danach wurde das Isopropanol abgegossen, mit ddH₂O gespült und der Sammelgelansatz mit 0,06 % APS und 0,3 % Temed versetzt und das noch flüssige Sammelgel bis zum oberen Rand der Glasplatten aufgefüllt. Anschließend wurde zur Aussparung der Taschen zügig ein Kamm eingesteckt. Das Auspolymerisieren des Sammelgels dauerte etwa 30 min. Dann wurde der Kamm entfernt und die Taschen wurden mit Wasser ausgewaschen. Die Glasplatten mit dem erstarrten Gel wurden aus der Gießvorrichtung entfernt und in die Auftrennkammer gesetzt. Anschließend wurde die Kammer mit Elektrodenpuffer (s. Anhang) bis zur Bedeckung der Elektroden aufgefüllt und die vorbereiteten Proben wurden vorsichtig in die Taschen pipettiert. Um möglichst scharfe Banden zu erhalten, wurden die Gele, solange die Proteine sich im Sammelgel befanden, bei einer Spannung von 70 - 100 V gefahren (ca. 20 - 30 min). Danach wurde die Spannung auf 120 - 130 V erhöht und die Auftrennung der Proteine so lange fortgesetzt, bis die Bromphenolblaufront gerade noch im Trenngel zu sehen war. Als Standard wurde der Proteinmarker „*Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus*“ (Fermentas, St. Leon-Rot, D) verwendet. Die auf den Gelen aufgetrennten Proteine wurden entweder mit einer Coomassie-Färbelösung angefärbt (vergl. Abschnitt 3.2.10.7) oder für *Western Blots* auf eine PVDF-Membran zur weiteren Detektion übertragen (vergl. Abschnitt 3.2.10.8).

3.2.10.7 Coomassie-Färbung

Die SDS-Gele wurden ca. 2 Std in Coomassie-Färbelösung (s. Anhang) inkubiert und anschließend mehrmals mit Entfärbelösung (s. Anhang) gewaschen, bis sich die Banden deutlich vom Hintergrund abhoben.

3.2.10.8 Western Blot

Die Methode wurde modifiziert nach Towbin durchgeführt (Towbin et al., 1979).

Semi-Dry-Verfahren: Die mit SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden nach dem *Semi-Dry*-Verfahren auf eine proteinbindende Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Roti-PVDF, Roth, Karlsruhe, D) transferiert. Für die Übertragung wurde eine *Semi-Dry-Blotting*-Apparatur (Transblot SD, BioRad, München, D) benutzt. Die verwendeten Filterpapiere und die PVDF-Membran wurden auf die Größe des Polyacrylamidgels zurechtgeschnitten. Die Filterpapiere (*Gel-Blotting-Paper*, Schleicher und Schuell, Dassel, D) wurden in Transferpuffer (s. Anhang) getränkt und die PVDF-Membran zunächst mit Methanol für einige Minuten aktiviert bzw. „hydrophilisiert“. Danach wurde die Membran mit ddH₂O gewaschen und anschließend mit Transferpuffer äquilibriert. Das Polyacrylamidgel wurde ebenfalls für einige Minuten in Transferpuffer gelegt, bevor die einzelnen Schichten nach folgendem Schema (s. Abb. 3.7) auf der Anode der Blotting-Apparatur gestapelt wurden. Um einen gleichmäßigen Transfer zu ermöglichen, wurden nach dem Auflegen jeder neuen Schicht mögliche Luftblasen durch vorsichtiges Rollen eines 50 ml-Falconröhrchen entfernt. Anschließend wurde die Apparatur geschlossen, eine konstante Spannung von 20 V angelegt und der Transfer nach 70 min beendet.

Tank-Blot-Verfahren: Das *Tank-Blot*-Verfahren funktioniert nach dem gleichen Prinzip wie das *Semi-Dry*-Verfahren. Anstelle einer PVDF-Membran wurde eine Nitrocellulose-Membran (Whatman Protran Nitrocellulose Transfer Membran, Whatman GmbH, Dassel, D) verwendet und es wurde eine Tankblot-Kammer (Trans-Blot Cell bzw. Mini Trans-Blot Cell, BioRad, München, D) benutzt. Zwei der vier beim *Semi-Dry Blot* verwendeten Filterpapiere wurden durch Schwämme ersetzt. Die Schwämme, Filterpapiere, Membranen und Gele wurden 10 min in *Tank Blot*-Puffer (s. Anhang) äquilibriert, bevor die *Blot*-Apparatur entsprechend Abb. 3.7 zusammgebaut wurde. Mögliche Luftblasen wurden durch Rollen mit einem 50 ml-Falconröhrchen entfernt. Die *Blot*-Kammer wurde komplett mit *Tank-Blot*-Puffer gefüllt und ein Kühlelement (-20° C) in die Kammer eingeführt. Es wurde im Eisbad unter ständigen Rühren 2 Std bei 800 mA (*Trans-Blot Cell*) bzw. 600 mA (*Mini Trans-Blot Cell*) geblottet.

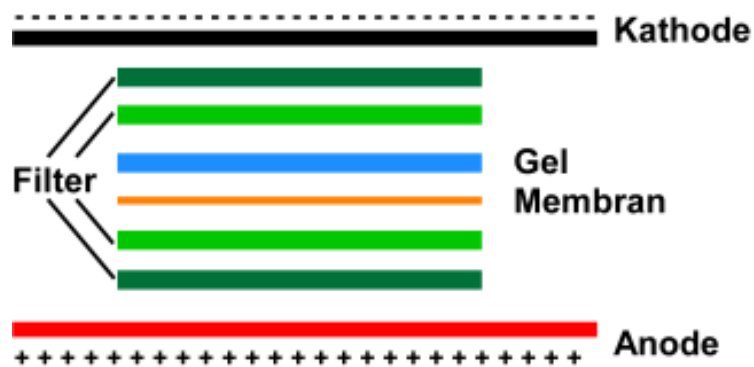


Abb. 3.7: Versuchsaufbau für einen Western Blot. Der genaue Aufbau ist im Text beschrieben. Die äußeren dunkelgrünen Filter wurden beim *Tank-Blot* durch Schwämme ersetzt.

Immunologische Detektion: Die Membran wurde mit der proteinbeschichteten Seite nach innen in 15 ml- bzw. 50 ml-Falconröhrchen oder in eine ca. 25 cm lange Glasflasche (Durchmesser 5 cm) gelegt. Zum Blockieren unspezifischer Bindungen wurden die Membranen bei Raumtemperatur für 1 Std in 5 - 25 ml TBST (0,1 % Tween-20 in TBS) mit 5 % Magermilchpulver (Roth, Karlsruhe, D) auf einem Rollkippschüttler inkubiert. Danach wurde die Membran kurz mit TBST gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in 1 % BSA/TBST (1 ml - 10 ml; Verdünnung siehe Tab. 3.7) über Nacht bei 4° C. Die Antikörperlösungen konnten mehrfach verwendet werden und wurden in der Zwischenzeit bei -20° C verwahrt. Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurde die Membran dreimal 5 min bei Raumtemperatur mit TBST gewaschen. Daraufhin erfolgte eine 60-minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper in 1 % BSA/TBST bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran viermal 15 min zur Entfernung nicht spezifischer Sekundärreagenzien mit TBST auf einem Rollkippschüttler gewaschen.

Durch eine Meerrettichperoxidase (HRP)-katalysierte Chemolumineszenzreaktion (*ECLadvanced Western Blotting Detection Systems*, Amersham, Little Chalfont, UK, Durchführung entsprechend den Angaben des Herstellers) konnten die markierten Proteine über eine Chemolumineszenzkamera (LAS-3000mini, Fujifilm, Tokyo, Japan) mit der ImageReader LAS-3000 Software visualisiert und die Membran fotografiert werden (Expositionszeit zwischen 10 sec und 20 min). Das Prinzip der Nachweisreaktion beruht auf der Oxidation des Substrates Luminol durch die Meerrettichperoxidase, bei der das Substrat in einen angeregten Zustand übergeht. Die Anregungsenergie wird in Form von Licht freigesetzt, das von der Kamera aufgenommen wird (vergl. Abb. 3.8).

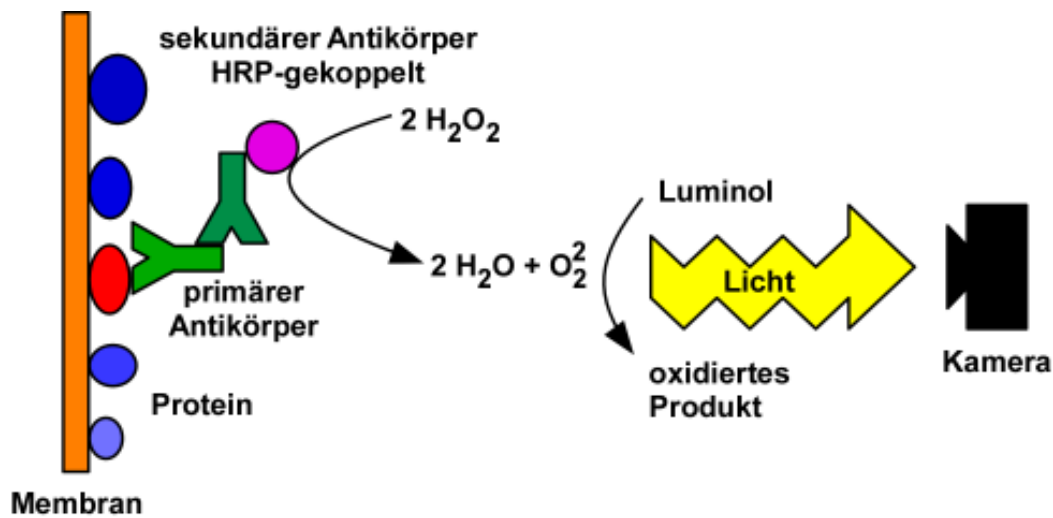


Abb. 3.8: Prinzip der *Western-Blot*-Entwicklung mithilfe des ECL-Systems. Das zu untersuchende Protein auf der PVDF- oder Nitrocellulose-Membran des *Western Blots* wird von einem spezifischen Antikörper erkannt. Dieser wird wiederum von dem an die Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten sekundären Antikörper gebunden. Die HRP setzt H_2O_2 zu Wasser um. Der dabei freiwerdende reaktive Sauerstoff wird auf Luminol übertragen, das oxidiert wird und in einen angeregten Zustand übergeht. Unter Abgabe von Licht, welches z.B. von einer Kamera detektiert werden kann, geht das angeregte Luminol in den Grundzustand über.

Western Blots wurden mit Hilfe der Software Multi Gauge V. 3.0 (Fujifilm, Tokyo, Japan) quantifiziert. Dazu wurden um die zu quantifizierenden Banden möglichst kleine, jeweils gleich große Rechtecke gelegt und deren Pixelgehalt bestimmt. Es wurde jeweils der Pixelgehalt eines am Rande des Blots befindlichen Rechtecks als Hintergrund subtrahiert.

3.2.10.9 Färben von *Western Blots*

Die transferierten Proteine wurden mit Ponceau-S-Lösung (0,1 % Ponceau S/5 % Essigsäure/dd H_2O , Sigma Aldrich, Steinheim, D) auf PVDF-Membranen angefärbt. Mit dieser Methode konnte zum einen die Übertragungseffizienz des *Western Blots* abgeschätzt werden. Zum anderen konnte kontrolliert werden, ob in allen Proben identische Proteinmengen enthalten waren, was einen quantitativen Vergleich der Expressionsstärke einzelner Proteine erst ermöglichte. Dabei wurden die Membranen für etwa 3 min unter Schütteln mit Ponceau-S-Lösung inkubiert und anschließend mit deionisiertem Wasser mehrfach entfärbt, bis sich die Banden deutlich vom Hintergrund abhoben. Die Ponceau-S-Lösung wurde mehrfach verwendet und unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gelagert.

Anstelle der Ponceau-S-Lösung konnte die Membran auch mit Coomassie-Färbelösung (s. Anhang) inkubiert werden, was eine sensitivere Detektion geringer Proteinmengen erlaubte. Die Membran wurde anschließend mehrmals mit Entfärbelösung (s. Anhang) gewaschen, bis sich die Banden deutlich vom Hintergrund abhoben.

3.2.10.10 Strippen von Western Blots

In einigen Fällen wurden *Western Blots* zur immunologischen Detektion verschiedener Proteine wiederverwendet. Bei diesem als *Strippen* bezeichneten Verfahren werden die gebundenen Antikörper mithilfe von thermischer Energie, Detergenzien und Reduktionsmitteln entfernt. Die ursprünglich auf die Membran transferierten Proteine bleiben weitgehend erhalten und können mit einem anderen Antikörperpaar detektiert werden.

Zu diesem Zweck wurde der *Western Blot* zweimal 10 min mit TBST gewaschen, um restliches ECL-Reagenz von der Detektion des ersten Proteins zu entfernen. Anschließend wurde die Membran 30 min mit *Stripping*-Puffer (s. Anhang) bei 70° C im Wärmeschrank inkubiert und mehrmals mit TBST bei Raumtemperatur gewaschen. Die anschließende immunologische Detektion erfolgte entsprechend Abschnitt 3.2.10.8.

3.2.11 Pulse-Chase-Experimente

Dialysiertes FCS (dFCS): Zum Dialysieren von hitzeinaktiviertem FCS wurde zunächst ein Dialyseschlauch (Dialysis Membrane Type 8, Ausschlussgröße: 12-16 kDa, Porengröße: 25 Å, Biomol, Hamburg, D) für einige Stunden bei 4° C in ddH₂O äquilibriert. Anschließend wurden 10 ml hitzeinaktiviertes FCS in den Schlauch überführt und mit 1 l autoklaviertem PBS bei 4° C über Nacht unter Rühren dialysiert. Am folgenden Tag wurde das dialysierte FCS sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße) und als 0,5 ml-Aliquots bei -20° C gelagert.

Pulse und Chase: HeLa-Zellen wurden in 6-well-Platten ausgesät und bis zum Erreichen einer 80 %-igen Konfluenz wachsen gelassen. Die Zellen wurden wie in Abschnitt 3.2.9.2 beschrieben entweder mit LIMP-2-siRNA oder mit unspezifischer Kontroll-siRNA transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und eine Stunde in DMEM ohne Methionin und Cystein (Gibco/Invitrogen, Paisley, UK) mit 2 % dialysiertem FCS hungern gelassen. Anschließend wurden die Zellen für 2 Std mit 125 µCi/well ³⁵S-Methionin/Cystein ([³⁵S]Met-label, Hartman Analytic GmbH, Braunschweig, D) in „Hungermedium“ behandelt (*Pulse*). Die Zellen wurden dann für verschiedene Zeiträume in DMEM mit Methionin, Cystein

und 2 % FCS inkubiert und danach wie in Abschnitt 3.2.10.1 dargestellt geerntet, wobei das Zellkulturmedium aufgehoben wurde.

Immunpräzipitation: Die Zellpellets wurden wie in Abschnitt 3.2.10.1 beschrieben in 250 µl Immunpräzipitations (IP)-Puffer (s. Anhang) resuspendiert. Zur Eliminierung unspezifisch an die Sepharose bindender Proteine, wurden die Zellysate oder 1 ml Zellkulturmedium mit 10 µl Protein-A-Sepharose (*Immobilized Protein A*, Pierce, Rockford, IL, USA) versetzt und 1 Std bei 4° C auf einem Rollkippschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Proben 2 min bei 5.000 rpm (2.000 g) in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert und danach der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Parallel dazu wurde Protein-A-Sepharose 30 min bei Raumtemperatur mit Zellysat nicht radioaktiv-markierter Zellen inkubiert, um ebenfalls unspezifische Bindungen zu reduzieren. Diese Sepharose wurde zweimal mit PBS gewaschen und jeweils 10 µl mit dem oben beschriebenen Überstand versetzt. Sodann wurden 5 µl Antikörper (s. Tab. 3.7) hinzugegeben und die Proben über Nacht bei 4° C auf einem Rollkippschüttler inkubiert. Es schlossen sich jeweils zwei kurze Waschschrte mit IP-Puffer sowie mit PBS an, gefolgt von einem Waschschrte mit ddH₂O.

Die Protein-A-Sepharose wurde entweder zweimal direkt mit 25 µl einfachem SDS-Probenpuffer 5 min bei 95° C inkubiert oder zweimal mit 50 µl Endo-H-Puffer versetzt und ebenfalls erhitzt. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Überstände direkt auf ein SDS-Gel aufgetragen oder wie in Abschnitt 3.2.10.3 beschrieben einem Endo-H-Verdau unterzogen.

Die Proben wurden im SDS-Gel aufgetrennt, das anschließend drei Tage lang auf eine *Imaging-Platte* (Fuji BAS-MP 2025P, Fujifilm, Tokyo, Japan) gelegt wurde, die wiederum mit dem Fuji FLA-5000 Phosphoimager (Fujifilm, Tokyo, Japan) entwickelt wurde.

3.2.12 Quervernetzung (*Crosslink*) von Proteinen in lebenden Zellen

Zur Quervernetzung der Proteine wurden membrangängige DSS (Disuccinimidylsuberat, Pierce, Rockford, IL, USA, s. Abb. 3.9) genutzt. Dabei handelt es sich um einen homobifunktionalen *Crosslinker*, der präferentiell mit primären Aminogruppen reagiert. Dabei können Proteine miteinander verbunden werden, die sich in räumlicher Nähe zu einander befinden. Der Abstand der von DSS überbrückt werden kann beträgt 11,4 Å.

Das DSS wurde vor Feuchtigkeit geschützt, bei 4° C gelagert und kurz vor seiner Verwendung in einer Konzentration von 54 mM in DMSO gelöst. Die Zellen wurden in 6 cm-Schalen bis zu einer Dichte von 100 % kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen auf Eis dreimal

mit kaltem EBSS/HEPES (s. Anhang) gewaschen. Die Quervernetzung der Proteine fand mit 0.54 mM DSS in EBSS/HEPES für 30 min bei 37° C im Brutschrank statt. Nach dieser Reaktion wurden die Zellen auf Eis gestellt, das Medium mit dem Reagenz abgesaugt und die Zellen mit neuem, kaltem EBSS/HEPES versorgt, das 20 mM Ethanolamin zum Stoppen der Quervernetzungsreaktion enthielt. Die Stoppreaktion wurde für 15 min auf Eis durchgeführt und die Zellen danach dreimal mit EBSS/HEPES gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Medium nicht abgesaugt, sondern die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgeschabt, in Eppendorfgefäße überführt und 10 min bei 4° C und 14.000 rpm (13.000 g) in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert.

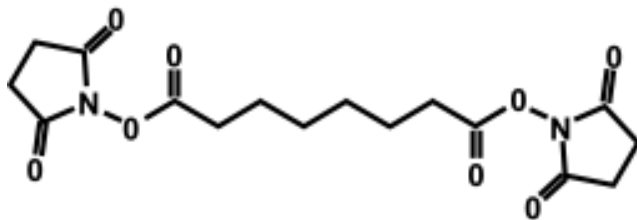


Abb. 3.9: Chemische Struktur von DSS.

DSS hat ein Molekulargewicht von 368.35 Da. Die Größe des Abstandshalters (*spacerarm*) entspricht 1.14 nm.

Das Pellet wurde in 500 µl EBC-Puffer (s. Anhang) resuspendiert und wie in Abschnitt 3.2.10.1 beschrieben homogenisiert. Ein Teil des Lysates wurde mit fünffachem reduzierendem SDS-Probenauftragspuffer versetzt, 5 min bei 95° C inkubiert und direkt für einen *Western Blot* eingesetzt (s. Abschnitte 3.2.10.6 und 3.2.10.8). Aus dem Rest des Lysates wurden mithilfe des *ProFound c-Myc Tag IP/Co-IP-Kits* (Pierce, Rockford, IL, USA) entsprechend der Angaben des Herstellers *myc-getaggte* Proteine immunopräzipitiert, die ebenfalls mittels *Western-Blot*-Analyse detektiert wurden.

3.2.13 Enzymmessungen

Zellpellets oder Gewebestücke wurden wie in Abschnitt 3.2.10.1 beschrieben in PBS/ 0,5 % Triton X-100/Proteaseinhibitor (Lysispuffer) resuspendiert. Der Proteingehalt der Lysate wurde wie in Abschnitt 3.2.10.2 dargestellt ermittelt und anschließend eine Proteinkonzentration von 1 µg/µl eingestellt. Alle Messungen wurden als Doppel- oder Vierfachwerte durchgeführt. Als Negativkontrollen wurden jeweils Ansätze mitgeführt, bei denen nur Citratpuffer anstelle des Substrates und/oder nur Lysispuffer anstelle des Zellextraktes eingesetzt wurden. Alle Messungen wurden in einer 96-*well*-Platte durchgeführt. Das Endvolumen betrug jeweils 361 µl, was einer Schichtdicke von 1 cm entsprach. Die Enzymaktivität entsprach der Menge des

freigesetzten p-Nitrophenols (Extinktionskoeffizient_{405nm}: 18,5) bzw. p-Nitrocatechols (Extinktionskoeffizient_{515nm}: 12,4) und konnte anhand folgender Formel, die sich aus dem Lambert-Beersche Gesetz ableitet, berechnet werden:

$$\text{Aktivität [mU/ml]} : \frac{\text{dE} \times \text{Gesamtvolumen} \times 1000}{\text{Extinktionskoeffizient} \times \text{Probenvolumen} \times \text{Inkubationszeit}}$$

3.2.13.1 β -Glukocerebrosidase

Je 10 μ l Proteinextrakt (1 μ g/ μ l) wurden mit 40 μ l Citratpuffer (0,2 M Natriumcitrat, 0,04 % NaN_3 , 0,2 % BSA, pH 4,6) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 50 μ l Substratlösung (10 mM p-Nitrophenyl- β -D-glukopyranosid in Citratpuffer) hinzugegeben und die Proben für weitere 60 min bei 37 ° C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 261 μ l Stopplösung (0,4 M Glycin/NaOH, pH 10,4) abgestoppt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

3.2.13.2 β -Hexosaminidase

Je 10 μ l Proteinextrakt (1 μ g/ μ l) wurden mit 100 μ l Substratlösung (10 mM p-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosid in Citratpuffer) versetzt und 15 min bei 37° C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 251 μ l Stopplösung abgestoppt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

3.2.13.3 β -Mannosidase

Je 20 μ l Proteinextrakt (1 μ g/ μ l) wurden mit 100 μ l Substratlösung (10 mM p-Nitrophenyl- β -D-mannopyranosid in Citratpuffer) versetzt und 120 min bei 37° C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 241 μ l Stopplösung abgestoppt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

3.2.13.4 Arylsulfatase A

Je 20 μ l Proteinextrakt (1 μ g/ μ l) wurden mit 100 μ l Substratlösung (10 mM p-Nitrocatecholsulfat in Citratpuffer) versetzt und 120 min bei 37° C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 241 μ l Stopplösung abgestoppt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 515 nm gemessen.

3.2.14 Mikroskopische Methoden

3.2.14.1 Axiovert 200M

Für die Betrachtung aller fluoreszenzgefärbten Zellen wurde ein Axiovert 200M (Carl Zeiss, Jena, D) verwendet, das mit der Axio Vision 4.1 beta Version 08.2003 Software bedient wurde. Die Bilder wurden mit dem Axio Vision Viewer LE Rel. 4.1 und mit der Adobe Photoshop Version 7.0 Software bearbeitet.

Die Betrachtung der verschiedenen Färbungen erfolgte mit folgenden Filtern:

- DAPI-Fluoreszenz: G365 und BP445/59
- Alexa-Fluor 488- und eGFP-Fluoreszenz: BP485/20 und BP515-565
- Alexa Fluor 594-Fluoreszenz: BP565/30 und BP620/60

Alle Immunfluoreszenzpräparate wurden bei 4° C im Dunkeln gelagert.

Mit Hilfe eines Apotoms, das die Erstellung „optischer Schnitte“ durch Fluoreszenzpräparate erlaubt, konnten Koloalierungsstudien durchgeführt werden. Bei dieser Technologie wird das Prinzip der ‚Streifenprojektion‘ umgesetzt, indem eine Gitterstruktur mit definierter Gitterstreifenbreite mithilfe eines Apotomschiebers in die Ebene der Leuchtfeldblende des Auflichtstrahlengangs des Mikroskops eingebracht wird. Die Ebene der Leuchtfeldblende ist konjugiert zu der Fokusebene, sodass bei dem Blick durch die Okulare das Gitter überlagert mit der Probe gesehen werden kann. Über einen *Scanning*-Mechanismus im Apotomschieber wird die Gitterstruktur in der Präparatebene in drei definierten Schritten verschoben, wobei an jeder Gitterposition ein digitales Bild aufgenommen wird. Die drei Rohbilder werden von dem Computer zu einem Ergebnisbild verrechnet. Das berechnete Bild stellt einen optischen Schnitt durch die Probe dar.

3.2.14.2 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

Mithilfe der indirekten Immunfluoreszenz können Proteine in der Zelle lokalisiert werden. Die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie unterscheidet sich von der direkten Immunfluoreszenzmikroskopie durch die Verwendung eines zielproteinspezifischen Primärantikörpers und eines Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpers (vergl. Abb. 3.10). Bei der direkten Immunfluoreszenz wird dagegen ein Primärantikörper verwendet, der direkt mit einem Fluorophor gekoppelt ist. Direkte Immunfluoreszenz ist folglich in weniger Schritten durchzuführen. Die indirekte Immunfluoreszenz besitzt dagegen den Vorteil einer höheren Sensitivität, da die Bindung mehrerer Sekundärantikörper an einen Primärantikörper zu einer Verstärkung des Signals führt. Außerdem können verschiedene Primärantikörper von einem Sekundärantikörper erkannt werden, wodurch auch nicht-Fluorophor-gekoppelte Antikörper als Primärantikörper eingesetzt werden können. Bei der direkten Fluoreszenzmikroskopie wird schließlich die Eigenfluoreszenz von endogenen bzw. von in die Zelle eingebrachten Stoffen untersucht. Hierzu zählen u. a. das *Green Fluorescent Protein* (GFP) der Tiefseequalle *Aequorea victoria* oder das zur DNA-Färbung eingesetzte 4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI).

Alle beschriebenen Schritte der indirekten Immunfluoreszenz erfolgten bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden auf runden Deckgläschen (13 mm Durchmesser) ausgesät und bis zur Subkonfluenz 1 - 3 Tage kultiviert.

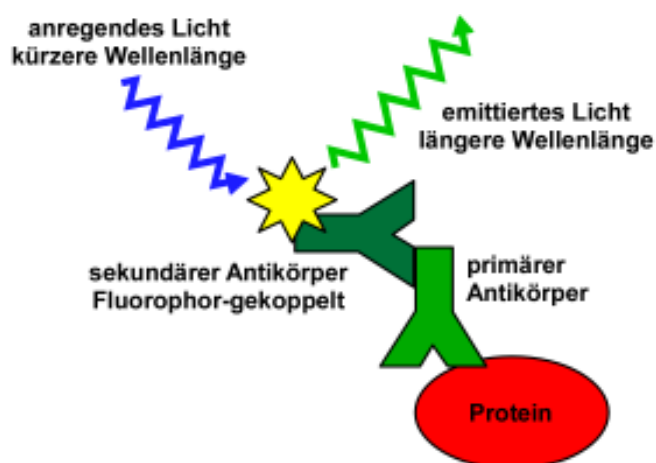


Abb. 3.10: Prinzip der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie. Das zu untersuchende Protein wird in der Zelle von einem spezifischen Antikörper erkannt. Dieser wird wiederum von dem Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörper erkannt. Das Fluorophor wird mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (durch einen Filter erzeugt) angeregt und gibt daraufhin Licht mit einer geringeren Frequenz als das anregende Licht ab. Dieses wird, nach Passieren eines weiteren Filters, beobachtet oder mit einer Kamera aufgenommen.

Fixierung: Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen 20 min mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert, wobei die freien Aldehydgruppen des PFAs freie Aminogruppen banden. Im Anschluss wurden die Deckgläschen dreimal mit PBS gewaschen.

Permeabilisierung: Die fixierten Zellen wurden 5 min mit 0,2 % Saponin in PBS permeabilisiert, um die Plasmamembran für die Antikörper durchlässig zu machen. Saponin führt zu einer reversiblen Permeabilisierung. Deswegen wurde allen im weiteren Verlauf verwendeten Lösungen 0,2 % Saponin zugesetzt.

Blockieren: Zum Absättigen freier Aldehydgruppen wurden die Zellen 10 min mit Glycinlösung (0,12 % Glycin in PBS + 0,2 % Saponin) inkubiert. Es schloss sich ein 15-minütiger Blockierungsschritt mit Rinderserumalbumin (BSA)-Lösung (3 % BSA in PBS + 0,2 % Saponin) an, um unspezifische Proteinbindungen zu sättigen. Dabei wurden 50 µl BSA-Lösung pro Deckgläschen auf eine saubere Untergrundfläche pipettiert und die Deckgläschen mit den Zellen zu der Lösung gewandt vorsichtig mit einer Pinzette auf die Tröpfchen gelegt.

Immunologische Färbung: Sowohl Primär- als auch Sekundärantikörper wurden nach Tab. 3.7 bzw. 3.8 mit 3 %-iger BSA-Blockierlösung verdünnt. Die Inkubationszeit betrug für beide Antikörper jeweils 1 Std und erfolgte mit 30 µl Antikörperlösung nach der oben beschriebenen „Tröpfchen-Methode“. Die Inkubation mit dem lichtempfindlichen Sekundärantikörper erfolgte stets im Dunkeln. Die Deckgläschen wurden durch Abdecken vor Austrocknung geschützt. Zusätzlich sorgte ein beigelegtes angefeuchtetes Stück Zellstoffpapier für den Erhalt der Feuchtigkeit. Zwischen den Inkubationsschritten mit dem Erst- bzw. Zweitantikörper wurde viermal mit PBS gewaschen; nach Inkubation mit dem Zweitantikörper wurden fünf Waschgänge mit PBS und zwei Waschgänge mit ddH₂O durchgeführt. Anschließend wurden die Deckgläschen kurz auf Zellstoffpapier abgetropft und mit Mowiol, welches das Antibleichmittel DABCO enthält (s. Anhang), auf Objektträgern eingebettet. Für eine zusätzliche Kernfärbung erfolgte die Einbettung mit Mowiol, DABCO und 1 µg/ml DAPI .

3.2.14.3 *Lysotracker-Red-Färbung*

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 3.2.14.2 beschrieben auf Deckgläschen ausgesät. Nachdem die Zellen die gewünschte Konfluenz erreicht hatten, wurde das normale Zellkulturmedium gegen ein FCS- und Penicillin/Streptomycin-freies Medium ausgetauscht, das „Lysotracker® Red DND-99“ (Invitrogen, Paisley, UK) in einer Verdünnung von 1 : 3.000 enthielt. Die Zellen

wurden im Dunkeln 10 min bei Zimmertemperatur inkubiert und anschließend fünfmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.2.14.2 beschrieben in 4 % PFA/PBS fixiert und immunozytochemisch gefärbt.

3.2.14.4 Immunohistochemie

Zur immunohistologischen Untersuchung ganzer Organe wurden Mäuse wie in Abschnitt 3.2.16 beschrieben mit 4 %-iger Paraformaldehydlösung in PBS perfundiert und einzelne Organe entnommen. Die Organe wurden ca. 2 Std in 4 %-iger Paraformaldehydlösung nachfixiert, bevor sie über Nacht in 30 % Sukrose/0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4 inkubiert wurden.

Mit einem Cryo-Mikrotom (Leica SM2000R, Leica, Wetzlar, D) wurden 50 µm dicke Schnitte hergestellt, die im sogenannten „Free-floating Slide“-Verfahren gefärbt wurden. Dies geschah in einer 24-well-Patte mit einem Flüssigkeitsvolumen von 100 - 250 µl/well. Zunächst wurden die Schnitte in Blockierlösung (0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4/ 0,5 % Triton X-100/ 0,2 % BSA/ 4 % Ziegen Serum) überführt und vorsichtig 2 Std bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Blockierlösung wurde anschließend gegen die ersten Antikörper, die in Blockierlösung verdünnt waren, ausgetauscht. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4° C unter vorsichtigem Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurde dreimal 10 min mit Waschpuffer (0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4/ 0,25 % Triton X-100) gewaschen, bevor die zweiten Antikörper, 1 : 1.000 in Waschpuffer verdünnt, auf die Schnitte gegeben wurden. Es erfolgte eine weitere Inkubation für 2 Std bei Raumtemperatur, die, wie auch alle weiteren Schritte, aufgrund der Lichtempfindlichkeit der sekundären Antikörper im Dunkeln durchgeführt wurde. Sodann wurden die Schnitte noch dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Dem zweiten Waschschrift wurde zur Anfärbung der Zellkerne DAPI (s. Abschnitt 3.2.14.2) in einer Konzentration von 1 : 1.000 hinzugefügt. Abschließend wurden die einzelnen Schnitte vorsichtig mit einem Pinsel auf einen mit ddH₂O angefeuchteten Objektträger überführt und mit einem Gemisch aus Mowiol und DABCO (s. Abschnitt 3.2.14.2) eingebettet.

3.2.15 Fluorescence Activated Cell Scanning (FACS)

Die Durchflusszytometrie, auch *Fluorescence Activated Cell Scanning* (FACS) genannt, ist eine Methode, bei der verschiedene Zellpopulationen mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper, die gegen spezifische Zelloberflächenepitope gerichtet sind, identifiziert werden können. Die Zellen werden dabei durch ein Kapillarsystem gesogen, indem ein Laser die fluoreszenzmarkierten

Antikörper anregt und die emittierte Fluoreszenz von einem Detektor gemessen wird. Die Methode ist besonders gut zur Analyse der nicht-adhärenenten Zellen des Immunsystems geeignet.

Zur Analyse der Zellen aus den primären und sekundären Organen des Immunsystems wurden die Mäuse durch CO₂ getötet. Den Mäusen wurden 10 ml 0,9 %-ige NaCl-Lösung in das Peritoneum gespritzt und anschließend wurde der Bauch einige Minuten lang massiert. Nachdem das Peritoneum chirurgisch freigelegt worden war, wurde die 0,9 %-ige NaCl-Lösung wieder aus der Peritonealhöhle entnommen und auf Eis aufbewahrt. Sodann wurden der Maus die inguinalen, die mesenterischen, die axillaren, die brachialen sowie die superficialen cervicalen Lymphknoten entnommen. Des Weiteren wurden der Thymus, die Milz sowie die Oberschenkel- und Schienbeinknochen (*Femur* und *Tibia*) entfernt.

Die Peritoneallavage wurde 10 min bei ca. 200 g (1.200 rpm, Rotina 46R, Hettich, Tuttlingen, D) zentrifugiert, einmal mit FACS-Puffer (2 % *Newborn Calf Serum* (NCS)/ 0,1 % NaN₃/ 0,2 mM EDTA/ PBS) gewaschen und auf Eis gelagert.

Femur und *Tibia* wurden mit autoklaviertem Verbandmaterial von Muskel- und Sehnenresten befreit und an jeweils beiden Enden geöffnet. Mit einer 27g-Kanüle und PBS wurden die Markzellen aus den Knochen gespült und mit einer 1000 µl-Pipettenspitze vereinzelt. Die Zellen wurden 10 min bei ca. 200 g pelletiert und 15 min mit 1 ml Erythrozyten-Lysispuffer (s. Anhang) behandelt. Anschließend wurde einmal mit FACS-Puffer gewaschen und die Zellen auf Eis gelagert.

Milz, Lymphknoten und Thymus wurden mit PBS und dem Stempel einer 10ml-Spritze durch ein feines Drahtnetz gerieben, bis nur noch weißes Bindegewebe und Fett zurückblieben. Die Zellen der Milz wurden wie oben beschrieben mit 2 ml Erythrozyten-Lysispuffer behandelt. Anschließend wurden alle Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen.

Alle Zellen wurden wie in Abschnitt 3.2.7 beschrieben mit 0,4 %-iger Trypanblau-Lösung versetzt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Jeweils 5×10^5 Zellen wurden in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen und mit 10 µl optimal vorverdünnten, Fluorochrom-konjugierten Primäantikörpern versetzt (s. Tab. 3.7). Die Ansätze wurden 20 min bei 4° C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde zu den Zellen 1 ml FACS-Puffer mit 1 µg/ml Propidiumjodid zugegeben, die Proben 10 min bei ca. 200 g zentrifugiert und in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Färbung der Zellen mit Propidiumjodid erlaubte tote Zellen aus den Analysen auszuschließen. Bei der Färbung mit biotinylierten primären Antikörpern folgte nach dem ersten Waschschrift eine Inkubation mit Fluorochrom-markiertem Streptavidin.

Im Durchflusszytometer (FACScan oder FACScalibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) wurden pro Ansatz 10.000 lebende Propidiumjodid-negative Zellen gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der Software CellQuest (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

3.2.16 Histologische Untersuchungen

Die histologischen Untersuchungen wurden in Kooperation mit Renate Lüllmann-Rauch (Anatomisches Institut, Universität Kiel, D) durchgeführt. Dazu wurden Mäuse mit 20 µl 2,5 %-iger Tribromethanol-Lösung (Sigma Aldrich, Steinheim, D) pro Gramm Körpergewicht anästhesiert. Anschließend wurde die Bauchhöhle geöffnet, um eine Quetschung der inneren Organe während der Perfusion zu vermeiden. Sodann wurde das Herz chirurgisch freigelegt und mit einem Schnitt der rechte Vorhof geöffnet. Über eine 20 g-Kanüle wurden mit einer Flussrate von 20 - 24 ml/min zunächst 20 ml 1 % Procain/PBS und danach zur Fixierung von Proteinstrukturen ca. 60 ml 6 % Glutaraldehyd/PBS in die linke Herzkammer gepumpt (Perfusionspumpe Ecoline VC-280, Ismatec, Wertheim-Mondfeld, D). Die Mäuse wurden in 3 % Glutaraldehyd/PBS bei 4° C aufbewahrt.

Den fixierten Mäusen wurden folgende Organe bzw. Stücke davon entnommen: Leber, Niere, Pankreas, Milz, Magen, Harnblase, Herz, Lunge, Rückenmark, Großhirn (*Cerebrum*), Kleinhirn (*Cerebellum*), Haut sowie ein Auge. Das Auge wurde als Ganzes weiterbehandelt, während die größeren Organe in ca. 2 - 3 mm dicke Scheiben geschnitten wurden. Alle Proben wurden dreimal mit 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4 gespült. Anschließend wurden die Präparate zur Fixierung von Lipidstrukturen 2 Std in ungepufferter 2 %-iger Osmiumtetroxidlösung inkubiert, bevor sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert wurden: zweimal 5 min 50 % Ethanol, zweimal 5 min 70 % Ethanol, zweimal 5 min 90 % Ethanol, zweimal 10 min 100 % Ethanol, zweimal 10 min 100 % Propylenoxid (1, 2-Epoxypropan). Die Organe wurden in eine Mischung aus 23,5 % Araldit M, 23,5 % Duodecenylnbernsteinsäureanhydrid, 3 % Araldit-M-Beschleuniger 960 und 50 % Propylenoxid überführt und über Nacht ruhen lassen. Am nächsten Morgen wurden die Präparate in eine Mischung aus 49 % Araldit, 49 % Duodecenylnbernsteinsäureanhydrid und 2 % Beschleuniger gelegt, bevor die Organe 4 Std später endgültig in dieser Mischung ausgegossen wurden. Nachdem das Araldit 48 Std bei 65° C ausgehärtet war, wurden die einzelnen Proben mit einer Laubsäge grob zurechtgeschnitten und mit Zwei-Komponentenkleber (Technovit 4071, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim im Taunus, D) auf Araldit-gefüllte Kapseln geklebt.

Zur Übersichtsdarstellung wurden die Organe mit einem Glasmesser und dem Leica EM UC6-Microtom (Leica, Wetzlar, D) in 1 µm dicke Scheiben geschnitten und auf einen Objektträger überführt, auf dem ein Tropfen 70 %-iger Ethanol mit einem Tropfen Wasser vermischt worden war. Die Organe wurden über Nacht auf einem Strecktisch bei 70° C getrocknet, bevor sie mit einer Toluidinblau/Pyronin-Färbelösung (s. Anhang) beträufelt wurden. Anschließend wurden die Objektträger dreimal mit Wasser und zweimal mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Auf die Präparate wurde abschließend ein Tropfen DePeX (Serva, Heidelberg, D) und ein Deckgläschen gegeben. Die Auswertung erfolgte mit einem Mikroskop (Modell Axiophot) der Firma Carl Zeiss (Jena, D).

Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden von den oben beschriebenen Präparaten 700 nm-ultradünne Schnitte mit Hilfe eines Diamantmessers und des Leica EM UC6-Microtoms (Leica, Wetzlar, D) hergestellt, die auf einem beschichteten Kupfernetz mit Stegen (Stork Veco, Eerbeek, NL) aufgefangen wurden. Die Schnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert. Dazu wurden die Kupfernetze 15 min in gesättigter Uranylacetat/ 70 % Methanol-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Präparate in vier Schritten mit 70 %-igem, 50 %-igem und 35 %-igem Methanol sowie in destilliertem Wasser gespült. Zur Kontrastierung mit Bleicitrat wurde eine Petrischale mit Wachs ausgegossen und zu einem Drittel mit Natriumhydroxid-Plätzchen befüllt. Auf den Wachs wurden mit einer Glaspipette kleine Tropfen einer Bleicitratlösung (s. Anhang) gesetzt, in denen die Kupfernetze mit der Präparatseite nach unten für 7 min inkubiert wurden. Die Netze wurden abschließend in vier Schritten mit destilliertem Wasser gewaschen, getrocknet und im Zeiss-EM 900-Mikroskop (Carl Zeiss, Jena, D) betrachtet.

3.2.17 Metabolische Käfige

Zur Überprüfung des Stoffwechselstatus wurden LIMP-1-defiziente Mäuse sowie in Geschlecht und Alter entsprechende Kontrolltiere in speziell für Mäuse geeigneten metabolischen Käfigen (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) untersucht. Den Mäusen wurde ein genau abgewogener Überschuss an Futter (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, D) und Wasser zur Verfügung gestellt. Die Mäuse wurden jeweils gegen 10.00 Uhr in den metabolischen Käfig gesetzt und am folgenden Tag gegen 9.00 Uhr wieder aus dem Käfig genommen. Der ausgeschiedene Kot und Urin sowie die verbliebenen Futter- und Wasserreste wurden gewogen.

Die Tiere wurden mit 2,5 % Isofluran in 500-1000 ml/min Luft (1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyl-difluoromethylether, Forene®, Abbott GmbH, Wiesbaden, D) mithilfe eines „Dräger Vapor® 19.n Narkosemittel-Verdunsters“ (Dräger AG, Lübeck, D) betäubt und die Aorta im Bauchraum chirurgisch freigelegt. Mit einer heparinisierten Spritze wurden die Mäuse über die Aorta ausgeblutet.

Der pH-Wert sowie der Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck (pO_2 , pCO_2) von Blut und Urin wurden mit dem Blutgasvollautomaten ECOSYS II der Firma Eschweiler (Kiel, D) bestimmt. Außerdem wurde der Hämatokritwert in Mikro-Hämatokrit-Kapillaren (Natriumheparin, Brand, Wertheim, D) durch Zentrifugation in einer Hettich-EBA21-Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen, D, 2 min, 1.200 rpm) ermittelt. Das restliche Vollblut wurde 4 min bei 10.000 rpm zentrifugiert (Biofuge vito, Heraeus, Hanau, D), wodurch die zellulären Blutbestandteile vom Plasma getrennt wurden. Das Plasma wurde in ein neues Eppendorfgesäß überführt. Die Osmolalität von Urin und Plasma wurden mit einem Fiske-Micro-Osmometer (Model 210, Fiske Associates, Norwood, MA, USA) bestimmt. Der Gehalt an Natrium (Na^+), Kalium (K^+), Chlorid (Cl^-), Calcium (Ca^{2+}), Harnstoff, Creatinin und Glukose von Urin und Plasma wurde im Zentrallabor des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (Campus Kiel, Kiel, D) mit einem *Roche Modular P Analyzer* (Roche Diagnostics, Mannheim, D) gemessen.

Zur Bestimmung des Trockengewichtes des Kotes wurde eine definierte Menge bei 37° C getrocknet und täglich gewogen, bis ein konstanter Wert erreicht wurde.

3.2.18 Thrombozyten-Analyse

3.2.18.1 Thrombozyten-Präparation

Zur Gewinnung von Thrombozyten wurden die Mäuse mit Äther betäubt und ihnen ca. 700 µl Blut aus dem retroorbitalen Plexus abgenommen. Das Blut wurde in Eppendorfgesäßen aufgefangen, in die 300 µl ACD-Puffer (s. Anhang) oder 300 µl 20 U/ml Heparin in TBS, pH 7,3 vorgelegt waren. Zur Gewinnung des Plättchen-reichen Plasmas (PRP) wurde das Blut bei Raumtemperatur 5 min bei 2.000 rpm (300 g) in einer Standard-Tischzentrifuge (5415C, Eppendorf, Hamburg, D) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und erneut 6 min bei 800 rpm (50 g) zentrifugiert, um verbliebene Erythrozyten zu entfernen. Der Überstand stellte das PRP dar. Plättchen-armes Plasma (*Platelet-Poor Plasma*, PPP) wurde hergestellt, indem man durch Zentrifugation von PRP für 5 min bei 2.800 rpm (600 g) und Raumtemperatur sämtliche Thrombozyten pelletierte. Der Überstand stellte das PPP dar.

3.2.18.2 Fluorescence Activated Cell Scanning (FACS)

Zur FACS-Analyse wurden 90 µl heparinisiertes Vollblut, das 1 : 30 mit Tyrode's-Puffer (s. Anhang) verdünnt worden war, mit jeweils 10 µl der direkt PE- oder FITC-markierten Hybridomaüberstände gefärbt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 500 µl PBS zugegeben und die Proben direkt im FACS-Gerät FACScalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) gemessen.

Zur Analyse aktivierter Thrombozyten musste zunächst das Heparin aus den Proben entfernt werden. Dazu wurde das heparinisierte Vollblut bei Raumtemperatur 5 min bei 2800 rpm (600 g) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 1 ml Tyrode's-Puffer gewaschen und in 500 µl Tyrode's-Puffer aufgenommen. 90 µl des entheparinisierten Vollbluts wurden mit den angegebenen Konzentrationen Adenosindiphosphat (ADP), U46619 (U46, 1 µM), *Collagen-related Peptide* (CRP) oder Thrombin für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, wie oben beschrieben gefärbt und mittels FACS analysiert.

3.2.18.3 Messung der Blutungszeit aus der Schwanzspitze

Die Mäuse wurden mit 20 µl 2,5 %-iger Tribromethanol-Lösung (Sigma Aldrich, Steinheim, D) pro Gramm Körpergewicht anästhesiert. 3 mm der Schwanzspitze wurden mit einem Skalpell abgeschnitten. Der Blutaustritt wurde beobachtet, indem mit einem Stück Filterpapier (Gel-Blotting Paper, Schleicher und Schuell, Dassel, D) in 15 sec-Intervallen austretende Blutstropfen vorsichtig abgenommen wurden, ohne dabei direkt die Wunde zu berühren. Die Blutung wurde für gestoppt gehalten, sobald kein Blut mehr auf dem Filterpapier sichtbar war. Die Blutung wurden manuell gestoppt, wenn sie länger als 20 min andauerte.

3.2.18.4 Thrombusbildung unter arteriellen Scherbedingungen

Die Adhäsion der Thrombozyten wurde in einer von Briedé et al., 2001, beschriebenen Flusskammer durchgeführt. Dazu wurden rechteckige Deckgläschen (24 x 60 mm) über Nacht bei 37° C mit 200 µl fibrillärem Kollagen (200 µg/ml, Kollagenreagenz Horm, Nycomed, Linz, Österreich) beschichtet. Am folgenden Tag wurden die Deckgläschen 1 Std bei Raumtemperatur mit 1 %-iger, wässriger BSA-Lösung blockiert.

Je 500 µl heparinisiertes Mausblut (15 U/ml) wurden mit 250 µl Tyrode's-Puffer versetzt.

Der Kollagen-beschichtete Objektträger wurde in die transparente Flusskammer eingesetzt, so dass ein Spalt mit einer Höhe von 50 μm entstand. Die Kammer wurde mit Tyrode's-Puffer gespült, dem 2 mM CaCl_2 und 1 U/ml Heparin zugesetzt waren. An die Kammer wurde die mit heparinisiertem Mausblut gefüllte Spritze angeschlossen. Die Perfusion wurde bei Raumtemperatur mit einer pulsfreien Pumpe durchgeführt, deren Flussrate unter geringen Scherstress-Bedingungen 1,12 ml/Std betrug, was einer Wandscherrate von 150 sec^{-1} entsprach. Bei starken Scherstress-Bedingungen betrug die Flussrate 7,53 ml/Std, was einer Wandscherrate von 1000 sec^{-1} entsprach. Die Perfusionsdauer betrug 10 min bzw. 4 min. Die Thrombusbildung wurde mit einem Phasenkontrastmikroskop verfolgt. Anschließend wurde die Flusskammer 10 min unter den entsprechenden Scherstress-Bedingungen mit Tyrode's-Puffer gespült, dem 2 mM CaCl_2 und 1 U/ml Heparin zugesetzt waren. Es wurden Phasenkontrast-Aufnahmen von jeweils fünf Bereichen der Flusskammer gemacht (63x Objektiv; Heemskerk et al., 1997). Die Bildanalyse wurde *off-line* mit der *Metamorph Software* (Visitron, München, D) durchgeführt. Die Plättchenadhäsion wurde als mittlerer Prozentsatz der Fläche angegeben, die insgesamt von Thrombozyten bedeckt war.

3.2.18.5 Aggregometrie

Die Plättchenaggregation wurde durch die Veränderung der Lichtdurchlässigkeit mithilfe eines Standard-Aggregometers (Fibrinometer 4, APACT Laborgeräte und Analysensysteme, Hamburg, D) gemessen. Dazu wurden 50 μl PRP oder PPP (s. Abschnitt 3.2.18.1) mit 110 μl Tyrode's-Puffer versetzt und dann die angegebenen Konzentrationen ADP, U46619, CRP oder Kollagen (entsprechen ca. 1 : 100-Verdünnungen) hinzugefügt. Die Veränderungen der Lichtintensität wurden über 10 min verfolgt und in prozentualen Einheiten angegeben, wobei der Wert des PRP 0 % und der des PPP 100 % Aggregation entsprach.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden in zwei getrennten Studien die Funktionen der lysosomalen integralen Membranproteine LIMP-1 und LIMP-2 untersucht. Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wird die Charakterisierung einer Maus beschrieben, die defizient für LIMP-1 ist. Der zweite Teil beschäftigt sich mit der Identifizierung von LIMP-2 als intrazellulärem Transporter des lysosomalen Enzyms β -Glukocerebrosidase.

4.1 Charakterisierung einer LIMP-1-defizienten Maus

4.1.1 Vorüberlegungen zur Generierung der LIMP-1-defizienten Maus

In den späten 80er Jahren wurde erstmals die cDNA des humanen LIMP-1 von Hotta und seinen Kollegen isoliert und kloniert. Das dazugehörige Gen befindet sich auf Chromosom 12 und besteht aus 8 Exonen, was ein charakteristisches Merkmal der Tetraspaninfamilie ist (Hotta et al., 1988; Hotta et al., 1992; Metzelaar et al., 1991). Das Gen wird am 5'-Ende von einem Bereich flankiert, der typische Eigenschaften von Promotoren vieler *house-keeping* oder wachstumskontrollierender Gene trägt (Hotta et al., 1988).

Das murine LIMP-1-Gen liegt auf Chromosom 10, in einer Region die eine Kopplungshomologie zum humanen Chromosom 12 aufweist (Gwynn et al., 1996). Ein zweiter Locus für murines LIMP-1 konnte auf Chromosom 18 lokalisiert werden, der als Cd63-verwandte Sequenz 1 (*Cd63-related sequence 1*; Cd63-rs1) bezeichnet wird. Die Region, in der sich die Cd63-rs1 befindet, weist keine Ähnlichkeit zu bekannten humanen, mit LIMP-1 verwandten Genen auf. Sequenzierungsexperimente zeigten, dass dieser Locus einen kompletten offenen Leserahmen des LIMP-1-Gens enthält, allerdings ohne Intronbereiche und mit einigen Punktmutationen im Vergleich zum Gen auf dem Mausechromosom 10. Cd63-rs1 könnte durch eine erst relativ spät in der Evolution aufgetretene retrovirale Insertion der LIMP-1-cDNA in Chromosom 18 entstanden sein. Cd63-rs1 wird für ein Pseudogen und transkriptionell inaktiv gehalten, was für die meisten Pseudogene gilt (Balakirev und Ayala, 2003).

Um eine Aktivität des LIMP-1-Pseudogens auszuschließen, die die Generierung einer *knock-out*-Maus erschweren würde, wurden *in silico* Promotor-Untersuchungen von einem DNA-Abschnitt durchgeführt, der sich von 3,3 kb vor bis 3,0 kb nach dem Startcodon des LIMP-1-Gens bzw. von 4,9 kb vor bis 1,5 kb nach dem theoretischen Startcodon des LIMP-1-Pseudogens Cd63-rs1 erstreckte. Das Programm „Promotorinspektor“ der Firma Genomatix Software GmbH

(München, D; Werner, 1999) identifizierte einen Promotor, der 154 Basen vor dem ersten Exon des LIMP-1-Gens auf Chromosom 10 beginnt und insgesamt 567 bp umfasst. Im Bereich des LIMP-1-Pseudogens auf Chromosom 18 sagte das Programm keinerlei Promotoraktivität voraus. Das Programm „Dragon Promotor Finder Version 1.5“ (Bajic et al., 2002) machte vergleichbare Aussagen; es zeigte im Bereich um den Transkriptionsstart des LIMP-1-Gens auf Chromosom 10 eine Promotoraktivität auf, allerdings keine im Bereich des Pseudogens auf Chromosom 18. Es wurde deswegen für die Herstellung der LIMP-1-defizienten Maus davon ausgegangen, dass die Cd63-rs1 nicht transkriptionell aktiv war und die Sequenz auf dem Mausechromosom 10 das eigentliche LIMP-1-Gen darstellt.

Die *in silico*-Promotor-Analysen zur Funktionalität der Cd63-rs1-Sequenz wurden durch einen Vergleich der putativen Aminosäuresequenzen der Proteine unterstützt, die von dem LIMP-1-Gen bzw. -Pseudogen codiert werden würden (s. Abb. 4.1). LIMP-1 ist ein lysosomales Membranprotein, das auf einem Adaptorprotein-3 (AP-3)-abhängigen Weg zu seinem Zielort innerhalb der Zelle dirigiert wird. Dafür ist die Interaktion eines Glycin-Tyrosin-Motivs (GY) innerhalb des kurzen zytoplasmatischen C-Terminus von LIMP-1 mit dem AP-3-Komplex essentiell (Metzelaar et al., 1991; Rous et al., 2002). Die Cd63-rs1-Sequenz auf dem Mausechromosom 18 würde ein Protein codieren, in dem dieses lysosomale Transportsignal von GY zu GH verändert wäre. Eine Sortierung dieses Proteins zum Lysosom scheint daher unwahrscheinlich.

```

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50
Chrom. 10 1 M A V E G G M K C V K F L L Y V L L L A F C A C A V G L I A I G V A V Q V V L K Q A I T H E T T A G
Chrom. 18 1 M A V E G G M K C V K F L L Y V L L L A F C T C A V G L I A I G V A V Q V V L K Q A I T Y E T T A G
Chrom. 10 51 S L L P V V I I A V G A F L F L V F F V G C C G A C K E N Y C L M I T F A I F L S L I M L V E V A V
Chrom. 18 51 S L L P V V I I A V G A F L F L V F F V G C C G A C K E N Y C L M I T F A I F L S L I M L V E V A V
Chrom. 10 101 A I A G Y V F R D Q V K S E F N K S F Q Q Q M Q N Y L K D N K T A T I L D K L Q K E N N C C G A S N
Chrom. 18 101 A I A G Y V F R D Q V K S E F N K S F Q Q Q M Q N Y L K D N K T A T I L D K L Q K E N N C C G A S N
Chrom. 10 151 Y T D W E N I P G M A K D R V P D S C C I N I T V G C G N D F K E S T I H T Q G C V E T I A I W L R
Chrom. 18 151 Y T D W E N I P V M A K D R V P D S C C I N I T V G C G N D F K E S T I H T Q G C V E T I A I W L R
Chrom. 10 201 K N I L L V A A A A L G I A F V E V L G I I F S C C L V K S I R S G Y E V M
Chrom. 18 201 K N I L L V A A V A L G I A F V E V L G I I F S C C L V K S I R S G H E V M

```

Abb. 4.1: *Alignment* der putativen Aminosäuresequenzen der Proteine, die von dem murinen LIMP-1-Gen auf Chromosom 10 bzw. dem Pseudogen auf Chromosom 18 codiert würden. Aminosäureaustausche sind in Grün unterlegt. Der Aminosäureaustausch Y → H im C-terminalen, lysosomalen *Targeting*-Motiv wird durch einen roten Kasten hervorgehoben. (DNASTAR Software, Lasergene, Madison, WI, USA)

Um die Fehlsortierung des aus dem LIMP-1-Pseudogen resultierenden Proteins zu überprüfen, wurden Expressionskonstrukte hergestellt, in denen die Proteine der Cd63-rs1-Sequenz von Chromosom 18 und der cDNA des murinen LIMP-1-Gens von Chromosom 10 N-terminal mit dem *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP) verknüpft waren. Während das von Chromosom 10 stammende eGFP-LIMP-1-Protein vorwiegend mit dem lysosomalen Markerprotein LAMP-1 kolokalisierte und nur geringe Mengen an der Plasmamembran anzutreffen waren, befand sich das vom LIMP-1-Pseudogen abstammende eGFP-Fusionsprotein fast ausschließlich an der Zellmembran (s. Abb. 4.2). Dies deutet darauf hin, dass, selbst wenn das LIMP-1 Pseudogen auf Chromosom 18 (Cd63-rs1) transkriptionell aktiv sein sollte, das entstehende Protein keine Funktion innerhalb des lysosomalen Kompartimentes übernehmen könnte.

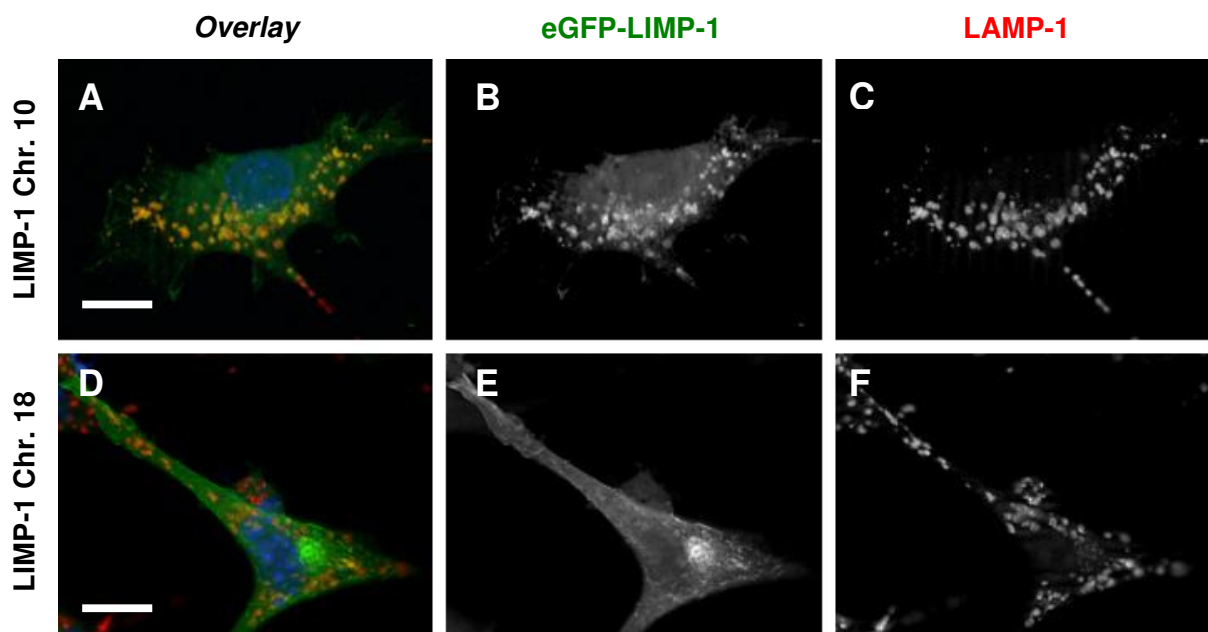


Abb. 4.2 Intrazelluläre Lokalisation der vom LIMP-1-Gen von Mauschromosom 10 oder vom LIMP-1-Pseudogen von Chromosom 18 abstammenden Proteine. Genetisch unveränderte murine embryonale Fibroblasten wurden mit pEGFP-mLIMP-1 von Chromosom 10 (obere Zeile) oder mit pEGFP-mLIMP-1 von Chromosom 18 (Pseudogen, untere Zeile) transfiziert. Die Zellen wurden mit dem lysosomalen Markerprotein LAMP-1 (rot) und dem Kernfarbstoff DAPI (blau) kogefärbt. Während das vom Chromosom 10 abstammende LIMP-1 Protein überwiegend lysosomal lokalisiert ist, befindet sich das Translationsprodukt des Pseudogens aufgrund der Mutation in der lysosomalen Sortierungssequenz fast ausschließlich in der Plasmamembran. Maßstabsbalken: 10 μ m.

4.1.2 Generierung der LIMP-1-defizienten Maus

Die LIMP-1-defiziente Maus wurde generiert, indem eine Neomycinresistenzkassette in das Gen des murinen LIMP-1 auf Chromosom 10 eingefügt wurde (vergl. Abschnitt 3.1.7). Die Resistenzkassette wurde in das Codon der dritten Aminosäure des LIMP-1-Proteins (Valin) innerhalb des Exons 2 inseriert (s. Abb. 4.3). Es kommt folglich in der LIMP-1-defizienten Maus zu einem kompletten Fehlen des LIMP-1-Proteins.

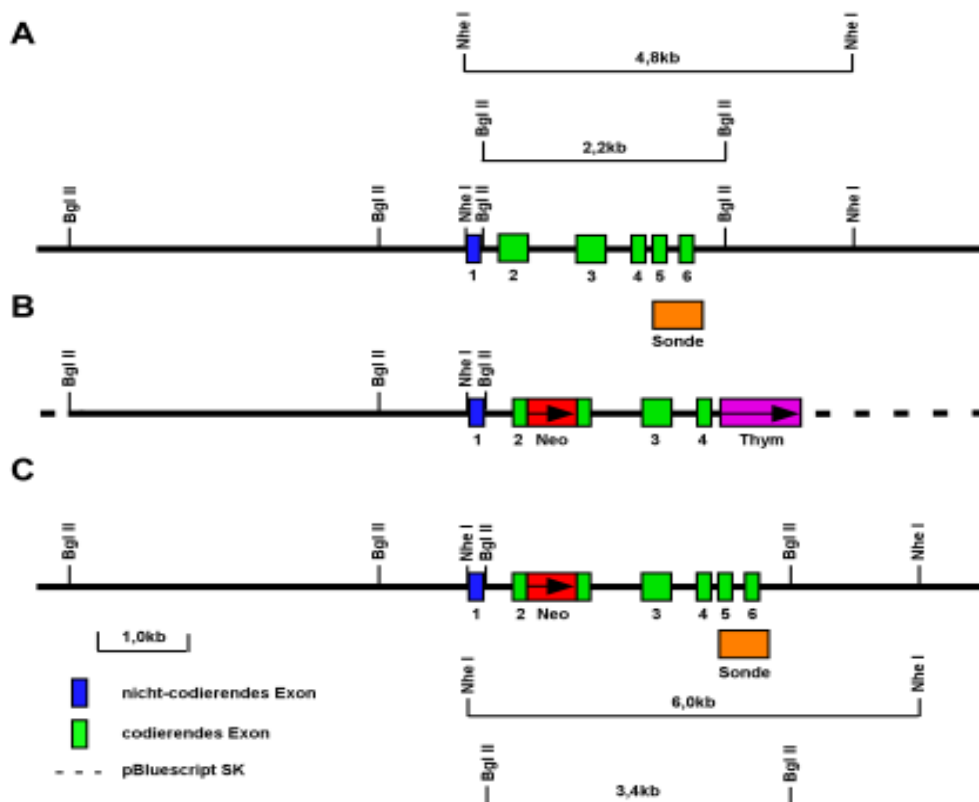


Abb. 4.3: Strategie zur Inaktivierung des LIMP-1-Gens durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen. A) Partielle, ca. 12 kb umfassende Struktur des LIMP-1-Gens auf Chromosom 10. Die codierenden Exons sind als grüne Boxen dargestellt, die nicht codierenden Exons als blaue Boxen und die Introns als durchgehende Linie. Die orangefarbene Box stellt die Sonde dar, die in der *Southern-Blot*-Analyse verwendet wurde. B) Darstellung des *Targeting*-Vektors pBluescript KS-LIMP-1-neo/TK, der über einen Bereich von insgesamt ca. 8 kb homolog zum LIMP-1-Gen-Locus ist. Die Neomycinresistenzkassette wurde als ein XbaI-Fragment in eine durch Mutations-PCR eingeführte NheI-Schnittstelle einkloniert. Die NheI-Schnittstelle liegt in Exon 2 in dem Codon, das den dritten Aminosäurerest (Valin) des LIMP-1-Proteins codiert. C) Struktur des LIMP-1-Gen-Locus nach erfolgreicher homologer Rekombination. In den Teilabbildungen A) und C) sind jeweils Restriktionsfragmente der Enzyme NheI und BglII mit ihrer entsprechenden Länge dargestellt, die im *Southern Blot* mit Hilfe der „orangefarbenen“ Sonde detektiert wurden. Die Zunahme der Fragmentlänge um 1,2 kb diente als Nachweis der erfolgreichen homologen Rekombination.

4.1.3 Überprüfung der LIMP-1-Defizienz

Die mit dem LIMP-1-Zielkonstrukt elektroporierten embryonalen Stammzellklone (ES-Zellklone) wurden durch *Southern-Blot*-Analyse auf homologe Rekombination, d.h. Insertion der Neomycinresistenzkassette in ein LIMP-1-Allel auf Chromosom 10 hin untersucht. Es wurde eine Sonde verwendet, die die Exone 5 und 6 des LIMP-1-Gens auf Chromosom 10 umfasste (s. Abb. 4.3). In zwei Klonen (E32 und E47) konnte die homologe Rekombination durch zusätzliche Banden nachgewiesen werden (s. Abb. 4.4 A). Der ES-Zellklon E32 wurde zur Herstellung der LIMP-1-defizienten Mäuse verwendet.

Organe und Zellen der so erzeugten LIMP-1^{-/-}-Mäuse wurden mittels *Northern-Blot*-, Reverse-Transkriptase (RT)-PCR- und *Western-Blot*-Analysen auf die tatsächliche Ausschaltung des LIMP-1-Gens hin überprüft. Die Hybridisierung von Gesamt-mRNA aus Niere und murinen embryonalen Fibroblasten mit einer Sonde, die den Exons 2 - 5 des LIMP-1-Gens auf cDNA-Ebene entsprechen würde, zeigte ein einziges deutliches Signal in der Wildtyp-Situation, aber nicht im *knock-out* (s. Abb. 4.4 B). Eine für das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-spezifische Sonde zeigte bei beiden Genotypen die gleiche Signalintensität.

Die im *Northern Blot* erhaltenen Ergebnisse wurden durch RT-PCR-Experimente bestätigt. Es wurden Primer verwendet, die sowohl die vom LIMP-1-Gen von Chromosom 10 abstammende cDNA als auch die putative cDNA der LIMP-1-Pseudogensequenz Cd63-rs1 von Chromosom 18 vervielfältigen können. In wt-MEF konnte ein 712 bp großes Fragment amplifiziert werden, das in LIMP-1-defizienten MEF fehlte (s. Abb. 4.4 C). Ein Fragment der cDNA des Zytoskelettproteins Aktin wurde in beiden Fällen gleich stark vervielfältigt.

Ein letzter, entscheidender Nachweis der LIMP-1-Defizienz erfolgte auf Proteinebene mithilfe eines Antikörpers, der gegen die Aminosäurereste 132 - 143 gerichtet ist, die in der zweiten luminalen Schleife des LIMP-1-Proteins liegen. Der Antikörper erkennt besonders gut deglykosyliertes LIMP-1-Protein, da sein Epitop sonst wahrscheinlich von zwei benachbarten N-Zuckerketten verdeckt wird. In genetisch unveränderten weißen Blutzellen, die aus Milz oder Knochenmark isoliert wurden bzw. in neutrophilen Granulozyten, Makrophagen oder murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) war ein deutliches Signal bei 26 kDa zu erkennen, was der berechneten molekularen Masse des deglykosylierten LIMP-1-Proteins entspricht (Metzelaar et al. 1991; s. Abb. 4.4 D). Dieses Signal fehlte in den LIMP-1-defizienten Zellen. In

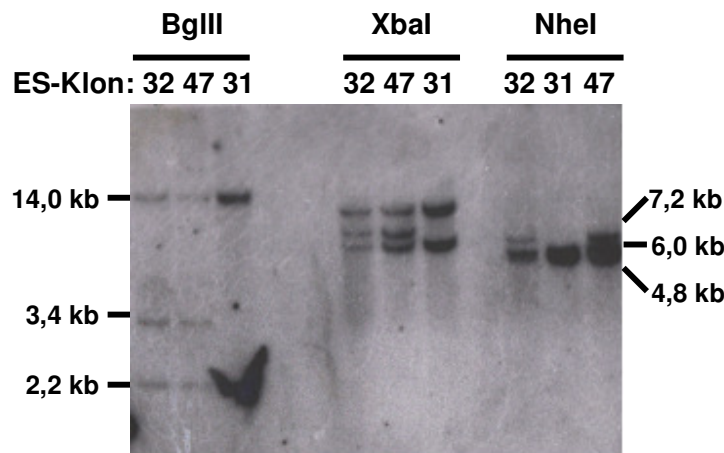
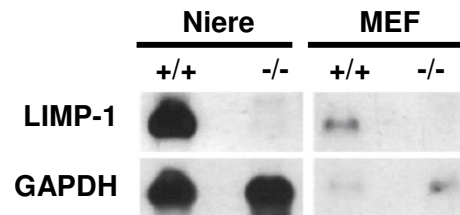
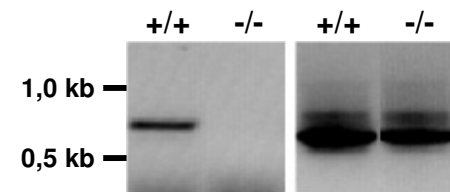
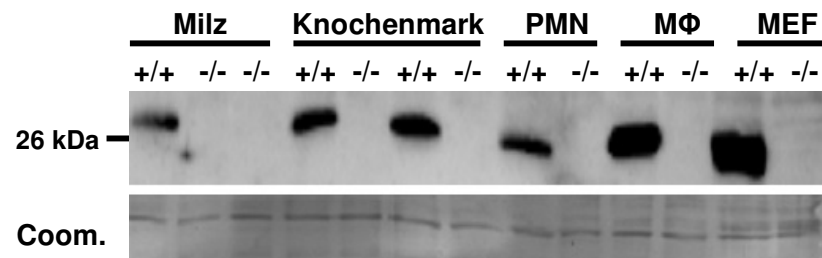
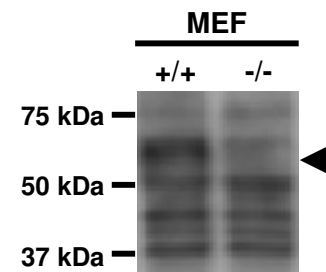
A Southern Blot**B Northern Blot****C RT-PCR****D Western Blot****E Western Blot**

Abb. 4.4: Überprüfung der gezielten Ausschaltung des LIMP-1-Gens. A) *Southern-Blot*-Analyse der embryonalen Stammzellen. Genomische DNA der ES-Zellklone E32, E47 und E31 wurde mit den Restriktionsenzymen BglII, XbaI oder NheI verdaut und mit einer Sonde hybridisiert, die die Exone 5 und 6 des LIMP-1-Gens umfasst (vergl. Abb. 4.3). Zusätzliche DNA-Fragmente bei 3,4 kb, 7,2 kb bzw. 6,0 kb zeigen bei den Klonen 32 und 47 eine erfolgreiche homologe Rekombination der Neomycinresistenzkassette in ein LIMP-1-Allel an. Weitere Banden sind auf das LIMP-1-Pseudogen Cd63-rs1 auf Mausechromosom 18 zurückzuführen. B) *Northern-Blot*-Analyse von Niere und embryonalen Fibroblasten, die aus einer Wildtyp- und der LIMP-1-defizienten Maus stammten. C) Analyse der LIMP-1-Expression mittels RT-PCR. Gesamt-RNA aus murinen embryonalen Fibroblasten wurde mittels Oligo-dT-Primern in cDNA umgeschrieben und anschließend mit LIMP-1- bzw. Aktin-spezifischen Primern amplifiziert. Ein 712 bp großes LIMP-1-Fragment, das in den wt-Zellen zu finden ist, fehlt vollständig in den *ko*-MEF. D) *Western-Blot*-Analyse der LIMP-1-Expression in verschiedenen LIMP-1^{+/+}- und LIMP-1^{-/-}-Zellen mit einem Antikörper, der gegen die zweite luminal Schleife des LIMP-1-Proteins gerichtet ist. Aus Milz bzw. Knochenmark isolierte Zellen bzw. neutrophile Granulozyten (PMN), Makrophagen (MΦ) oder murine embryonale Fibroblasten (MEF) aus LIMP-1^{+/+}- und LIMP-1^{-/-}-Mäusen wurden lysiert und die im Lysat enthaltenen Proteine mit dem Enzym PNGase F deglykosyliert. Obere Abbildung: Ca. 26kDa große, deglykosylierte LIMP-1-Moleküle konnten in wt-, aber nicht in LIMP-1-defizienten Zellen nachgewiesen werden. Untere Abbildung: Eine Coomassie-Färbung der Membran zeigt die gleichmäßige Beladung an. b) Glykosylierung des LIMP-1-Proteins erschwert die Bindung des Antikörpers. Die Bande des glykosylierten LIMP-1-Proteins bei ca. 60kDa ist im Verhältnis zum starken Hintergrund nur schwer in LIMP-1^{+/+}-MEF zu erkennen (Pfeilkopf).

unbehandelten MEF war das Signal des glykosylierten LIMP-1-Proteins bei ca. 60 kDa (Vennegoor, 1985) nur schwer erkennbar (s. Abb. 4.4 E). Ebenfalls konnte im *Western Blot* von verschiedenen Mausorganen wie Leber, Lunge oder Niere mit dem zur Verfügung stehenden Antikörper weder das glykosylierte noch das nicht-glykosylierte LIMP-1-Protein nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte zum einen daran liegen, dass in Gesamt-Gewebelysaten im Vergleich zu Lysaten einzelner Zellarten das eigentliche LIMP-1-Signal von den vielen anderen Proteinen überdeckt wurde, d. h. dass die Wahrscheinlichkeit der unspezifischen Bindung des Antikörpers besonders hoch war. Auf der anderen Seite ist beschrieben worden, dass das LIMP-1-Protein besonders stark in verschiedenen Leukozyten wie hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark, Makrophagen (Miyamoto et al., 1994) oder neutrophilen Granulozyten (Cham et al., 1994) sowie in Zellen in Kultur (Nishikata et al., 1992) exprimiert wird.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse der *Northern-Blot*-, RT-PCR- und *Western-Blot*-Untersuchungen, dass es gelungen war, ein Mausmodell herzustellen, in dem das lysosomale integrale Membranprotein 1 vollständig ausgeschaltet ist. Es gibt keine Hinweise auf eine transkriptionelle Aktivität des LIMP-1-Pseudogens Cd63-rs1 auf dem Mausechromosom 18.

4.1.4 Allgemeine Eigenschaften der LIMP-1-defizienten Maus

LIMP-1-homozygot-defiziente Mäuse gingen mit einer Häufigkeit von 27,5 % aus Verpaarungen LIMP-1-heterozygoter Mäuse hervor (n = 138), was der erwarteten Mendelschen Frequenz von 25 % sehr nahe kommt (s. Abb. 4.5 A). Es scheint folglich nicht zu einem *in utero* Absterben der LIMP-1-homozygot-defizienten Embryonen zu kommen. Die LIMP-1^{-/-}-Mäuse waren lebensfähig und zeigten keine erhöhte Letalität bis zu einem Alter von ca. 18 Monaten. Über dieses Alter hinaus liegen keine Daten vor. Die LIMP-1^{-/-}-Mäuse waren in homozygoten Verpaarungen fertil; es sind Würfe mit bis zu elf lebensfähigen Nachkommen beobachtet worden. Das Gewicht der LIMP-1^{-/-}-Tiere unterschied sich kaum von dem genetisch unveränderter Mäuse (s. Abb. 4.5 B). Verhaltensauffälligkeiten wie veränderte Bewegungen, anderes Sozialverhalten oder Unterschiede in der Fellstruktur, die auf eine gesundheitliche Beeinträchtigung der Tiere hinweisen könnten, wurden nicht bemerkt.

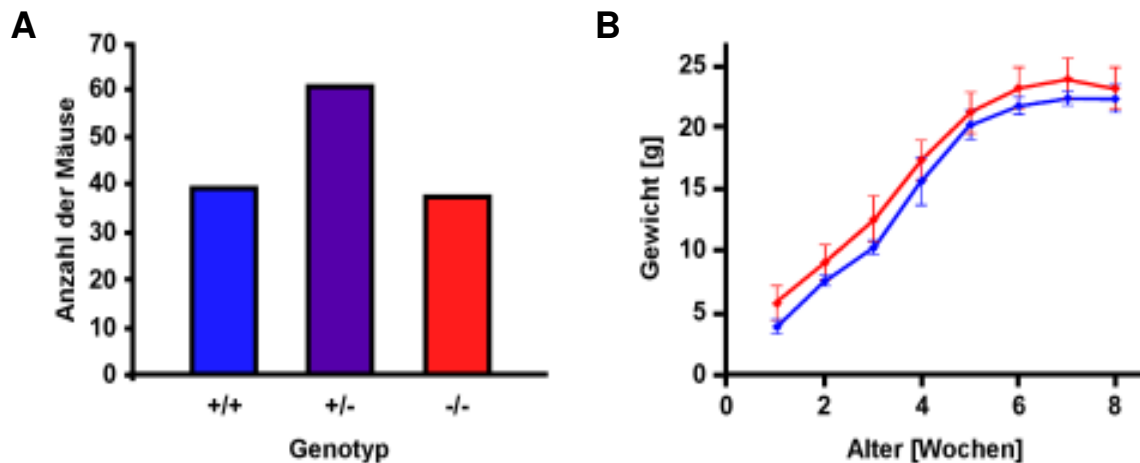


Abb. 4.5: A) Anzahl der Wildtyp-, der heterozygoten und der homozygot LIMP-1-defizienten Nachkommen ($n = 138$) aus heterozygoten Verpaarungen. Mit einer Häufigkeit von 27,5 % entspricht die Anzahl der LIMP-1^{-/-}-Nachkommen relativ genau der erwarteten Mendelschen Frequenz. B) Gewichtsentwicklung der LIMP-1^{-/-}-Mäuse im Vergleich mit genetisch unveränderten Tieren. (+/+ = blaue Linie, -/- = rote Linie)

4.1.5 Immunozytochemische Untersuchung LIMP-1-defizienter Zellen

Um einen ersten Eindruck von der Funktion des lysosomalen integralen Membranproteins LIMP-1 zu bekommen, wurden die Lysosomen LIMP-1-defizienter muriner embryonaler Fibroblasten (MEF) immunozytochemisch auf die Expression und Lokalisation verschiedener lysosomaler Markerproteine wie der lysosomalen Aspartatprotease Cathepsin D und des lysosomalen Membranproteins LAMP-2 hin untersucht (s. Abb. 4.6 A - F). Beide Proteine blieben in den LIMP-1-defizienten Zellen lysosomal lokalisiert und ihre Menge schien im Vergleich zu Wildtyp-MEF unverändert. Insgesamt war auch die Menge und Lage der LAMP-2-positiven Vesikel in den untersuchten Zelllinien unverändert. Es wurden des weiteren keine Änderungen in der Menge und intrazellulären Verteilung der lysosomalen Membranproteine LAMP-1 und LIMP-2 sowie der lysosomalen Hydrolasen β -Glukoronidase, β -Glukocerebrosidase sowie Cathepsin E festgestellt (Daten nicht gezeigt). Die Lysosomen waren trotz der LIMP-1-Defizienz morphologisch unauffällig, wie auch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigten (Daten nicht gezeigt), d.h. LIMP-1 scheint nicht entscheidend an der lysosomalen Genese beteiligt zu sein.

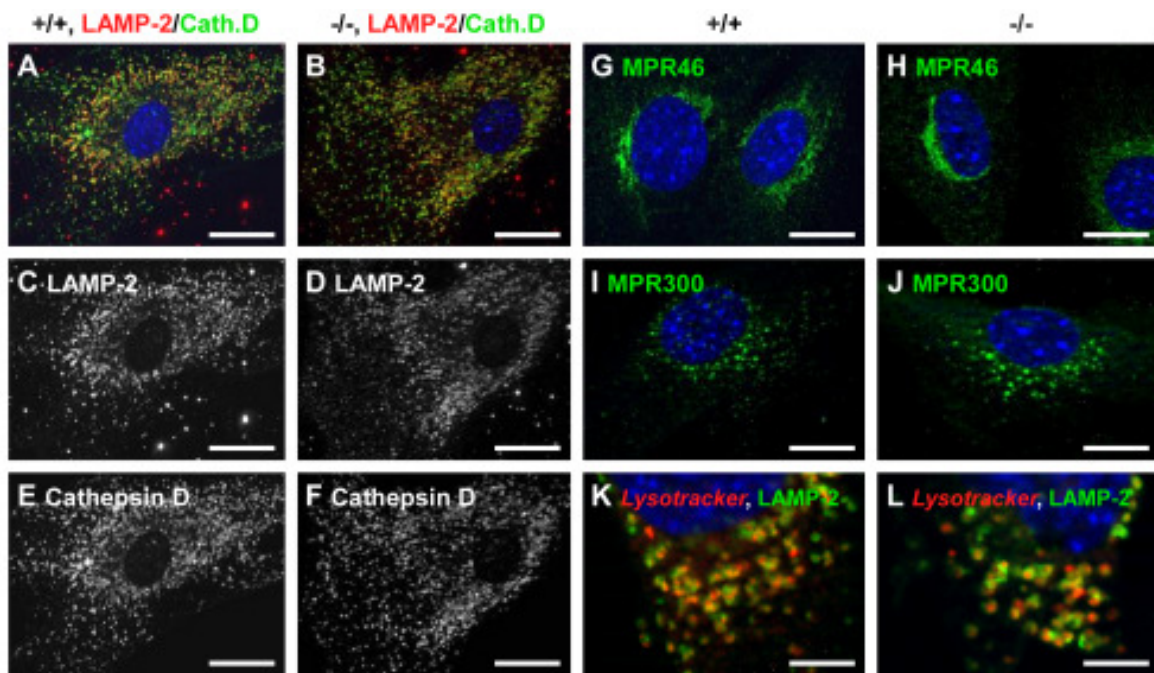


Abb. 4.6: Immunocytochemische Untersuchung LIMP-1-defizienter Zellen. A - F) LIMP-1^{+/+} und LIMP-1^{-/-} murine embryonale Fibroblasten wurden mit 4 % PFA/PBS fixiert und gegen Cathepsin D (rot) und LAMP-2 (grün) gefärbt. Die Einzelfärbungen gegen Cathepsin D bzw. LAMP-2 sind in den Teilabbildungen C - F dargestellt. In den Teilabbildungen G - H bzw. I - J sind die Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren MPR46 sowie MPR300 angefärbt. K-L) Auch in den LIMP-1-defizienten Lysosomen herrscht ein saurer pH-Wert, wie mit Hilfe des Farbstoffs *LysoTracker Red* (rot) nachgewiesen werden konnte. (LAMP-2 = grün) Die Zellkerne sind mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI blau dargestellt. Maßstabsbalken: A - F: 10 μ m, G - H: 5 μ m, K - L: 2,5 μ m

Ein weiteres Merkmal der Lysosomen ist ihr saurer pH-Wert. Dieser kann mithilfe des Farbstoffes *LysoTracker Red* untersucht werden. *LysoTracker Red* besteht aus einem Fluorophor, das an eine schwache Base gekoppelt ist. Diese Base ist bei neutralem pH-Wert nur teilweise protoniert und deswegen membrangängig. In sauren Organellen wie dem Lysosom wird die Base wahrscheinlich protoniert und kann dadurch die Membran nicht mehr passieren. Es kommt zu einer Anreicherung des Fluorophors und damit zu einer Anfärbung der Lysosomen. Der Vergleich zwischen LIMP-1^{+/+}- und LIMP-1^{-/-}-Lysosomen zeigte, dass beide Lysosomenpopulationen noch *LysoTracker Red* anreicherten und folglich noch einen sauren pH-Wert aufwiesen (s. Abb. 4.6 K - L). Diese Beobachtung wird dadurch bestätigt, dass auch die V-Typ-ATPase, die Protonenpumpe, die für die Aufrechterhaltung des lysosomalen pH-Wertes verantwortlich ist (Forgac, 2000), unverändert in LIMP-1-defizienten Lysosomen zu finden war (Daten nicht gezeigt.).

Weitere Proteine, die für die Funktion von Lysosomen essenziell sind, sind die Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPR46 und MPR300), die eine Vielzahl saurer Hydrolasen mit einem Mannose-6-Phosphat-Transportsignal zum Lysosom dirigieren (Storch und Braulke, 2005). Beide Rezeptoren lagen in unveränderter Menge und vergleichbarer Lokalisation in LIMP-1-defizienten MEF vor.

4.1.6 Immunoblot-Analyse LIMP-1-defizienter Zellen

Um die qualitativen Beobachtungen der immunozytochemischen Analyse der LIMP-1-defizienten MEF zu bestätigen, wurden quantitative *Western-Blot*-Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurden Lysate von jeweils zwei voneinander unabhängigen LIMP-1^{+/+}- und LIMP-1^{-/-}-murinen embryonalen Fibroblastenlinien (MEF) verwendet. Es zeigte sich, dass sowohl die lysosomalen Membranproteine LAMP-1, LAMP-2 und LIMP-2 als auch die lysosomale Aspartatprotease Cathepsin D in gleichen Mengen in Wildtyp- und LIMP-1-*knock-out*-MEF vorkamen (s. Abb. 4.7 A, B). Die Abwesenheit von LIMP-1 hatte folglich keinen signifikanten Effekt auf die Expression und Stabilität der untersuchten lysosomalen Proteine.

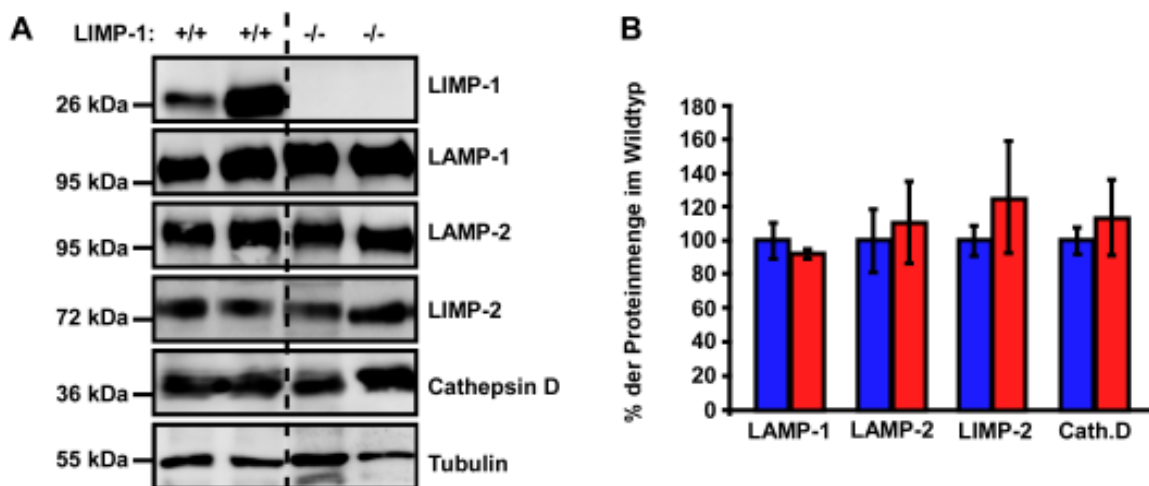


Abb. 4.7: Immunoblot-Analyse LIMP-1-defizienter Zellen. A) LIMP-1^{+/+}- und LIMP-1^{-/-}-MEF wurden lysiert und gleiche Mengen Protein auf SDS-Gelen aufgetrennt, die anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet wurden. In den LIMP-1-defizienten Zellen kamen die lysosomalen Membranproteine LAMP-1, LAMP-2 und LIMP-2 sowie die lysosomale Protease Cathepsin D in vergleichbaren Mengen wie in Wildtyp-MEF vor. Das Zytoskelettprotein Tubulin diente als Marker für gleiche Beladung. B) Densitometrische Quantifizierung der Abbildung A. Die durchschnittliche Proteinmenge der LIMP-1^{+/+}-MEF (blaue Balken) wurde gleich 100 % gesetzt und die Proteinmenge in LIMP-1^{-/-}-MEF (rote Balken) relativ dazu ausgedrückt. (Die Fehlerbalken geben jeweils die Standardabweichung an.)

4.1.7 Enzymatische Aktivität verschiedener lysosomaler Hydrolasen

Lysosomale Hydrolasen stellen den wohl wichtigsten Bestandteil des Lysosoms dar. Ihre Aktivität ist deswegen ein besonders günstiger Marker, um die Funktionsfähigkeit dieses Zellorganells zu beurteilen. Deswegen wurde die Aktivität der lysosomalen Enzyme β -Hexosaminidase, Arylsulfatase A, β -Glukocerebrosidase und β -Mannosidase in verschiedenen Gewebelysaten (Leber, Niere, Milz, Gehirn, Herz) sowie im Serum von Wildtyp- und LIMP-1-defizienten Mäusen bestimmt. In Abb. 4.8 ist die enzymatische Aktivität dieser Enzyme in der Leber exemplarisch für alle anderen Gewebe (Daten nicht gezeigt) dargestellt. Man erkennt, dass alle untersuchten Enzyme in etwa die gleiche Aktivität in beiden Genotypen aufwiesen. Dies deutet darauf hin, dass die allgemeine Funktionalität des Lysosoms in LIMP-1-defizienten Zellen bzw. Geweben nicht beeinträchtigt war. Hierfür spricht auch, dass im Serum der LIMP-1^{-/-}-Maus kein einziges der untersuchten Enzyme in einer im Vergleich zum Wildtyp erhöhten Konzentration zu finden war (Daten nicht gezeigt). Die Enzyme scheinen folglich unabhängig von LIMP-1 zum Lysosom transportiert zu werden.

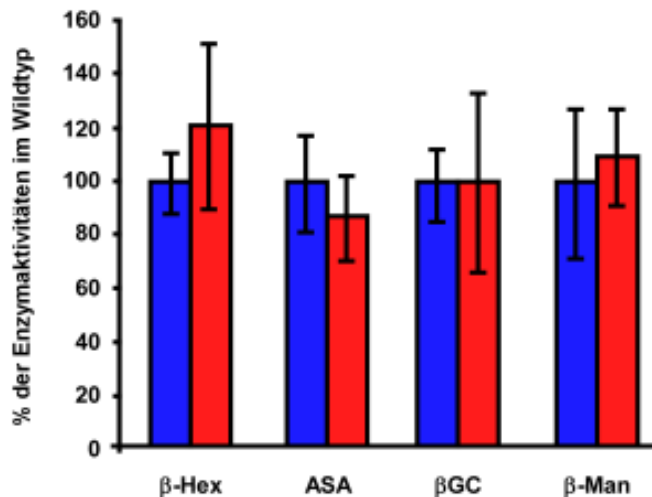


Abb. 4.8: Aktivität verschiedener lysosomaler Enzyme in der Leber von LIMP-1^{+/+}- und LIMP-1^{-/-}-Mäusen. In Leberhomogenisaten von jeweils fünf LIMP-1^{+/+}- und LIMP-1^{-/-}-Mäusen wurde die enzymatische Aktivität der lysosomalen Hydrolasen β -Hexosaminidase (β -Hex), Arylsulfatase A (ASA), β -Glukocerebrosidase (β GC) und β -Mannosidase (β -Man) bestimmt. Es wird die relative Enzymaktivität in den LIMP-1-defizienten Geweben (rote Balken) relativ zum Wildtyp (100 %; blaue Balken) angegeben. Keines der untersuchten Enzyme war in der LIMP-1-defizienten Leber signifikant reduziert. (n = 5; die Fehlerbalken geben jeweils die Standardabweichung an)

4.1.8 Einfluss von LIMP-1-siRNA auf die Lysosomen von HeLa-Zellen

Die Untersuchung verschiedener Gewebe und Zellen der LIMP-1-defizienten Maus zeigte keinerlei Beeinträchtigung der lysosomalen Struktur, Verteilung und Funktion. Diese Ergebnisse wurden in mit LIMP-1-spezifischer siRNA behandelten HeLa-Zellen überprüft. Dazu wurden HeLa-Zellen entweder mit LIMP-1-spezifischer oder mit Kontroll-siRNA transfiziert, drei Tage lang kultiviert und anschließend für immunocytochemische Untersuchungen fixiert.

Es zeigte sich, dass analog zu den Untersuchungen an LIMP-1-defizienten MEF, die Abwesenheit von LIMP-1 keinen Einfluss auf die Expression und lysosomale Lokalisation der Aspartatprotease Cathepsin D hatte (s. Abb. 4.9). Auch die Ansäuerung des lysosomalen Lumens erfolgte in einem vergleichbaren Maße wie bei mit Kontroll-siRNA-behandelten Zellen, wie die Färbung mit dem Azidifizierungsmarker *Lysotracker Red* zeigte (s. Abb. 4.9). Die Anzahl und Lokalisation der *Lysotracker Red* positiven Vesikel blieb in mit LIMP-1-siRNA-behandelten Zellen unverändert.

4.1.9 Analyse des Immunsystems LIMP-1-defizienter Mäuse

LIMP-1 ist besonders stark in Leukozyten wie neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert, woher auch der alternative Name CD63 für LIMP-1 resultiert (Sincock et al., 1997). Um eine mögliche Bedeutung von LIMP-1 für die Differenzierung der Zellen des Immunsystems zu identifizieren, wurden in Kooperation mit Zane Orinska (Forschungszentrum Borstel, D) Knochenmark, Milz, Lymphknoten, Thymus und das Peritoneum LIMP-1-defizienter Mäuse mithilfe des *Fluorescence Activated Cell Scanning* (FACS) auf die Zusammensetzung und An- bzw. Abwesenheit einzelner Leukozytenpopulationen untersucht. Dazu wurden einmal zwölf Monate und einmal zwei Monate alte Wurfgeschwister aus heterozygoten Verpaarungen verwendet.

Die Immunzellen der einzelnen Organe wurden zunächst im FACS auf ihre Eigenschaften im Vorwärts- (*Forward Scatter*, FSC) bzw. Seitwärtsstreulicht (*Sideward Scatter*, SSC) untersucht. Das FSC ist ein Maß für die Größe der untersuchten Zellen, während das SSC Auskunft über die Granularität der Zellen sowie die Form und Größe des Zellkerns gibt. Beide Parameter geben einen groben Anhalt über die Zusammensetzung der Immunzellpopulationen einzelner Organe. Es konnten keine Unterschiede in den FSC-SSC-Diagrammen zwischen LIMP-1^{+/+}- und LIMP-1^{-/-}-Mäusen festgestellt werden (s. Abb. 4.10).

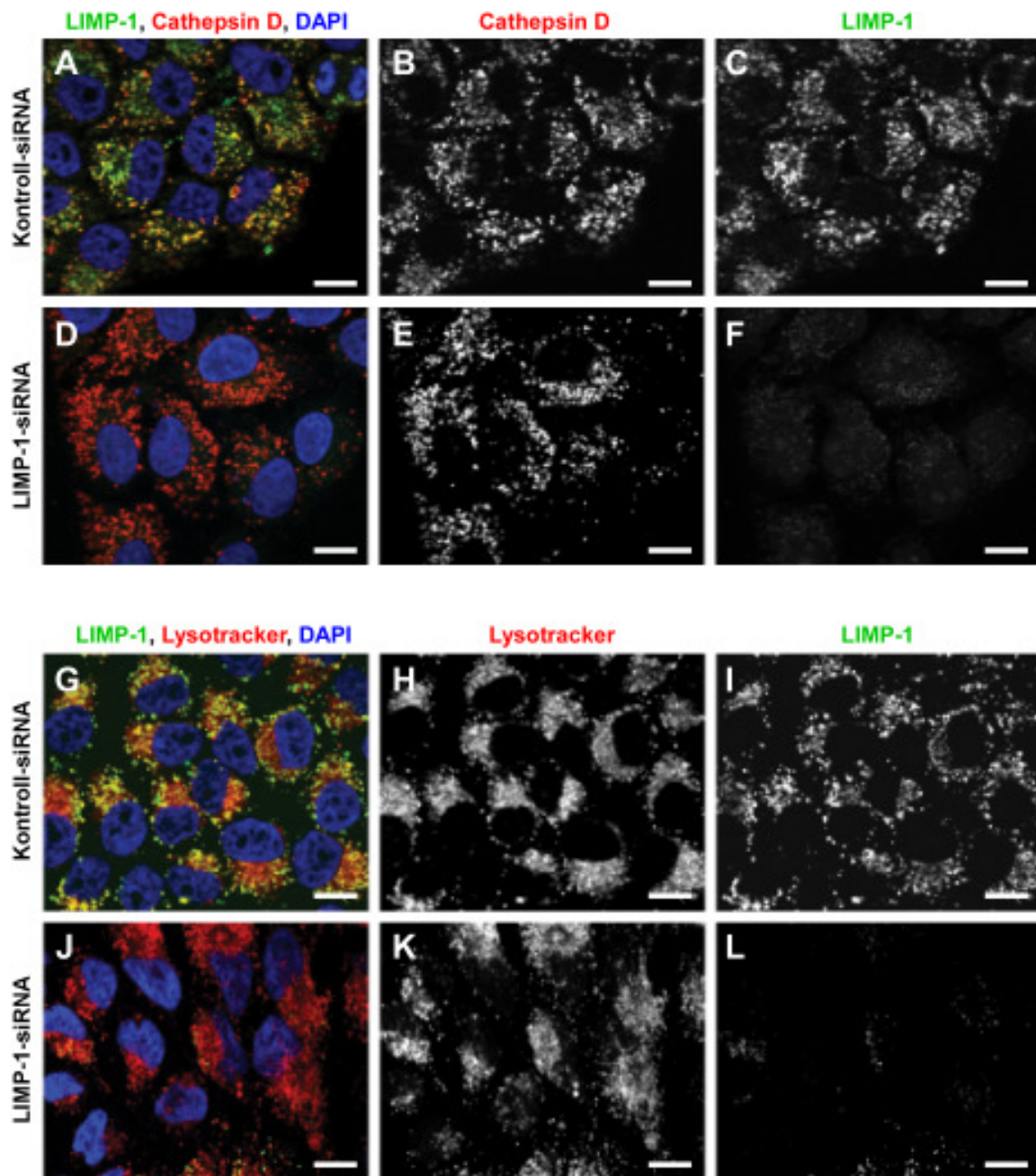


Abb. 4.9: Immunocytochemische Untersuchung mit LIMP-1-siRNA behandelter HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden entweder mit unspezifischer Kontroll- oder LIMP-1-spezifischer siRNA transfiziert, drei Tage lang kultiviert und anschließend immunocytochemisch untersucht. Die verminderte Expression von LIMP-1 (grün) in mit LIMP-1-siRNA-behandelten Zellen wurde mithilfe eines Antikörpers nachgewiesen, der spezifisch humanes LIMP-1 detektiert. A - F) Die Expression und Lokalisation der lysosomalen Aspartatprotease Cathepsin D (rot) war in mit LIMP-1-siRNA behandelten Zellen unverändert. G - L) Auch in den LIMP-1-defizienten Lysosomen herrschte ein saurer pH-Wert wie mit Hilfe des Farbstoffs *LysoTracker Red* (rot) nachgewiesen werden konnte. Die Zellkerne sind mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI blau dargestellt. Maßstabsbalken: 10 μ m

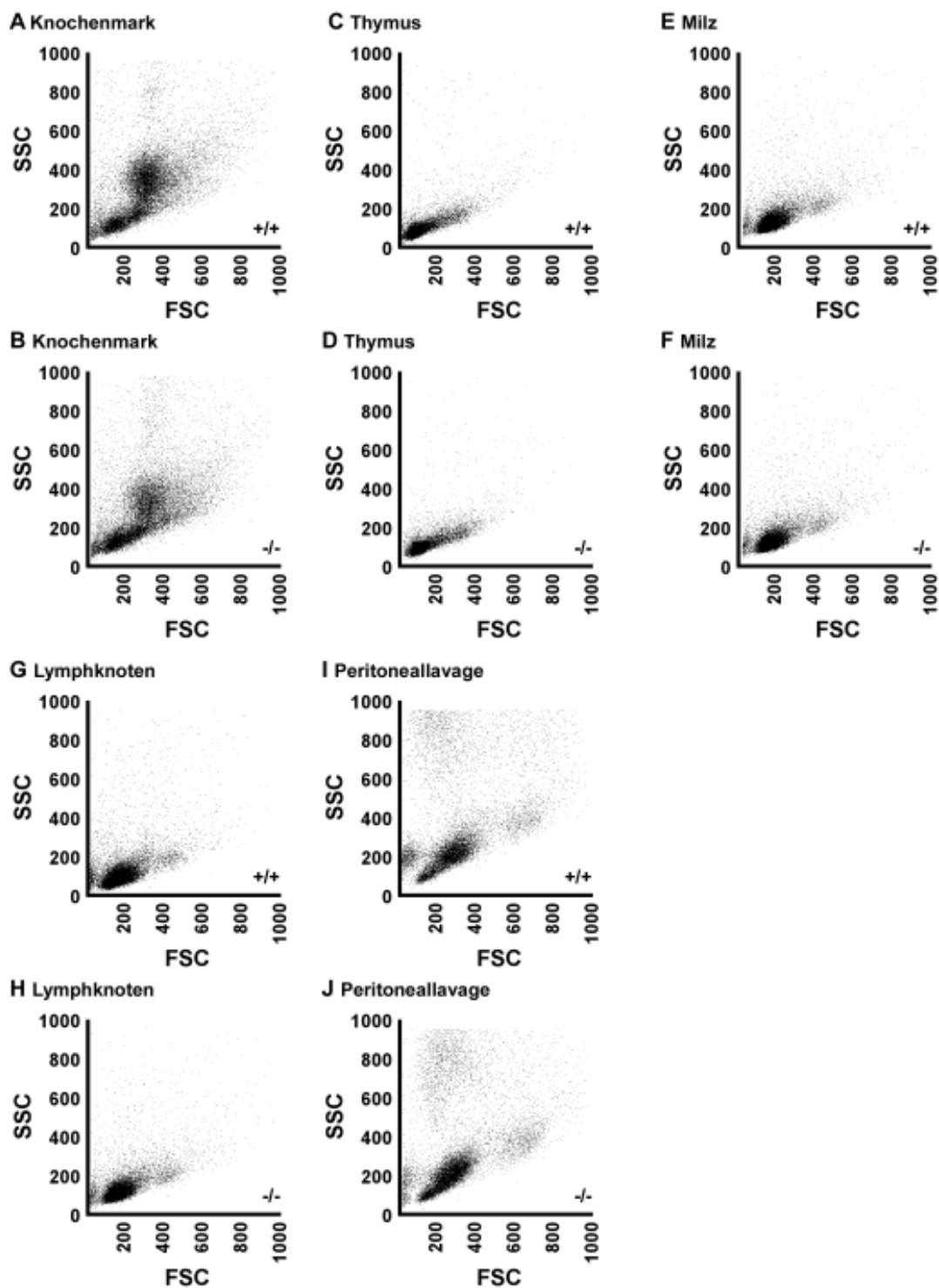


Abb. 4.10: Darstellung der Leukozyten in A, B) Knochenmark, C, D) Thymus, E, F) Milz, G, H) Lymphknoten und I, J) Peritoneum von LIMP-1^{+/+}- und LIMP-1^{-/-}-Mäusen im Vorwärts- (*Forward Scatter*, FSC) und Seitwärtsstreulicht (*Sideward Scatter*, SSC). Es wurden die Organe aus zwölf (bzw. zwei, Thymus) Monate alten Geschwistern aus heterozygoten Verpaarungen analysiert. Es wird jeweils ein repräsentatives Experiment aus fünf einzelnen Experimenten dargestellt.

Deswegen wurden die einzelnen Immunzellpopulationen in den verschiedenen primären und sekundären lymphatischen Organen mit Hilfe von Antikörpern, die gegen spezifische Epitope einzelner Leukozytenpopulationen gerichtet sind, untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 4.1 zusammengefasst.

Knochenmark: Im Knochenmark sind die hämatopoetischen Stammzellen lokalisiert, von denen sowohl die lymphozytären Vorläuferzellen (*common lymphoid progenitors*, CLPs) als auch die myeloiden Vorläuferzellen (*common myeloid progenitors*, CMPs) abstammen (Metcalf, 2007). Aus den CLPs entwickeln sich in mehreren Schritten die T- und B-Lymphozyten. Die CMPs können sich zum einen über eine gemeinsame Zwischenstufe zu Erythrozyten oder zu Megakaryozyten bzw. Blutplättchen weiterentwickeln. Zum anderen entwickeln sich die Vorläuferzellen der Granulozyten und Makrophagen aus den CMPs (Metcalf, 2007).

Eine Möglichkeit der Identifikation verschiedener Knochenmark-Zellpopulationen liegt in der Verwendung von Antikörpern, die gegen das Zelladhäsionsmolekül CD31/PECAM-1 und das Typ-V-Glykophosphatidylinositol-verankerte Zelloberflächenprotein Ly-6C (de Bruijn et al., 1998; Kreisel et al., 2006; Vanderloo et al., 1995) gerichtet sind. CD31 wird auf Stammzellen, frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen und lymphoiden Zellen exprimiert, aber nicht auf erythroiden, granulozytären oder monozytären Vorläuferzellen. Ly-6C wird dagegen von Granulozyten und Makrophagen bzw. deren entsprechenden Vorläufern exprimiert und zwar ab dem Zeitpunkt, an dem sich die Vorläuferzellen in die entsprechen basophilen, eosinophilen, neutrophilen und makrophagozytären/monozytären Linien aufteilen (de Bruijn et al., 1998).

Bei Zellen mit dem Oberflächenprofil $CD31^+Ly-6C^-$ handelt es sich folglich vorwiegend um sehr frühe hämatopoetische Progenitorformen (s. Abb. 4.11 A, B). Sie machten ca. 4 % aller Zellen des Knochenmarks aus. Verschiedene frühe und späte Reifungsstufen lymphoider Zellen sind durch einen $CD31^+Ly-6C^-$ -Phänotyp gekennzeichnet und repräsentierten 26 % aller Zellen im Knochenmark. Die ca. 6 % myeloiden Vorläuferzellen des Knochenmarkes, aus denen sich später sowohl die Megakaryozyten und Erythrozyten als auch die Granulozyten und Monozyten/Makrophagen entwickeln werden, sind $CD31^-$ und $Ly-6C^-$ -doppelt-positiv. Die aus den myeloiden Zellen entstehenden erythroiden und megakaryozytären Vorläuferzellen sind sowohl $CD31^-$ als auch $Ly-6C^-$ -negativ und machten in dieser Arbeit ca. 5 % der Zellen des Knochenmarks aus. Wie bereits oben erwähnt wird $Ly-6C$ spezifisch auf Granulozyten und Monozyten bzw. deren Vorläufern exprimiert, während $CD31$ auf diesen Zellen nicht mehr vorkommt. Die Granulozyten ($CD31^-Ly-6C^+$) und die Monozyten ($CD31^-Ly-6C^+$) stellten ca.

| Zelltyp | Oberflächenmarker | % der Zellen mit dem angegebenen Phänotyp | |
|----------------------------------|--|---|-----------------------|
| | | LIMP-1 ^{+/+} | LIMP-1 ^{-/-} |
| Knochenmark | | | |
| Blasten | CD31 ⁺ Ly6C ⁻ | 3,8±0,5 | 4,1±1,0 |
| Lymphoide Zellen | CD31 ⁺ Ly6C ⁻ | 27,2±1,4 | 24,9±3,6 |
| Myeloide Vorläufer | CD31 ⁺ Ly6C ⁺ | 5,7±0,8 | 6,7±0,6 |
| Erythroide Vorläufer | CD31 ⁻ Ly6C ⁻ | 5,1±0,4 | 5,1±1,1 |
| Granulozyten | CD31 ⁻ Ly6C ⁺ | 42,6±6,0 | 44,0±10,6 |
| Monozyten | CD31 ⁻ Ly6C ⁺ | 12,4±3,1 | 12,6±2,1 |
| Pro-prä-B-Zellen | B220 ⁺ IgM ⁻ | 10,7±0,9 | 9,4±1,7 |
| Unreife B-Zellen | B220 ⁺ IgM ⁺ | 5,5±0,4 | 4,7±1,2 |
| Reife B-Zellen | B220 ⁺ IgM ⁺ | 2,6±0,6 | 2,9±1,0 |
| Natürliche Killerzellen | CD49b ⁺ | 2,0±0,2 | 1,9±0,2 |
| Unreife Granulozyten | CD11b ⁺ Gr1 ⁺ | 21,0±0,6 | 18,6±1,1 |
| Reife Granulozyten | CD11b ⁺ Gr1 ⁺⁺ | 41,8±1,6 | 45,5±5,0 |
| T-Zellen | CD3 ⁺ | 4,8±0,2 | 5,5±0,9 |
| Milz | | | |
| T-Zellen | CD3 ⁺ | 28,3±2,5 | 27,8±1,8 |
| T-Helferzellen | CD3 ⁺ CD4 ⁺ | 16,7±0,6 | 16,6±1,0 |
| Zytotoxische T-Zellen | CD3 ⁺ CD8 ⁺ | 10,1±1,7 | 9,2±1,3 |
| Aktivierte T-Helferzellen | CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD69 ⁺ | 6,0±0,9 | 6,1±0,7 |
| Aktivierte zytotoxische T-Zellen | CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD69 ⁺ | 0,7±0,2 | 1,8±1,2 |
| B-Zellen | B220 ⁺ | 60,5±2,5 | 56,6±2,7 |
| Unreife B-Zellen | B220 ⁺ IgM ⁺ IgD ^{low} | 6,9±0,8 | 5,9±0,8 |
| Reife B-Zellen | B220 ⁺ IgM ^{low} IgD ^{high} | 48,3±2,6 | 42,7±4,7 |
| Natürliche Killerzellen | CD49b ⁺ B220 ⁻ | 0,9±0,1 | 0,8±0,1 |
| Lymphknoten | | | |
| T-Zellen | CD3 ⁺ | 43,3±3,1 | 52,0±2,0 |
| T-Helferzellen | CD3 ⁺ CD4 ⁺ | 20,9±1,9 | 25,8±1,5 |
| Zytotoxische T-Zellen | CD3 ⁺ CD8 ⁺ | 16,3±2,3 | 18,7±1,8 |
| Aktivierte T-Helferzellen | CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD69 ⁺ | 5,9±0,8 | 6,3±1,1 |
| Aktivierte zytotoxische T-Zellen | CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD69 ⁺ | 2,7±0,4 | 2,6±0,5 |
| B-Zellen | B220 ⁺ IgM ⁺ | 21,2±1,0 | 17,3±1,6 |
| Natürliche Killerzellen | CD49b ⁺ B220 ⁻ | 1,4±0,1 | 2,3±0,8 |
| Makrophagen | CD11b ⁺ Gr1 ⁻ | 8,2±1,0 | 9,2±2,8 |
| Peritoneum | | | |
| Mastzellen | CD117 ⁺ FcεRI ⁺ | 0,8±0,8 | 1,1±0,7 |

Tab. 4.1: Analyse der Zellen des Immunsystems LIMP-1-defizienter Mäuse. In Knochenmark, Milz, Lymphknoten und Peritoneum wurden die verschiedenen Lymphozytenpopulationen mithilfe der angegebenen Marker mittels FACS untersucht. Die Anzahl der T-Zellen, B-Zellen, natürlichen Killerzellen (NK), Granulozyten und Mastzellen, deren Vorläuferzellen sowie deren Aktivierungsstatus waren vergleichbar zwischen LIMP-1^{+/+}- und LIMP-1^{-/-}-Mäusen. Es wurden für jeden Genotyp fünf zwölf Monate alte Weibchen aus heterozygoten Verpaarungen untersucht. (% = % der gesamten lebenden Zellen; angegeben sind jeweils der Mittelwert ± Standardabweichung)

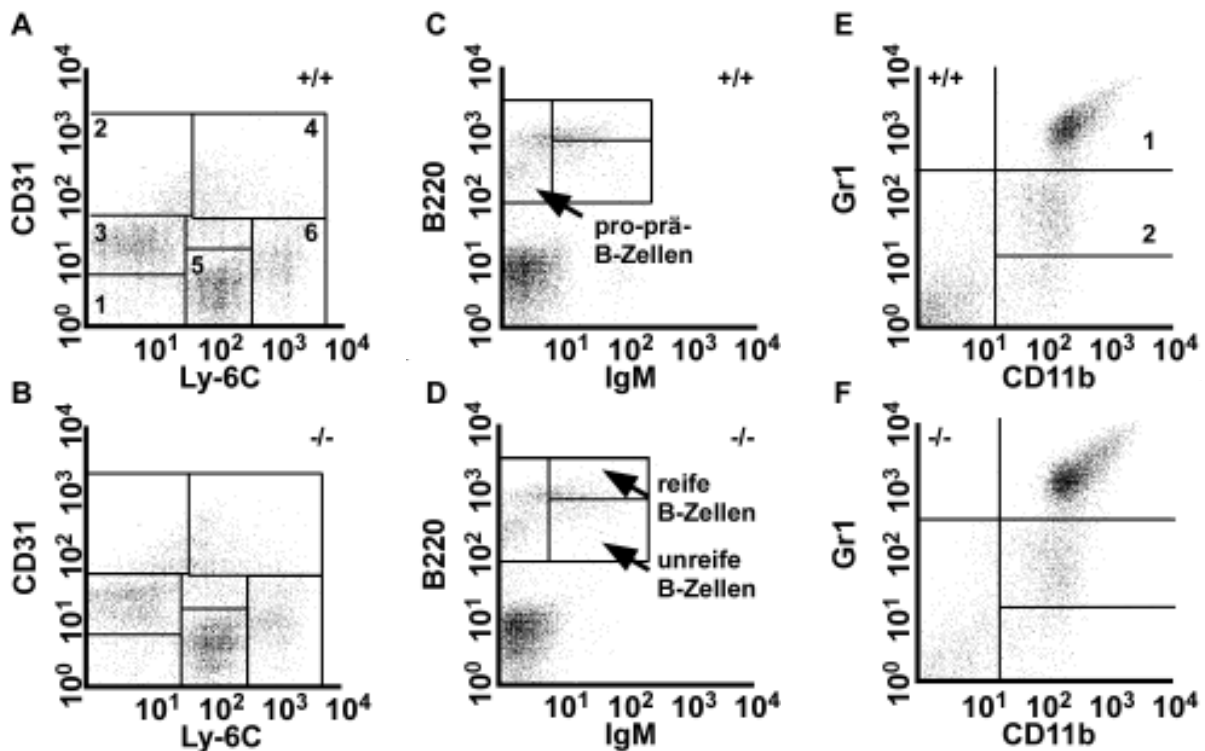


Abb. 4.11: Quantifizierung verschiedener Immunzellpopulationen im Knochenmark LIMP-1-defizienter Mäuse mittels FACS-Analyse. Knochenmark von jeweils fünf LIMP-1^{+/+} und LIMP-1^{-/-} zwölf Monate alten Schwestern aus heterozygoten Verpaarungen wurde mithilfe entsprechender Antikörper mittels FACS analysiert. A, B) Erythroide Vorläuferzellen (1), Blastzellen (2), lymphoide Zellen (3), myeloide Vorläufer (4), Granulozyten (5), sowie Monozyten (6) wurden über die Oberflächenepitope CD31 und Ly-6C voneinander unterschieden. C, D) Die Reifung der B-Lymphozyten im Knochenmark kann mit Antikörpern, die gegen B220 und IgM gerichtet sind, verfolgt werden. E, F) Unreife Granulozyten (1) zeigten im Vergleich zu reifen Granulozyten (2) eine stärkere Expression der Proteine Gr1 und CD11b. Die Abbildungen stellen jeweils ein repräsentatives Experiment aus fünf einzelnen Experimenten dar.

43 % bzw. 12 % der Knochenmarkszellen dar. Alle untersuchten Zellpopulationen waren jeweils vergleichbar zwischen LIMP-1^{+/+}- und LIMP-1^{-/-}-Mäusen (s. Abb. 4.11 A, B; s. Tab. 4.1).

Die B-Lymphozyten entwickeln sich aus den lymphoiden Vorläuferzellen des Knochenmarks und ihre Reifung kann mit Antikörpern verfolgt werden, die gegen die B-Zell-spezifische Isoform des CD45-Glykoproteins (CD45R/B220) und die Immunglobulin Unterklasse IgM gerichtet sind (Hardy et al., 2007; Hardy und Hayakawa, 1991; Tsitsikov et al., 1997). Es zeigte sich, dass die LIMP-1^{-/-}-Mäuse eine normale Anzahl von pro-prä-B-Zellen (IgM⁻B220⁺, ca. 10 %), unreifen B-Zellen (IgM⁺B220⁺, ca. 5 %) und reifen B-Zellen (IgM⁺B220⁺⁺, ca. 3 %) aufwiesen (s. Abb. 4.11 C, D; s. Tab. 4.1). Vergleichbare Mengen an B-Zellvorläufern konnten auch mit Antikörpern gegen CD43 (Ly-48, Leukosialin) detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems (Janeway et al., 2002a). NK-Zellen können anhand der Expression des $\alpha 2$ -Integrins (CD49b) identifiziert werden (Arase et al., 2001). Mit 2,0 % bzw. 1,9 % kommen etwa gleich viele NK-Zellen im Knochenmark von LIMP-1^{-/-} im Vergleich zu LIMP-1^{+/+}-Mäusen vor (s. Tab. 4.1).

Granulozyten sind u.a. durch das Epitop Ly-6G/Ly-6C (Gr1) und den Komplementrezeptor 3 CD11b (Mac-1 α) charakterisiert. Unreife Granulozyten weisen im Vergleich zu reifen Granulozyten eine stärkere Expression der beiden Proteine auf. Das Fehlen des LIMP-1-Proteins hatte aber keinen Einfluss auf die Anzahl bzw. Reifung der Granulozyten im Knochenmark (s. Abb. 4.11 E, F; s. Tab. 4.1).

Zellen, die den T-Zellrezeptor CD3 exprimieren, waren im Knochenmark sowohl der zwölf Monate alten, LIMP-1-defizienten als auch der Wildtyp-Tiere mit 5,5 % bzw. 4,8 % gleichermaßen schwach vertreten (s. Tab. 4.1).

Thymus: Die Reifung der T-Zellen erfolgt im Thymus und kann anhand der Oberflächenmarker CD44, CD25, CD3, CD4 und CD8 verfolgt werden (Bhandoola et al., 2007). Bei CD44 handelt es sich um ein Hyaluronsäure-bindendes Protein, das die Adhäsion von Leukozyten vermittelt. Bei CD25 handelt es sich um die α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors.

| Zelltyp | Oberflächenmarker | % der Zellen mit dem angegebenen Phänotyp | |
|-----------------------------|--|---|-----------------------|
| | | LIMP-1 ^{+/+} | LIMP-1 ^{-/-} |
| DN1 | CD3 ⁻ CD4 ⁻ CD8 ⁻ CD44 ⁺ CD25 ⁻ | 1,8±0,2 | 1,2±0,2* |
| DN2 | CD3 ⁻ CD4 ⁻ CD8 ⁻ CD44 ⁺ CD25 ⁺ | 0,4±0,2 | 0,1±0,2* |
| DN3 | CD3 ⁻ CD4 ⁻ CD8 ⁻ CD44 ⁻ CD25 ⁺ | 1,7±0,3 | 1,5±0,1 |
| Doppelt positive Thymozyten | CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ | 72,5±5,7 | 76,2±4,2 |
| Zytotoxische T-Zellen | CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺ | 4,9±1,1 | 3,8±0,7 |
| T-Helferzellen | CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ | 16,8±3,6 | 15,4±2,9 |

Tab. 4.2: Analyse der Thymozyten LIMP-1-defizienter Mäuse. Im Thymus wurde die Reifung der T-Zellen mit Hilfe der angegebenen Marker mittels FACS untersucht. Es wurden für jeden Genotyp sechs zwei Monate alte Mäuse untersucht. (% = % der gesamten lebenden Zellen; * = p < 0,05; angegeben sind jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung)

Die erste Entwicklungsstufe der T-Zellen (DN1) trägt nur CD44 auf ihrer Oberfläche. In der zweiten Entwicklungsstufe (DN2) kommt CD25 hinzu. In der dritten Entwicklungsstufe (DN3) ist dann fast nur noch CD25 auf der Zelloberfläche lokalisiert und der T-Zellrezeptor CD3 tritt

erstmalig auf. Schließlich verschwindet auch CD25 von der Zelloberfläche und die Korezeptoren CD4 und CD8 werden zusätzlich zu CD3 auf ein und derselben T-Zelle gebildet. Aus diesen CD4/CD8-doppelt-positiven T-Zellen entwickeln sich schließlich die zytotoxischen T-Zellen ($CD3^+CD8^+CD4^-$) und die T-Helferzellen ($CD3^+CD4^+CD8^-$). Der Vergleich von Wildtyp- und LIMP-1-defizienten Thymozyten zeigte, dass die ersten beiden T-Zell-Entwicklungsstufen DN1 und DN2 signifikant in LIMP-1^{-/-}-Tieren im Vergleich zum Wildtyp reduziert waren (s. Tab. 4.2). Dies hatte aber keinen Einfluss auf die weitere Entwicklung LIMP-1-defizienter T-Zellen, wie aus den vergleichbaren prozentualen Anteilen der reiferen Thymozytenpopulationen in der Wildtyp- und in der LIMP-1-defizienten Maus erkennbar war (s. Tab. 4.2).

Milz: Ca. 28 % aller Immunzellen in der Milz sind CD3-positive T-Zellen. Sie können in zytotoxische CD8-positive T-Zellen und in CD4-positive T-Helferzellen untergliedert werden (Janeway et al., 2002a; Janeway et al., 2002c). Ihr Anteil war mit jeweils ca. 10 % bzw. 17 % in den LIMP-1-defizienten Tieren fast identisch mit der Wildtyp-Situation (vergl. Abb. 4.12 A; s. Tab. 4.1). Um mögliche Anzeichen einer Autoimmunerkrankung in den LIMP-1-defizienten Mäusen zu detektieren, wurde der Aktivierungsstatus der T-Zellen mithilfe eines Antikörpers, der gegen das C-Typ Lektin CD69 gerichtet ist, bestimmt. CD69 wird auch als *Very Early Activation Antigen* bezeichnet und wird auf Thymozyten exprimiert, die einer positiven Selektion unterliegen, also aktiviert sind (Ziegler et al., 1994).

Weder die CD4⁺- noch die CD8⁺-T-Zellen der LIMP-1^{-/-}-Mäuse waren stärker aktiviert, wie die zum Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unveränderte CD69-Expression zeigte (vergl. Abb. 4.12 B; s. Tab. 4.1).

Die Reifung der CD45R/B220-positiven B-Zellen kann anhand der Oberflächenpräsenz der Immunglobuline IgM und IgD verfolgt werden. Während unreife B-Zellen in der Milz lediglich IgM-Moleküle exprimieren, tragen reife B-Zellen zusätzlich IgD auf ihrer Oberfläche (Janeway et al., 2002b). Es zeigte sich, dass sowohl der Anteil der reifen als auch der unreifen B-Zellen in der Milz LIMP-1-defizienter Tiere im Vergleich zu genetisch unveränderten Tieren mit ca. 43 % bzw. 6 % weitestgehend unverändert war (vergl. Abb. 4.12 C; s. Tab. 4.1).

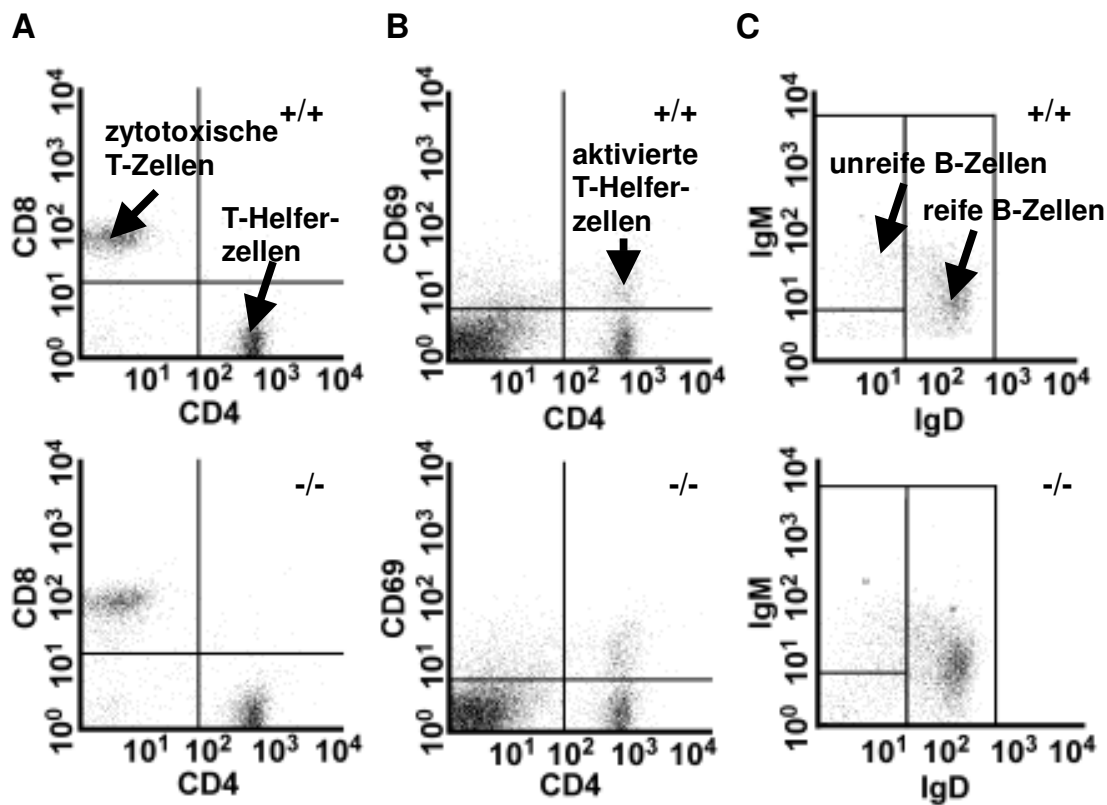


Abb. 4.12: Quantifizierung verschiedener Immunzellpopulationen in der Milz LIMP-1-defizienter Mäuse mittels FACS-Analyse. Die Milzen von jeweils fünf LIMP-1^{+/+} und LIMP-1^{-/-} zwölf Monate alten Geschwistern aus heterozygoten Verpaarungen wurden mithilfe entsprechender Antikörper mittels FACS analysiert. A) Lebende CD3-positive T-Zellen wurden auf das Vorhandensein der Korezeptoren CD4 und CD8 untersucht. B) Aktivierte T-Helferzellen konnten anhand der Expression C-Typ Lektins CD69 identifiziert werden. C) Die Reifung der CD45R/B220-positiven B-Zellen konnte anhand der Oberflächenpräsenz der Immunglobuline IgM und IgD verfolgt werden. (Es wurde auf in Teilabbildung C, auf CD45R/B220-positive Zellen „gegated“.) Die Abbildungen stellen jeweils ein repräsentatives Experiment aus fünf einzelnen Experimenten dar.

Lymphknoten: Lymphknoten sind periphere, sekundäre lymphatische Organe, in denen die adaptive Immunantwort in Gang gesetzt wird. Hier treffen zirkulierende Lymphozyten auf antigenpräsentierende Zellen und freie Antigene, die von Infektionsherden stammen und die in den lymphatischen Gefäßen transportiert werden (Janeway et al., 2002d). Wie in der Milz wurde der Anteil der einzelnen T-Zell-Subpopulationen (CD4⁺, CD8⁺) sowie deren Aktivierungsstatus untersucht und es konnten keine Unterschiede zwischen den LIMP-1^{+/+}- und den LIMP-1^{-/-}-Mäusen festgestellt werden (s. Tab. 4.1). Auch die Anzahl der B220/CD45R⁺IgM⁺ reifen B-Zellen, der CD49b-positiven NK-Zellen, der Makrophagen sowie der Granulozyten war in den LIMP-1^{-/-}-Mäusen unverändert (s. Tab. 4.1).

Peritoneum: Ebenfalls konnten im Peritoneum der LIMP-1-defizienten Mäuse keine drastischen Veränderungen innerhalb einer Immunzellpopulation festgestellt werden. Im Peritoneum wurde der Anteil der T-Zellen (CD3⁺), der B-Zellen (B220⁺), der Granulozyten (Gr1⁺), der eosinophilen Granulozyten (CD11b⁺F4/80⁺), der Makrophagen (CD11b⁺F4/80⁺) sowie der Mastzellen (CD117/C-kit⁺FcεRI⁺ST2⁺) untersucht (s. Tab. 4.1).

CD9, CD81: LIMP-1-defiziente Mäuse sind fertil und zeigen weder eine erhöhte Mortalität noch offensichtliche Krankheitssymptome. Dies ist unerwartet, wenn man die starke Expression von LIMP-1 in vielen verschiedenen Zelltypen bedenkt (Sincock et al., 1997). Eventuell übernehmen aber andere Tetraspanine wie CD81 oder CD9 zumindest teilweise die Aufgaben von LIMP-1. CD81 konnte z.B. auch als intrazelluläres Protein identifiziert werden (Schröder et al., 2007). Um ein mögliches kompensatorisches Verhalten anderer Tetraspanine zu identifizieren, wurde die Expression von CD9 und CD81 auf T-Zellen im Lymphknoten und B-Zellen in der Milz untersucht. Es zeigte sich, dass es im Vergleich zur Wildtyp-Situation weder mehr CD81-positive LIMP-1-defiziente B- oder T-Zellen gab, noch dass die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CD81 signifikant erhöht war (s. Tab. 4.3). Ebenfalls war in LIMP-1^{-/-}-Mäusen sowohl die Anzahl an CD9-positiven B-Lymphozyten unverändert, wie auch die MFI des CD9-Moleküls auf diesen Zellen. Dagegen war in LIMP-1-defizienten Mäusen die Anzahl der CD3CD9-doppelt-positiven Lymphozyten signifikant erhöht, wobei die MFI für CD9 ebenfalls zunahm. Dies könnte auf eine kompensatorische Funktion von CD9 bei der LIMP-1-Defizienz hinweisen.

| Zelltyp | % der Zellen mit dem angegebenen Phänotyp | | MFI (CD9 bzw. CD81) | |
|-------------------------------------|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | LIMP-1 ^{+/+} | LIMP-1 ^{-/-} | LIMP-1 ^{+/+} | LIMP-1 ^{-/-} |
| B220 ⁺ CD9 ⁺ | 18,4±2,1 | 17,8±2,7 | 115,7±22,2 | 132,1±23,3 |
| B220 ⁺ CD81 ⁺ | 19,1±3,5 | 17,9±2,3 | 44,0±5,1 | 45,9±7,8 |
| CD3 ⁺ CD9 ⁺ | 18,5±2,0 | 26,9±2,9* | 76,3±16,2 | 118,3±28,1 |
| CD3 ⁺ CD81 ⁺ | 2,7±0,6 | 3,3±0,6 | 44,4±9,0 | 42,8±7,1 |

Tab. 4.3: Expression der Tetraspanine CD9 und CD81 auf B- und T-Zellen. Es wird der Anteil der CD9- bzw. CD81-positiven Zellen an der Gesamtzellpopulation sowie die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für die Tetraspanine CD9 und CD81 auf B220-positiven Zellen in der Milz und CD3-positiven Zellen im Lymphknoten angegeben. (n = 10; angegeben sind jeweils der Mittelwert ± Standardabweichung; * = p < 0,05)

4.1.10 Untersuchung LIMP-1-defizienter Thrombozyten.

LIMP-1 kommt zusammen mit dem Zelladhäsionsprotein P-Selektin (auch CD62P genannt) in den multivesikulären Körperchen (*Multivesicular Bodies*, MVBs) und in den daraus entstehenden α -Granula der Blutplättchen vor, die nach der Aktivierung der Thrombozyten mit der Plasmamembran fusionieren, wodurch beide Proteine an die Zelloberfläche gelangen. Die Präsenz auf den Blutplättchen gab LIMP-1 weitere alternative Namen: Granulophysin oder 40kDa großes Blutplättchen-Glykoprotein (*platelet glycoprotein of 40kDa*; Pltgp40; Azorsa et al., 1991; Heijnen et al., 1998; Hildreth et al., 1991; Israels et al., 1992). LIMP-1 assoziiert auf der Thrombozyten-Oberfläche mit dem plättchenspezifischen Integrin- $\alpha^{\text{IIb}}/\beta_3$ -CD9-Komplex und indirekt über diesen Komplex mit dem Aktin-Zytoskelett (Israels et al., 2001). Ein monoklonaler Antikörper (D545), der gegen die zweite extrazelluläre Schleife des humanen LIMP-1-Proteins gerichtet war, verhinderte zwar nicht direkt die Adhäsion von Blutplättchen an immobilisiertes Fibrinogen, Kollagen, Laminin oder Fibronectin, aber er beeinträchtigte die Ausbreitung der Thrombozyten auf einem Fibrinogen-Untergrund (Israels et al., 2001; Israels und McMillan-Ward, 2004).

Die Spreizung der Blutplättchen wird begleitet von einer Reorganisation des fibrillären F-Aktins, einer intrazellulären Umverteilung des Proteins Vinculin in die fokalen Adhäsionskontakte und einer starken Phosphorylierung an Tyrosinresten verschiedener Substrate, z.B. der fokalen Adhäsionskinase. Alle diese Veränderungen wurden von dem monoklonalen LIMP-1-Antikörper D545 inhibiert, was auf eine Rolle von LIMP-1 bei der Integrin- $\alpha^{\text{IIb}}/\beta_3$ -abhängigen Reorganisation des Zytoskeletts hinweisen könnte (Israels und McMillan-Ward, 2004).

Um die Bedeutung von LIMP-1 für die Funktion der Blutplättchen zu untersuchen, wurden in Kooperation mit Bernhard Nieswandt und Irina Pleines (Rudolf-Virchow-Zentrum, Würzburg, D) verschiedene Experimente durchgeführt. Zunächst wurde die Konzentration der Blutplättchen über ihre Gestalt im Vorwärts- bzw. Seitwärtsstreulicht mittels FACS-Analyse im Blut von LIMP-1-defizienten Mäusen und entsprechenden Kontrolltieren bestimmt. Es zeigte sich, dass ihre Anzahl unverändert war (s. Abb. 4.13 A).

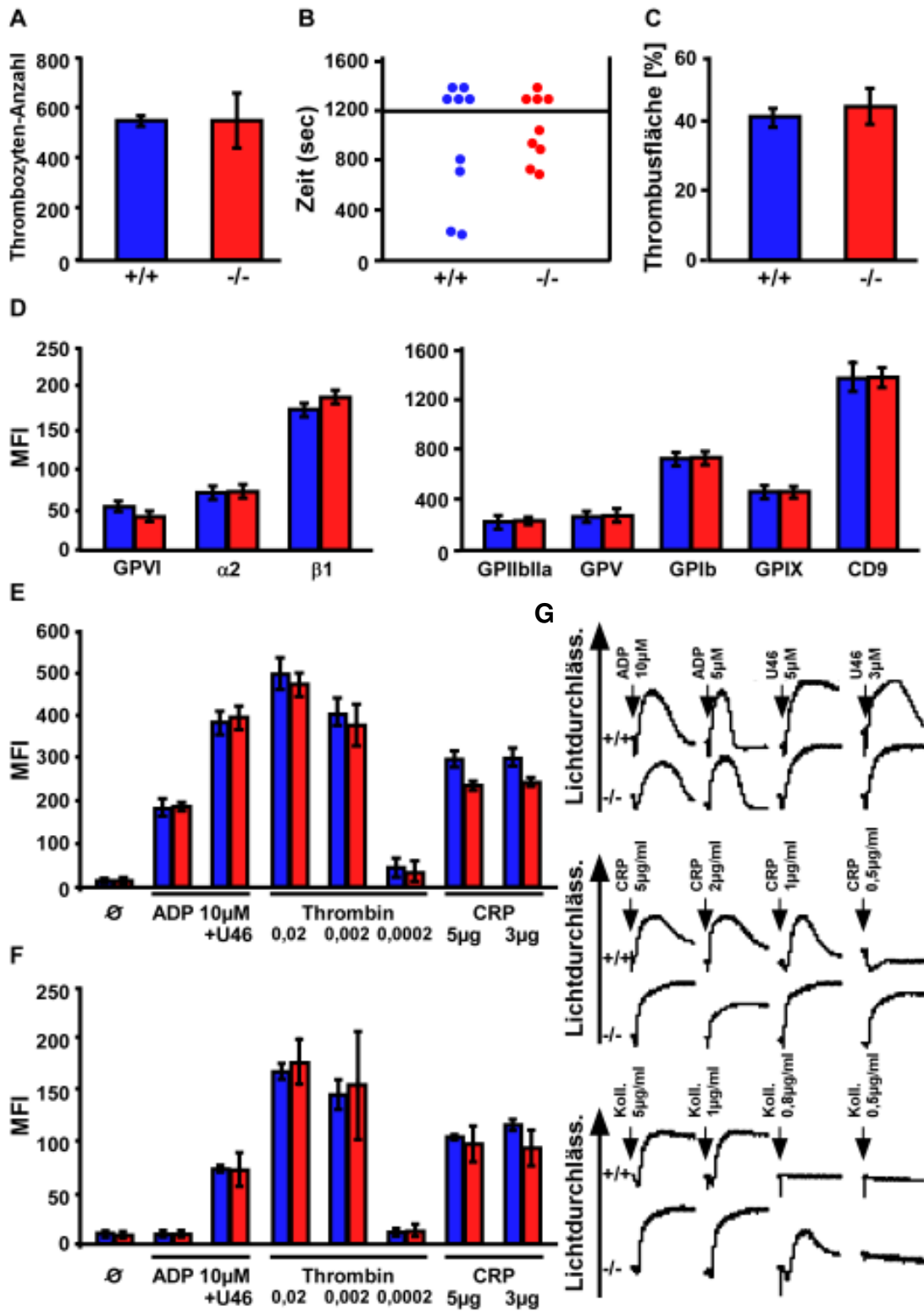


Abb. 4.13: Analyse der Thrombozyten von LIMP-1-defizienten Mäusen A) LIMP-1-defiziente Mäuse besaßen eine normale Anzahl an Thrombozyten, die anhand ihrer Eigenschaften im Vorwärts- bzw. Seitwärtsstreulicht in der FACS-Analyse identifiziert wurden. (n = 9) B) Die Blutungsdauer aus der Schwanzspitze war bei LIMP-1^{-/-}-Tieren identisch zu Kontrolltieren. Jeder Punkt repräsentiert ein einzelnes Experiment. (n = 9) C) LIMP-1 war nicht für die Adhäsion von Thrombozyten an Kollagen unter hohen Scherstressbedingungen essentiell. D) Verschiedene Glykoproteine wurden in vergleichbaren Mengen auf der Oberfläche von LIMP-1^{-/-}- sowie von LIMP-1^{+/+}-Blutplättchen exprimiert, wie eine FACS-Analyse ergab. (n = 15) E, F) Heparin-freies Mausblut wurde jeweils 2 min mit den angegebenen Konzentrationen an ADP ($\pm 1 \mu\text{M}$ U46619), Thrombin oder dem *Collagen-related Peptide* (CRP) inkubiert und anschließend gegen aktiviertes $\alpha^{\text{IIb}}/\beta_3$ -Integrin (E) oder P-Selektin (F) gefärbt und im FACS-Gerät analysiert. Dabei wurde auf die Thrombozyten anhand ihrer Eigenschaften im Vorwärts- bzw. Seitwärtsstreulicht „gated“. G) Heparinisiertes Plättchen-reiches Plasma (PRP) von Wildtyp- und LIMP-1-defizienten Mäusen wurde mit den angegebenen Konzentrationen ADP, U46619 (U46), CRP oder Kollagen stimuliert und die Lichtdurchlässigkeit wurde mit einem Standard-Aggregometer verfolgt. Es sind jeweils repräsentative Ergebnisse für jeden Genotyp gezeigt. (n = 3) (A, C – F: die Fehlerbalken geben jeweils die Standardabweichung an)

Die physiologische Aufgabe der Thrombozyten besteht in dem Verschließen von blutenden Wunden. Um zu überprüfen, ob eine LIMP-1-Defizienz *in vivo* einen Effekt auf die Funktion der Blutplättchen hat, wurden LIMP-1^{+/+}- und LIMP-1^{-/-}-Mäusen die äußersten 3 mm Schwanzspitze abgeschnitten und verfolgt, wie lange die Mäuse aus dieser Wunde heraus bluteten. Dabei erwies sich die Blutungsdauer als nahezu identisch zwischen Wildtyp- und LIMP-1-defizienten Tieren (s. Abb. 4.13 B). LIMP-1 scheint folglich unter diesen experimentellen Bedingungen kein essenzieller Faktor für die Hämostase *in vivo* zu sein. Eventuell übernehmen andere Proteine die Funktion von LIMP-1 in der *ko*-Situation. Die Menge des Plättchen-Tetraspanins CD9 war aber unverändert in LIMP-1^{-/-}-Thrombozyten (s. unten). Ebenfalls könnten andere blutungsstillende Mechanismen wie die Gefäßkontraktion oder das Fibrinogensystem in den LIMP-1^{-/-}-Tieren eine größere Rolle spielen.

Um eine mögliche Fehlfunktion in den Thrombozyten selbst zu entdecken, unabhängig von anderen Systemen der Hämostase, wurde mit einem sogenannten *Flow-Chamber-Assay*, also einer Flusskammer, die Adhäsionsfähigkeit der Blutplättchen in einer definierteren Situation untersucht. Dazu wurde Blut über einen Kollagen-beschichteten Objektträger perfundiert und die Thrombusbildung mit dem Mikroskop verfolgt. Die Adhäsionsfähigkeit der Thrombozyten wurde durch die von Thromben bedeckte Fläche widerspiegelt. Dabei konnte weder unter geringen (150sec^{-1} , Daten nicht gezeigt) noch unter hohen (1000sec^{-1}) Scherstressbedingungen ein Unterschied zwischen LIMP-1^{+/+}- und LIMP-1^{-/-}-Thrombozyten festgestellt werden (s. Abb. 4.13 C).

Thrombozyten weisen eine Anzahl charakteristischer Proteine auf ihrer Oberfläche auf wie die Glykoproteine GP1b, GPV, und GPIX, die zusammen den hoch affinen von-Willebrand-Faktor (vWF)-Rezeptor ausbilden (Dong et al., 1997), den Kollagenrezeptor GPVI (Gibbins et al., 1997), die Integrine $\alpha 2$ und $\beta 1$ sowie das Tetraspanin CD9. Alle diese Proteine spielen eine Rolle bei der Aktivierung bzw. Adhäsion von Thrombozyten und wurden deswegen mittels FACS-Analyse untersucht. Dabei wurden die Thrombozyten anhand ihrer spezifischen Eigenschaften im Vorwärts- bzw. Seitwärtsstreulicht definiert. Es zeigte sich, dass keines der untersuchten Proteine vermehrt oder vermindert auf LIMP-1-defizienten Blutplättchen exprimiert wurde (s. Abb. 4.13 D).

Die Aktivierung von Blutplättchen kann anhand der Konformationsänderung des α^{IIb}/β_3 -Integrin-Dimers oder der Translokation des Zelladhäsionsmoleküls P-Selektin zur Thrombozyten-Oberfläche im FACS verfolgt werden (Andrews und Berndt, 2004). Dazu wurden Blutplättchen mit verschiedenen Agonisten aktiviert: ADP, dem stabilen Thromboxan A₂ Analog U46619 (U46), Thrombin, Kollagen oder dem GPVI-spezifischen Agonisten *Collagen-related Peptide* (CRP) (vergl. Nieswandt et al., 2007). Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Wildtyp- und der LIMP-1-defizienten Maus (s. Abb. 4.13 E, F).

Die Aggregation der Thrombozyten als Antwort auf die zuvor beschriebenen Agonisten kann ebenfalls in einem Aggregometer gemessen werden. Hier wird Plättchen-reiches Plasma (PRP) mit entsprechenden Agonisten versetzt und die Aggregation kann anhand der zunehmenden Lichtdurchlässigkeit verfolgt werden, die aus der Verklumpung und der damit verbundenen Kompaktierung der Thrombozyten resultiert. Hier zeigten sich die LIMP-1-defizienten Blutplättchen in Vergleich zu Wildtyp-Thrombozyten als Antwort auf geringe Konzentrationen an CRP (0,5 $\mu\text{g/ml}$) oder Kollagen (0,8 $\mu\text{g/ml}$) leicht hyperreaktiv (s. Abb. 4.13 G). Eine Beeinträchtigung ihrer Funktion konnte auf jeden Fall nicht beobachtet werden. Die Bedeutung dieser Hyperreaktivität ist unklar, zumal sie sich nicht in den anderen Experimenten zeigte (*Flow-Chamber*, Thrombozyten-Aktivierung, Blutungsdauer). Bis jetzt konnte keine erhöhte Neigung zu Thrombosen in den LIMP-1-defizienten Mäusen beobachtet werden.

4.1.11 Histologische Untersuchung der LIMP-1^{-/-}-Maus

Nachdem bei der Untersuchung der Leukozyten und Thrombozyten der LIMP-1-defizienten Maus keine Auffälligkeiten beobachtet werden konnten, wurden vier ca. 14 Monate alte LIMP-1^{-/-}-Mäuse und entsprechende Kontrolltiere in Zusammenarbeit mit Renate Lüllmann-Rauch

(Anatomisches Institut, Universität Kiel, Kiel, D) histologisch untersucht. Dazu wurden aus mit 6 %-iger Glutaraldehyd-Lösung perfundierten Mäusen Leber, Niere, Pankreas, Milz, Magen, Harnblase, Herz, Lunge, Rückenmark, Großhirn (*Cerebrum*), Kleinhirn, Haut sowie Augen entnommen. Die Organe wurden in einem Gemisch aus Araldit und Duodecenylnbernsteinsäureanhydrid eingebettet und für Übersichtsaufnahmen in 1 µm dicke Scheibchen geschnitten, die mit Toluidinblau gefärbt wurden.

Fast alle untersuchten Organe wiesen trotz des hohen Alters der LIMP-1-defizienten Mäuse keinerlei histologische Abnormalitäten auf, wie in Abbildung 4.14 exemplarisch für das Kleinhirn, die Leber, die Milz und die Lunge dargestellt ist.

4.1.12 Histologische Untersuchung der Niere der LIMP-1^{-/-}-Maus

Auch die Niere der LIMP-1-defizienten Mäuse wurde histologisch untersucht und die meisten Zellpopulationen sahen unverändert aus. Es konnten aber in den LIMP-1^{-/-}-Hauptzellen des Sammelrohres, insbesondere im äußeren Mark, dunkle Einschlusskörperchen beobachtet werden, die in den Kontrollnieren nicht auftraten (s. Abb. 4.15).

Eine genauere elektronenmikroskopische Betrachtung dieser Einschlüsse ergab, dass es sich bei diesen Strukturen um membranbegrenzte Organellen mit Ansammlungen von lamellärem Material handelte. Die Einschlüsse ähnelten entfernt denen in der Niere von Mäusen, die defizient für die lysosomale saure Phosphatase waren (Saftig et al., 1997).

Im Sammelrohr der Niere kommen zwei Zelltypen vor: die Hauptzellen, die eine wichtige Bedeutung für die Harnkonzentrierung haben, sowie die Schaltzellen, deren Aufgabe in der Regulation des Säure-Base-Haushaltes besteht (Wall, 2005). Die Sammelrohre an sich sind durch *Tight junctions* nahezu impermeabel für Wasser. Die Hauptzellen exprimieren aber die Wasserporen-Proteine Aquaporin (AQP) 2 und 3. Während AQP-3 permanent in der basolateralen Membran lokalisiert ist, wird AQP-2 zunächst in intrazellulären Vesikeln dicht unter der apikalen Membran gelagert. Bei Wassermangel kommt es zur Ausschüttung des antidiuretischen Hormons (ADH, Adiuretin, Vasopressin) aus dem Hypophysenhinterlappen, das an den Vasopressin-Typ-2-Rezeptor in der basolateralen Membran der Hauptzellen bindet (Sasaki und Noda, 2007). Es kommt zu einer Fusion der AQP-2-haltigen Vesikel mit der apikalen Membran, d.h. AQP-2 wird in die apikale Membran eingebaut und das Epithel wird für Wasser durchlässig.

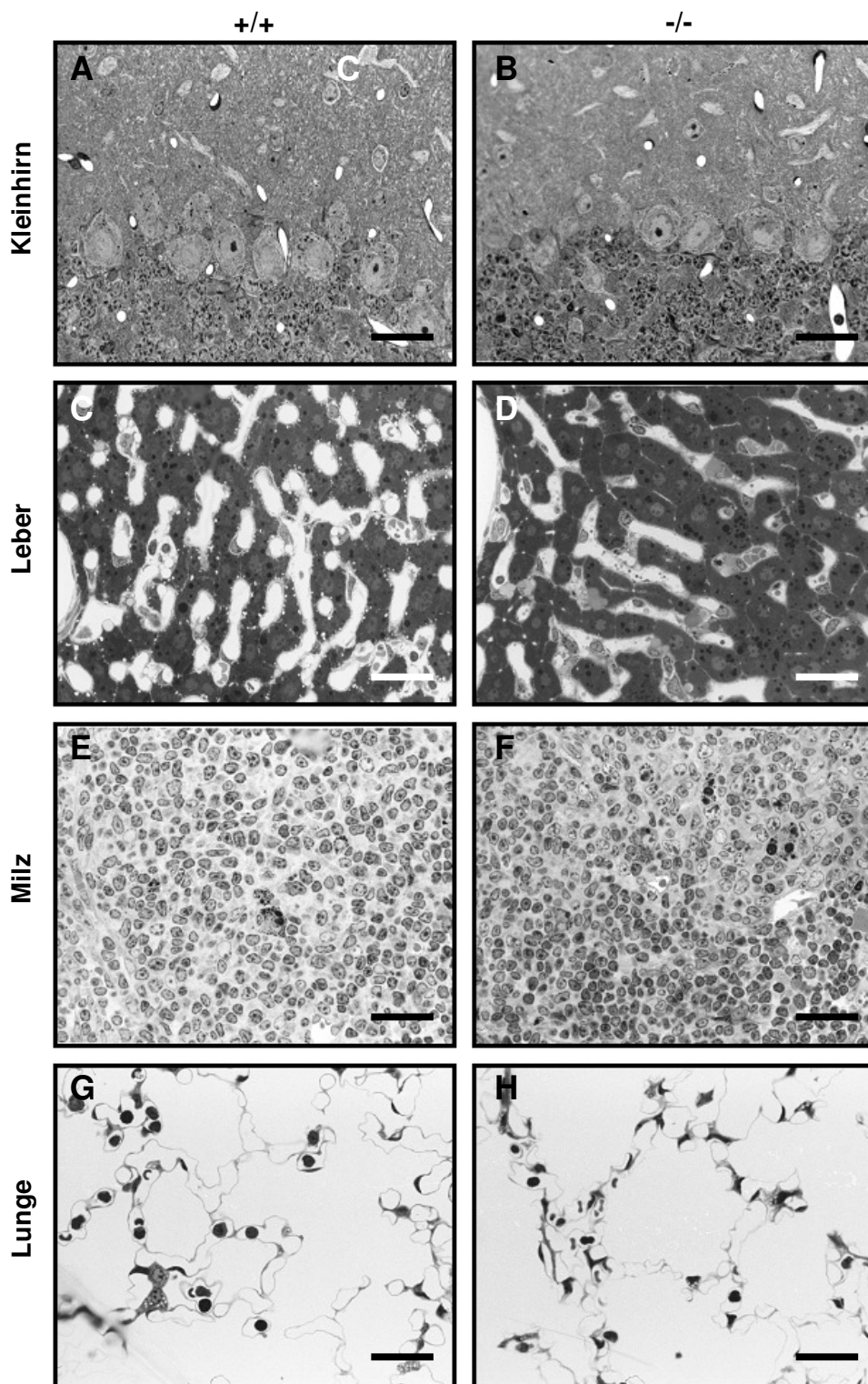


Abb. 4.14: Histologie einer 14 Monate alten LIMP-1^{-/-}-Maus. 1 µm-dicke Semi-Dünnschnitte von A, B) Kleinhirn, C, D) Leber, E, F) Milz und G, H) Lunge wurden mit Toluidinblau gefärbt. Es konnten keine Unterschiede zwischen der Wildtyp-Maus (A, C, E, G) und der LIMP-1-defizienten Maus (B, D, F, H) festgestellt werden. Maßstabsbalken: 25 µm

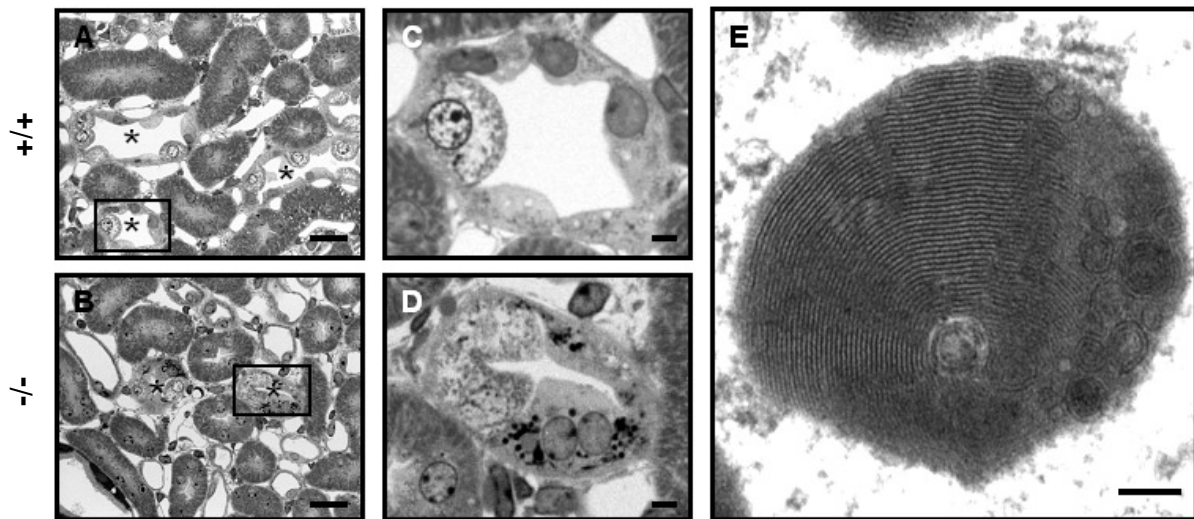


Abb. 4.15: Histologie der Niere einer 14 Monate alten LIMP-1^{-/-}-Maus. A-D) 1 µm-dicke Semi-Dünnschnitte der Niere von LIMP-1^{+/+}- und LIMP-1^{-/-}-Mäusen wurden mit Toluidinblau gefärbt. In der LIMP-1^{-/-}-Maus kam es zu einer Akkumulation membranbegrenzter, lamellärer Einschlüsse in den Hauptzellen des Sammelrohres (*) (B). Diese Einschlüsse fehlten im gleichaltrigen Wildtyp-Tier (A). C, D) Die ausgewählten Sammelrohre der Abbildungen A, B sind in einer stärkeren Vergrößerung dargestellt. E) Elektronenmikroskopische Untersuchung der membranbegrenzten Organellen lamellärem Inhalt. Maßstabsbalken: A, B: 25 µm, C, D: 5 µm, E: 0,1 µm.

4.1.13 Metabolische Untersuchung der LIMP-1^{-/-}-Maus

Um eine mögliche Fehlfunktion der Hauptzellen in Bezug auf die Wasserresorption zu detektieren, wurden LIMP-1^{-/-}-Mäuse in Kooperation mit Markus Bleich und Nina Himmerkus (Physiologisches Institut, Universität Kiel, Kiel, D) in metabolischen Käfigen untersucht (s. Abb. 4.16). Der Urin und Kot von LIMP-1-defizienten Mäusen sowie von in Alter und Geschlecht entsprechenden Kontrolltieren wurde über einen Zeitraum von 24 Std aufgefangen. Anschließend wurde den Mäusen final Blut und verschiedene Organe (Leber, Niere, Milz, Dünn- und Dickdarm, Lunge) entnommen.

Es zeigte sich, dass zwölf Monate alte LIMP-1-defiziente Weibchen im Vergleich zu entsprechenden Kontrolltieren, deutlich mehr Urin abgeben. Die Urinmenge ist mit ca. 130 µl/24 Std/g Körpergewicht annähernd dreimal so hoch wie bei genetisch unveränderten Mäusen (s. Abb. 4.17 A). Entsprechend ist auch die aufgenommene Wassermenge bei den LIMP-1^{-/-}-Mäusen größer (s. Abb. 4.17 B).

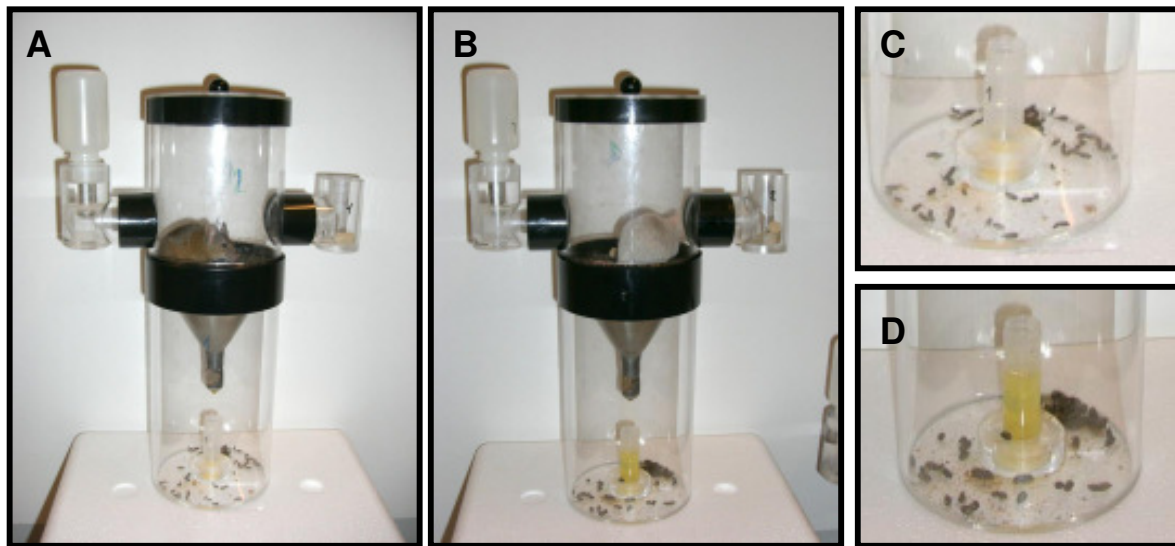


Abb. 4.16: Die Untersuchung von LIMP-1-defizienten Mäusen in metabolischen Käfigen. LIMP-1-defiziente Mäuse (B) gaben deutlich mehr Urin und größere Kotballen ab (D) als entsprechende Kontrolltiere (A, C).

Um einer möglichen Ursache der erhöhten Diurese über die Niere auf die Spur zu kommen, wurden sowohl die Osmolalität als auch der Gehalt an Natrium (Na^+), Kalium (K^+), Chlorid (Cl^-), Calcium (Ca^{2+}), Harnstoff, Creatinin und Glukose des Urins bestimmt. Die Osmolalität des Urins der LIMP-1^{-/-}-Mäuse lag mit 1298 mosm/kg signifikant unter der der Wildtyp-Tiere (2549 mosm/kg) (s. Abb. 4.17 C). Auch die Konzentration der Ionen Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Phosphat, Harnstoff, Creatinin sowie von Glukose waren deutlich reduziert (s. Tab. 4.4).

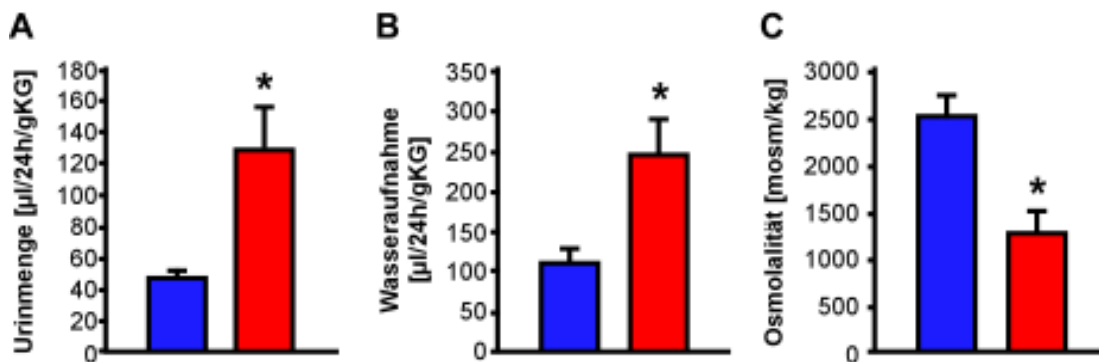


Abb. 4.17: Sowohl die abgegebene Urinmenge als auch die aufgenommene Wassermenge sind bei LIMP-1-defizienten Mäusen erhöht. Jeweils acht zwölf Monate alte Weibchen (LIMP-1^{+/+} blau, LIMP-1^{-/-} rot) wurden in metabolischen Käfigen untersucht. A) Es zeigte sich, dass die LIMP-1-defizienten Mäuse nahezu dreimal so viel Urin pro 24 Std und Gramm Körpergewicht (gKG) abgeben und B) auch entsprechend signifikant mehr trinken. C) Die Urinosmolalität in LIMP-1^{-/-}-Mäusen war halbiert im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. * = $p < 0,05$

| | LIMP-1 ^{+/+} | | LIMP-1 ^{-/-} | |
|------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| | Konzentration [mmol/Liter] | Gesamtabgabe μmol/24h/gKG | Konzentration [mmol/Liter] | Gesamtabgabe μmol/24h/gKG |
| Na⁺ | 168,13 ± 6,40 | 8,03 ± 0,80 | 89,38 ± 8,63* | 10,39 ± 1,53 |
| K⁺ | 423,54 ± 7,84 | 18,16 ± 3,34 | 199,71 ± 34,96* | 20,63 ± 1,97 |
| Cl⁻ | 168,13 ± 6,40 | 10,49 ± 1,25 | 89,38 ± 8,63* | 12,18 ± 1,65 |
| Ca²⁺ | 3,29 ± 0,46 | 0,15 ± 0,02 | 1,70 ± 0,39* | 0,16 ± 0,03 |
| Phosphat | 27,33 ± 5,51 | 1,25 ± 0,24 | 18,96 ± 4,94* | 1,54 ± 0,38 |
| Harnstoff | 1586,54 ± 59,28 | 449,17 ± 44,12 | 718,86 ± 123,24* | 445,25 ± 41,03 |
| Creatinin | 3,26 ± 0,30 | 0,14 ± 0,02 | 1,21 ± 0,33* | 0,14 ± 0,02 |
| Glukose | 38,13 ± 2,98 | 0,10 ± 0,01 | 27,50 ± 8,86 | 0,14 ± 0,02 |

Tab. 4.4: Urinanalyse LIMP-1-defizienter Mäuse. Die Konzentration der angegebenen Osmolyte wurde jeweils im 24-Std-Sammelurin bestimmt. (n = 8; angegeben sind jeweils der Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes; * = p < 0,05)

Multipliziert man die Konzentrationen der einzelnen Ionen im Urin mit der gesamten, innerhalb von 24 Std abgegebenen Urinmenge, erkennt man, dass die abgegebene Ionen-Gesamtmenge sich kaum zwischen den Wildtyp- und den LIMP-1-defizienten Tieren unterschied (s. Tab. 4.4). Ebenfalls waren die Konzentrationen der einzelnen Elektrolyte im Plasma bei beiden Genotypen ähnlich (Daten nicht gezeigt). Diese Befunde deuten auf eine erhöhte Wasserdiurese, nicht aber auf einen erhöhten Elektrolytverlust in LIMP-1^{-/-}-Mäusen hin.

| | | LIMP-1 ^{+/+} | LIMP-1 ^{-/-} |
|---------------|--|-----------------------|-----------------------|
| Plasma | pH | 7,38 ± 0,02 | 7,29 ± 0,01* |
| | pCO ₂ [mmHg] | 38,93 ± 2,20 | 56,29 ± 3,55* |
| | HCO ₃ ⁻ [mmol/l] | 22,45 ± 1,79 | 26,60 ± 1,94 |
| Urin | pH | 6,91 ± 0,11 | 7,24 ± 0,04* |
| | pCO ₂ [mmHg] | 34,69 ± 6,24 | 23,00 ± 1,73* |
| | HCO ₃ ⁻ [mmol/l] | 7,80 ± 2,40 | 11,49 ± 2,13 |

Tab. 4.5: Urin- und Blutgasanalyse LIMP-1-defizienter Mäuse. Der pH-Wert sowie der pCO₂ wurden in Plasma und 24-Std-Sammelurin bestimmt und die aktuelle Bikarbonat-Konzentration mittels Henderson-Hasselbalch-Gleichung errechnet. (n = 8; angegeben sind jeweils der Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes; * = p < 0,05)

Der pH-Wert im Plasma LIMP-1-defizienter Mäuse war im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant erniedrigt, d.h. die LIMP-1^{-/-}-Mäuse litten unter einer Azidose (s. Tab. 4.5). Dagegen war der CO₂-Partialdruck (pCO₂) im Blut signifikant erhöht, was für eine respiratorische Störung spricht. Gleichzeitig war der Urin von LIMP-1^{-/-}-Mäusen signifikant basischer und der pCO₂ deutlich reduziert. Dies deutet auf eine Einschränkung der renalen Säuresekretion hin. Man kann folglich von einer kombinierten respiratorisch-metabolischen Säure-Base-Störung in LIMP-1-defizienten Mäusen sprechen.

In den metabolischen Käfigen wurde des Weiteren beobachtet, dass die einzelnen Kotballen der LIMP-1-defizienten Mäuse größer und feuchter erschienen (s. Abb. 4.18 A). Dies führt zu der Hypothese, dass die LIMP-1^{-/-}-Mäuse auch ein Defizit bei der Wasserresorption im Darm haben könnten.

Um dies zu bestätigen, wurde das Gesamtgewicht des innerhalb von 24 Std ausgeschiedenen Kotes bestimmt, wobei sich zeigte, dass die LIMP-1^{-/-}-Mäuse ca. 50 % mehr Kot abgaben (s. Abb. 4.18 B). Der Kot der Mäuse wurde bis zum Erreichen der Gewichtskonstanz getrocknet. Dabei ergab sich, dass das Trockengewicht, also die Summe der festen Kotbestandteile, unverändert war (s. 4.18 C). Lediglich der Wasseranteil war im Kot der LIMP-1-defizienten Mäuse von 36 % auf 53 % erhöht (s. Abb. 4.18 D).

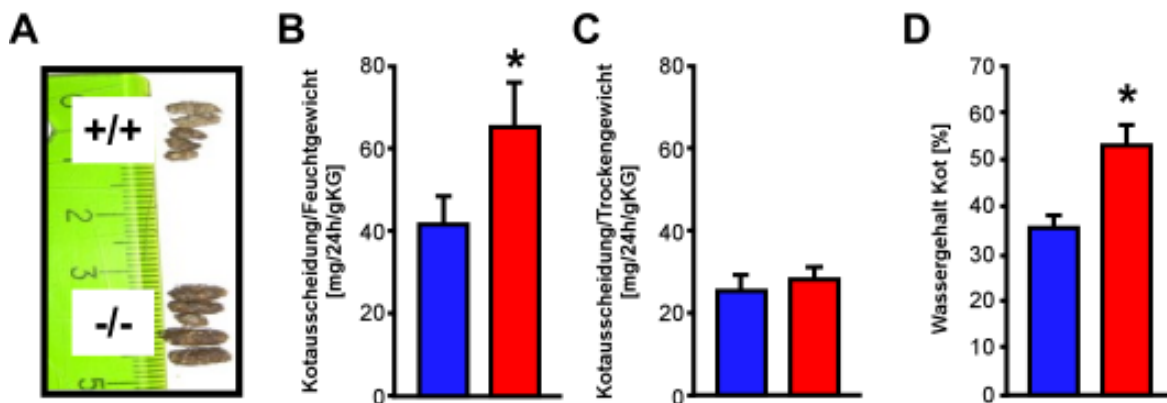


Abb. 4.18: Die Wasserabgabe ist auch über den Kot der LIMP-1-defizienten Mäuse erhöht. Jeweils acht zwölf Monate alte Weibchen (LIMP-1^{+/+} blau, LIMP-1^{-/-} rot) wurden in metabolischen Käfigen untersucht. A) Die einzelnen Kotballen der LIMP-1^{-/-}-Mäuse (unten) erschienen im Vergleich zu den Kontrolltieren größer und feuchter. B) Die Kotausscheidung der LIMP-1^{-/-}-Mäuse war insgesamt um ca. 50 % verstärkt. C) Dabei war das Trockengewicht unverändert. D) Der Wassergehalt im Kot der LIMP-1^{-/-}-Mäuse war jedoch signifikant höher. * = p < 0,05

4.1.14 Analyse der Aquaporin-2-Verteilung in LIMP-1-defizienten Sammelrohrhauptzellen

Wie in Abschnitt 4.1.13 beschrieben gaben zwölf Monate alte LIMP-1-defiziente Mäuse ca. dreimal so viel Urin ab wie entsprechende Kontrolltiere. Aufgrund der in Abschnitt 4.1.12 beschriebenen lamellären Einschlüsse in den Hauptzellen der Sammelrohre dieser Mäuse wurde vermutet, dass eine Fehlfunktion dieser Zellen die Ursache für die erhöhte Wasserabgabe über die Niere in diesen LIMP-1^{-/-}-Tieren sein könnte. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass in den Hauptzellen das Wasserporenprotein Aquaporin 2 (AQP-2) Vasopressin-abhängig in die apikale Membran eingelagert wird, was eine bedeutende Rolle für die Wasserresorption, insbesondere in einer Wassermangelsituation, hat (Sasaki und Noda, 2007). Duffield *et al.* haben 2003 eine Rolle für LIMP-1 im intrazellulären *Trafficking* der H⁺,K⁺-ATPase des Magens beschrieben. In ähnlicher Weise soll LIMP-1 mit der H⁺,K⁺-ATPase im Kolon interagieren und die Oberflächenexpression dieses Proteins kontrollieren (Codina *et al.*, 2005). In beiden Fällen handelt es sich um den regulierten Transfer eines Transportproteins aus intrazellulären Speichern an die Zelloberfläche und zurück, wie er auch zur Kontrolle der über AQP-2 erfolgenden Wasserresorption eingesetzt wird. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass LIMP-1 auch den intrazellulären Verkehr des AQP-2 zur apikalen Membran steuern könnte. Der Phänotyp der Wasserdiurese entstünde somit durch Fehlverteilung und mangelnder Einlagerung von AQP-2 in die luminale Membran.

Die Expression von AQP-2 wurde zunächst in Cryoschnitten der Niere untersucht (s. Abb. 4.19 A - L). Es zeigte sich, dass sowohl in den Wildtyp- als auch in den LIMP-1-defizienten Zellen AQP-2 in den Hauptzellen der Sammelrohre lokalisiert war und eine ähnliche intrazelluläre Verteilung aufwies. Aufgrund der relativ niedrigen Auflösung der Cryopräparate war es schwierig, eine Aussage darüber zu treffen, ob und wie viel des vorhandenen AQP-2 in intrazellulären Vesikeln oder an der apikalen Membran lokalisiert war.

Um die Auflösung zu erhöhen, wurden einzelne Sammelrohre isoliert und auf Deckgläschen kultiviert. Die Sammelrohre hefteten sich an die Deckgläschen an, Zellen wuchsen aus dem tubulären Verband aus und proliferierten als Zellrasen zirkulär um den Ursprungstubulus. Nach drei Tagen hatten sich so Höfe mit einem Durchmesser von ca. 30 Zellen gebildet. Die Zellen wurden für jeweils 20 min mit dem Vasopressin-Rezeptor-Blocker Satavaptan (10⁻⁸ M) oder mit 100 µU/ml Vasopressin (AVP = Arginin-Vasopressin) inkubiert. Anschließend wurden die Tubuli mit Paraformaldehyd fixiert und wie in Abschnitt 3.2.14.2 beschrieben immunozytochemisch untersucht. Wider Erwarten entsprach der Anteil an Hauptzellen auf den

Deckgläschen nicht den *in situ* Verhältnissen im Sammelrohr. Es fanden sich nur sehr wenige AQP-2-positive Hauptzellen (s. Abb. 4.19 M - P). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte darin liegen, dass Schaltzellen bevorzugt unter den gegebenen Zellkulturbedingungen proliferieren oder dass die Sammelrohrzellen in Kultur einem Dedifferenzierungsprozess unterliegen.

In den wenigen auswertbaren AQP-2-positiven Zellen war das Wasserporenprotein nach Behandlung mit Satavaptan in intrazellulären Vesikeln lokalisiert, während es nach Stimulation der Zellen mit Vasopressin an die Plasmamembran wanderte. Dies galt sowohl für die aus LIMP-1^{+/+}- als auch aus LIMP-1^{-/-}-Nieren isolierten Tubuli. Quantitative Aussagen über das Ausmaß der Translokation von AQP-2 waren nicht möglich, da wie bereits oben erwähnt nur sehr wenige potenzielle Sammelrohrhauptzellen beobachtet werden konnten.

Da in den kultivierten Sammelrohren nur sehr wenige Hauptzellen identifiziert werden konnten, wurde die immunozytochemische Färbung direkt an frisch isolierten Sammelrohren wiederholt. Hier lag der Anteil der AQP-2-positiven Hauptzellen mit über 50 % deutlich höher als in den kultivierten Sammelrohren (s. Abb. 4.19 Q - T). Die frisch isolierten Sammelrohre wurden analog zu den kultivierten Sammelrohren entweder mit Satavaptan oder AVP behandelt. In den frisch isolierten Sammelrohren war ebenfalls kein eindeutiger Unterschied zwischen den beiden Genotypen feststellbar, wobei sich die Beurteilung der luminalen Membranen aufgrund der tubulären Geometrie schwieriger gestaltete, als in den Zellen der Primärkultur.

Insgesamt konnten in den Sammelrohrhauptzellen der LIMP-1-defizienten Nieren keine Veränderungen in der Menge und in der intrazellulären Lokalisation des Wasserkanals AQP-2 festgestellt werden, die den erhöhten Wasserverlust über die Niere bei LIMP-1^{-/-}-Mäusen erklären könnten.

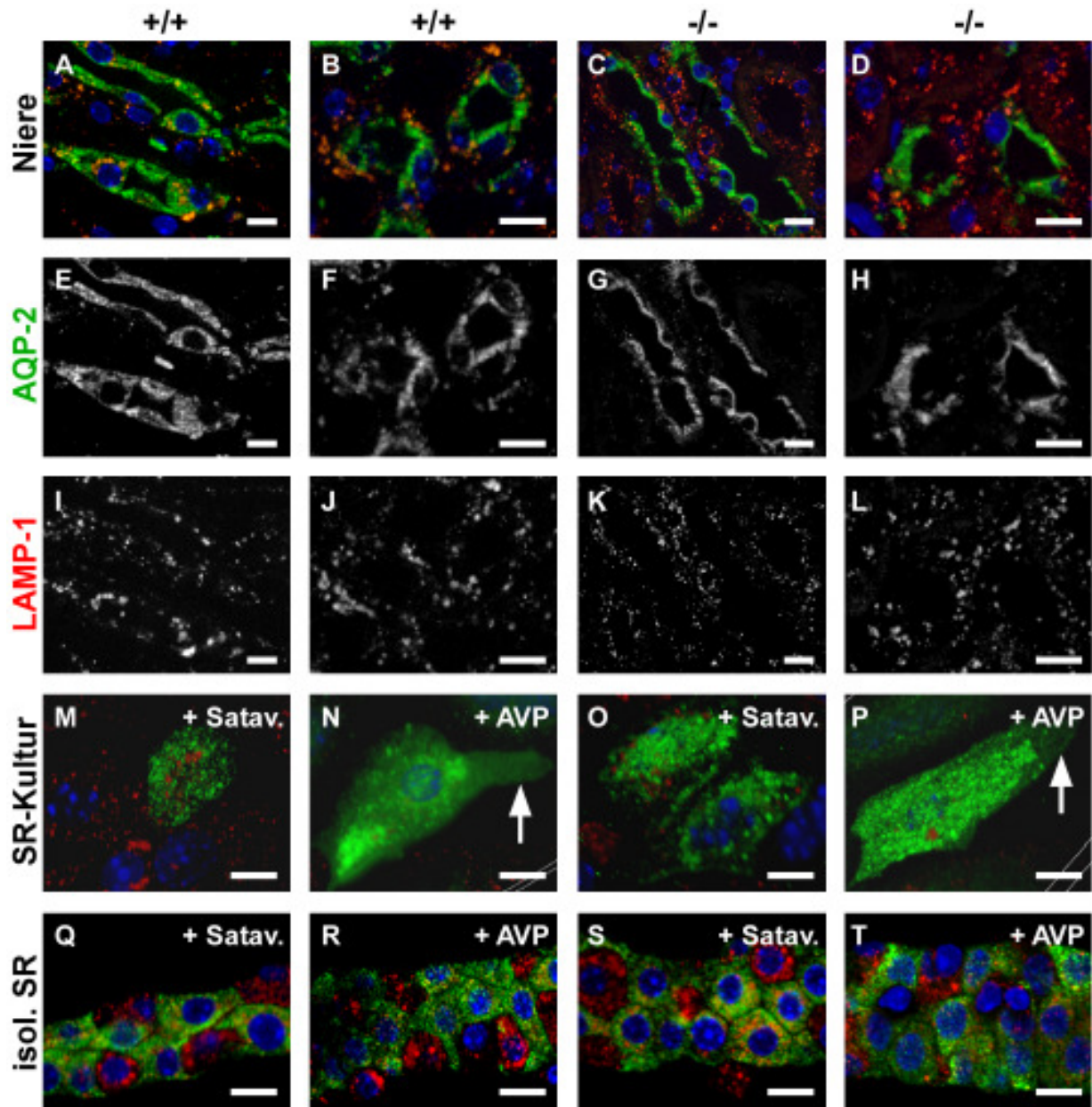


Abb. 4.19: Immunohistologische Untersuchung der intrazellulären Verteilung von AQP-2. A - L: Cryoschnitte einer LIMP-1^{+/+}- und einer LIMP-1^{-/-}- Niere wurden gegen AQP-2 (grün, E - H) und LAMP-1 (rot, I - L) gefärbt. Eine Überlagerung beider Färbungen ist in den Teilabbildungen A - D gezeigt. Maßstabsbalken: 10 μ m. M - P Isolierte Sammelrohre aus LIMP-1^{+/+}- und LIMP-1^{-/-}-Nieren wurden auf Deckgläschen in Kultur genommen und nach drei Tagen mit dem Vasopressin-Rezeptor-Blocker Satavaptan (Satav.) oder mit Vasopressin (AVP) behandelt. Die Zellen wurden gegen AQP-2 (grün) und LAMP-1 (rot) gefärbt. Nach Behandlung mit Vasopressin ist eine Verlagerung von AQP-2 aus intrazellulären Vesikeln in die Plasmamembran erkennbar (Pfeile). Maßstabsbalken: 5 μ m. Q - T: Isolierte LIMP-1^{+/+}- und LIMP-1^{-/-}-Sammelrohre wurden direkt mit Satavaptan oder Vasopressin behandelt, fixiert, und gegen AQP-2 (grün) und LAMP-1 (rot) gefärbt. Maßstabsbalken: 20 μ m. In allen farbigen Abbildungen sind die Zellkerne mit dem DNA-bindenden Farbstoff DAPI blau dargestellt.

4.2 Identifizierung von LIMP-2 als den intrazellulären Transporter der β -Glukocerebrosidase

Die häufigste lysosomale Speichererkrankung Morbus Gaucher wird durch Mutationen im Gen des lysosomalen Enzyms β -Glukocerebrosidase (β GC) hervorgerufen, das für die Degradierung von Glukosylceramid verantwortlich ist. Viele krankheitsauslösende Mutationen haben entweder einen direkten, negativen Effekt auf das aktive Zentrum des Enzyms oder sie führen zu einer Fehlfaltung des Proteins, wodurch es verstärkt degradiert wird. Bestimmte Mutationen verhindern auch den Transport der β -Glukocerebrosidase vom endoplasmatischen Reticulum (ER) zum Lysosom (Ron und Horowitz, 2005). Bis heute war unverständlich wie die β GC zum Lysosom transportiert wird. Aus Untersuchungen von Fibroblasten von *I-Cell-Disease*-Patienten, denen die Glukose-N-Acetyl(GlcNAc)-Phosphotransferase-Aktivität im Golgi-Apparat fehlt, war bekannt, dass die β GC Mannose-6-Phosphat-unabhängig zum Lysosom transportiert wird (Aerts et al., 1988; van Dongen et al., 1985; vergl. auch Abschnitt 1.3 und 1.7).

4.2.1 Der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-unabhängige Transport der β -Glukocerebrosidase zum Lysosom

Der Mannose-6-Phosphatrezeptor (MPR)-unabhängige Transport der β GC wurde zunächst in $MPR46^{-}/MPR300^{-}$ doppelt-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) immunocytochemisch untersucht. Es zeigte sich, dass die β GC sowohl in Wildtyp- als auch in den $MPR46^{-}/MPR300^{-}$ -MEF gleichermaßen lysosomal lokalisiert war, wie die Doppelfärbung mit dem lysosomalen Markerprotein LAMP-2 zeigte (s. Abb. 4.19). Die lysosomale Aspartatprotease Cathepsin D war dagegen in $MPR46^{-}/MPR300^{-}$ -Lysosomen dramatisch in ihrer Menge reduziert (s. Abb. 4.20).

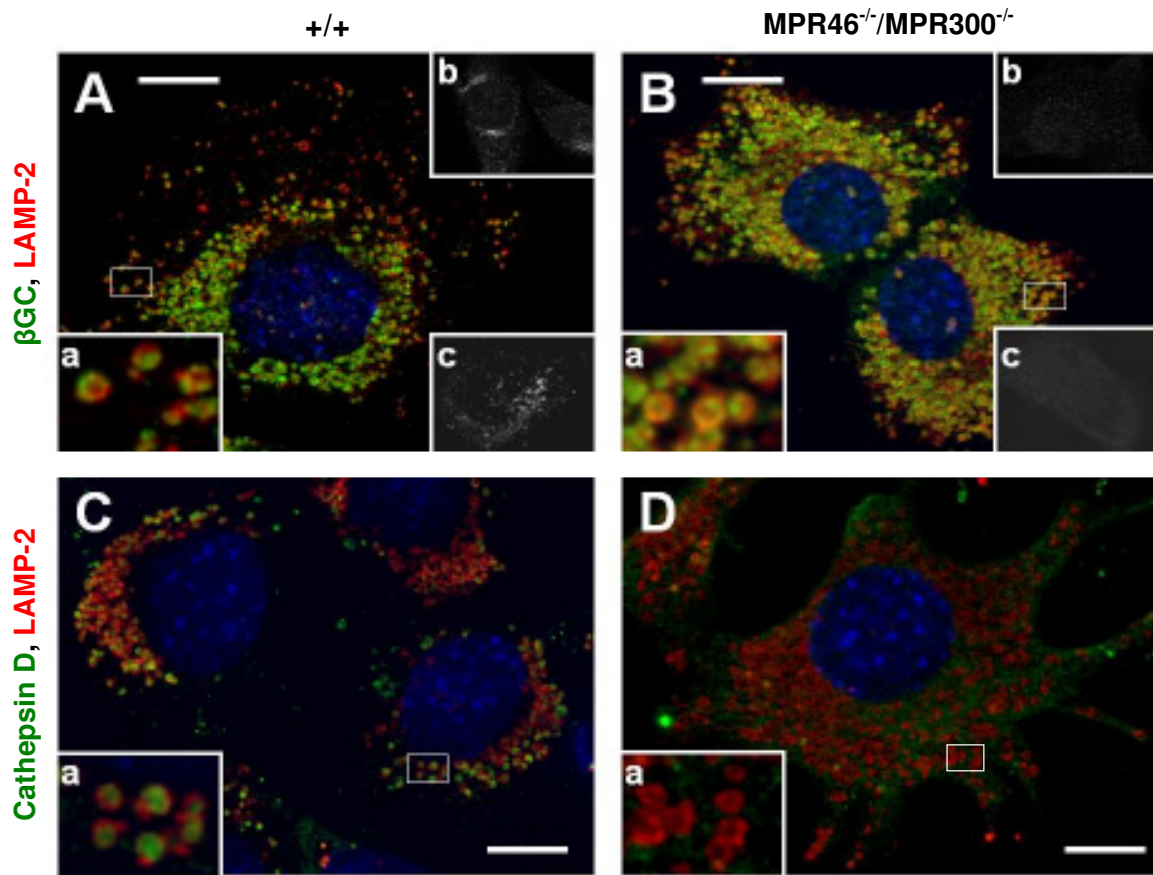


Abb. 4.20: Die β -Glukocerebrosidase wird im Gegensatz zu Cathepsin D Mannose-6-Phosphatrezeptor-unabhängig zum Lysosom transportiert. Mit dem großen SV-40-Antigen immortalisierte murine embryonale Fibroblasten (A, C wt; B, D $MPR46^{-/-}/MPR300^{-/-}$) wurden in 4 % PFA/PBS fixiert. Die Zellen wurden gegen LAMP-2 (rot) und die β GC (grün) (A, B), bzw. gegen LAMP-2 (rot) und Cathepsin D (grün) (C, D) gefärbt. Die Zellkerne sind durch DAPI blau dargestellt. Bei den Teilabbildungen handelt es sich um Vergrößerungen der markierten Bereiche (a) oder Immunfärbungen gegen MPR46 (b) oder MPR300 (c). Maßstabsbalken: 10 μ m

4.2.2 Die Expression der β -Glukocerebrosidase ist in LIMP-2-defizienten Geweben stark reduziert

Um den intrazellulären Transporter der β GC zu identifizieren, wurden affinitätschromatographische Studien durchgeführt. Diese deuteten auf LIMP-2 als einen möglichen Kandidaten für den bisher unidentifizierten Transporter der β GC hin (Reczek et al., 2007). In den affinitätschromatographischen Untersuchungen wurde Mauseleberextrakt über eine Säule gegeben, an die kovalent rekombinante β GC gekoppelt war. Auf diese Weise konnte LIMP-2 als spezifischer Bindungspartner der β GC identifiziert werden, während der in der Plasmamembran befindliche Multiligandenrezeptor CD36 (Febbraio und Silverstein, 2007) trotz 34 %-iger

Sequenzidentität keine Interaktion mit der β GC einging (Reczek et al., 2007). Ziel der folgenden Experimente war es, die Bedeutung der Interaktion von LIMP-2 und der β GC *in vivo* zu untersuchen.

Dazu wurde zunächst die Enzymaktivität der β GC in verschiedenen Gewebelysaten LIMP-2-defizienter Mäuse gemessen. Interessanterweise war die Aktivität des Enzyms in allen untersuchten Organen (Leber, Milz, Gehirn und Lunge) um bis zu 80 % im Vergleich zu genetisch unveränderten Organen reduziert (s. Abb. 4.21 A). Die Aktivität des ebenfalls lysosomalen Enzyms α -Galaktosidase, das *in vitro* nicht an die luminal Domäne von LIMP-2 gebunden hat (Reczek et al., 2007), war dagegen weitestgehend unverändert, in der Milz der LIMP-2-defizienten Tiere sogar erhöht (s. Abb. 4.21 B).

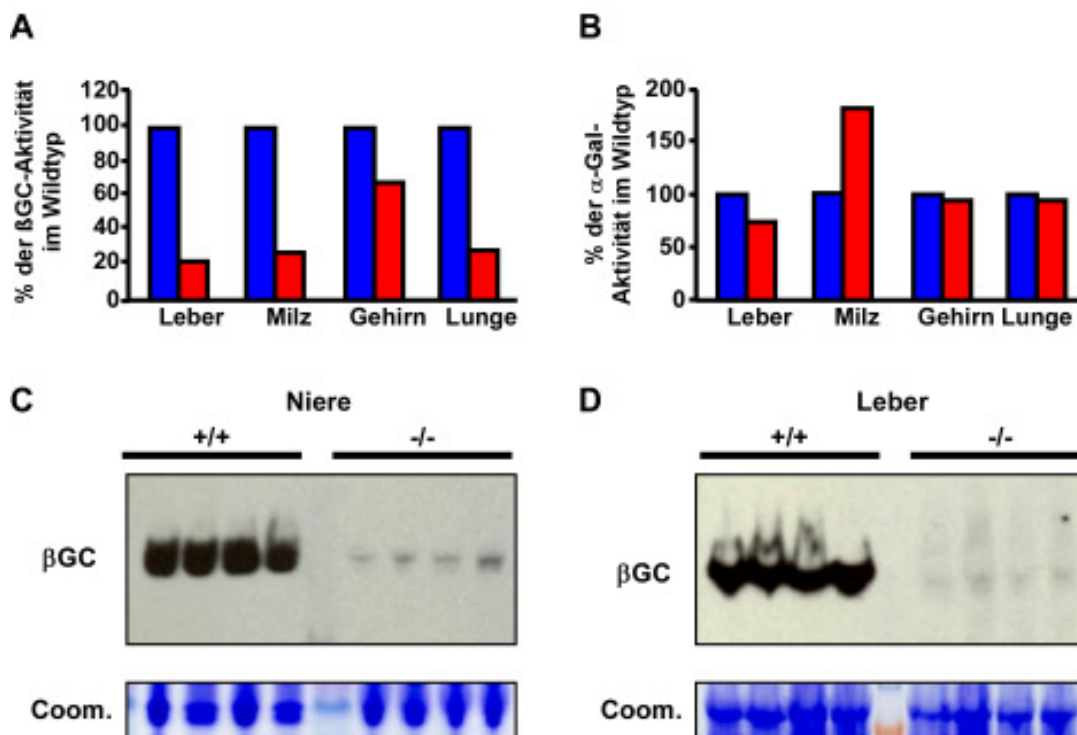


Abb. 4.21: Starke Reduktion der enzymatischen Aktivität und Expression der β -Glukocerebrosidase in LIMP-2-defizienten Mausgeweben. A, B) Es wurde die enzymatische Aktivität der β GC (A) und des ebenfalls lysosomalen Enzyms α -Galaktosidase (α -Gal) (B) in Leber, Milz, Gehirn und Lunge von jeweils vier LIMP-2^{+/+}- (blau) und LIMP-2^{-/-}-Mäusen (rot) bestimmt. C, D) Immunoblot-Analyse von Niere (C) und Leber (D) von jeweils vier LIMP-2^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu entsprechenden Kontrolltieren. Die Expression der β GC war in LIMP-2-defizienten Tieren drastisch reduziert. Ein Coomassie-Gel (unten) diente zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung. Die Experimente wurden in Kooperation mit David Reczek und Heather Hughes (Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA) durchgeführt.

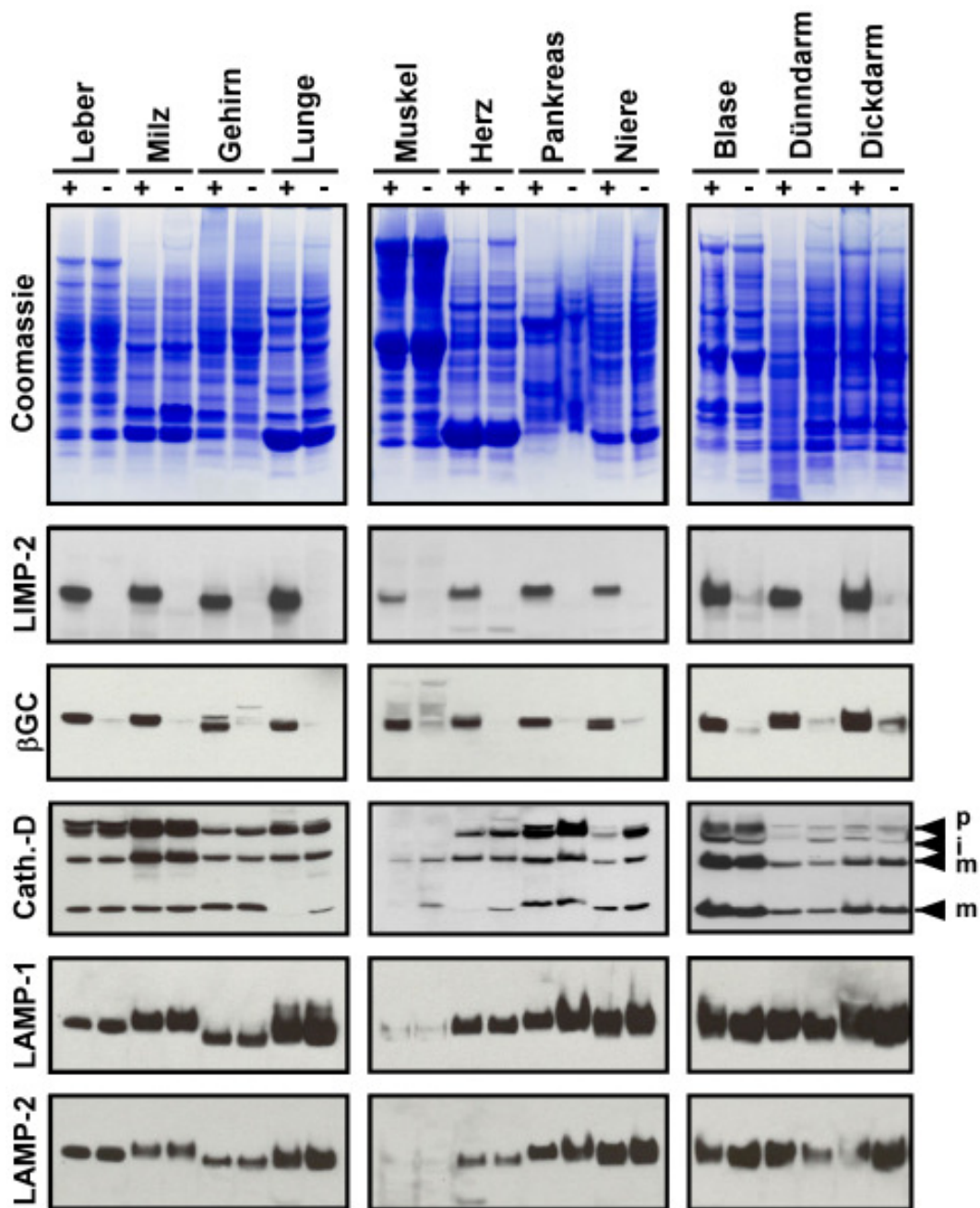


Abb. 4.22: Immunoblot verschiedener Mausgewebe, der den Effekt der LIMP-2-Defizienz auf die Proteinspiegel von LIMP-2, βGC, Cathepsin D, LAMP-1 und LAMP-2 zeigt. Mit jeweils identischen Proteinmengen beladene SDS-Gele wurden auf eine PVDF-Membran geblottet und auf die Expression der einzelnen Proteine hin untersucht. Ein Coomassie-gefärbtes Gel diente als Ladekontrolle (oben). LIMP-2 ist in allen LIMP-2^{-/-}-Geweben abwesend. Entsprechend dazu ist auch die βGC in allen Geweben drastisch reduziert, während sämtliche Reifungsstadien der lysosomalen Protease Cathepsin D sowie die lysosomalen Membranproteine LAMP-1 und LAMP-2 in unveränderter Menge zu finden sind. p, i und m bezeichnen die Vorläufer- und die intermediäre Form sowie die reifen Formen von Cathepsin D. +: LIMP-2^{+/+}, -: LIMP-2^{-/-}. Die Experimente wurden in Kooperation mit David Reczek (Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA) durchgeführt.

Die Immunoblot-Analysen sowohl von Nieren-, als auch Leberhomogenisaten ergaben, dass die Proteinspiegel der ca. 65 kDa großen β GC in den *ko*-Tieren konstant um ca. 90 % im Vergleich zu Wildtyp-Tieren vermindert waren (s. Abb. 4.21 C, D). Diese Reduktion der absoluten Menge an β GC ist höchstwahrscheinlich der Grund für die zuvor beschriebene drastisch reduzierte β GC-Enzymaktivität in den einzelnen LIMP-2-defizienten Geweben. Die Abnahme der β GC-Menge spiegelte sich in allen untersuchten Geweben wieder (s. Abb. 4.22). Unverändert waren hingegen, die Mengen der 53 kDa großen pro-, der 47 kDa großen inter-mediären sowie der 31 kDa bzw. 14 kDa großen reifen Formen der lysosomalen Aspartat-protease Cathepsin D (Gieselmann et al., 1983; Pain et al., 1985). Ebenfalls war die Expression der lysosomalen Membranproteine LAMP-1 und LAMP-2 in LIMP-2^{-/-}-Geweben unbeeinflusst.

4.2.3 Immunohistochemische Untersuchung LIMP-2-defizienter Gewebe

Die Ergebnisse der Immunoblot-Analysen, die eine deutliche Reduktion der β GC-Expression in LIMP-2-defizienten Geweben zeigten, wurden durch immunohistochemische Untersuchungen

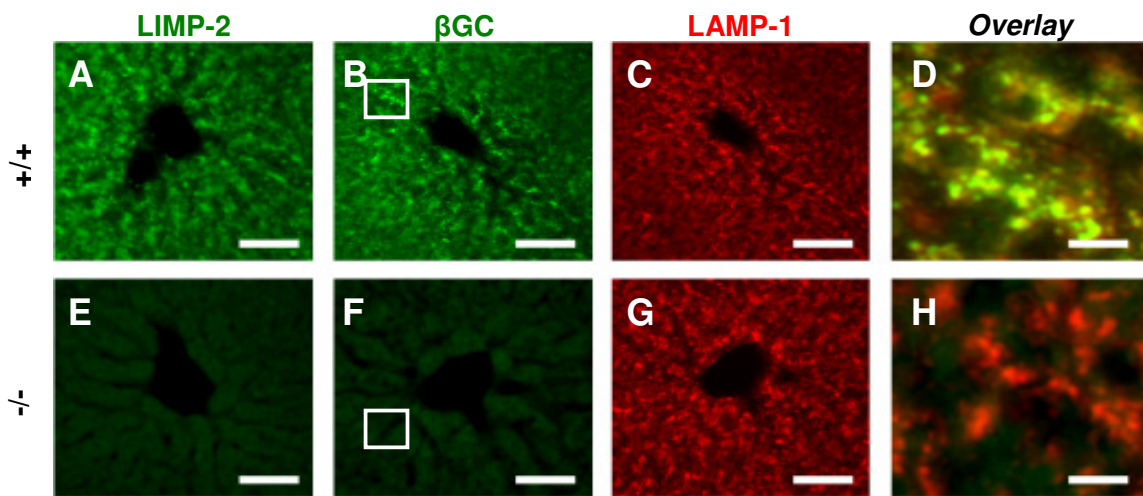


Abb. 4.23: Immunohistologische Untersuchung der Leber von einer drei Monate alten Kontroll- (A - D) und einer gleichaltrigen LIMP-2^{-/-}-Maus (E - F). Die LIMP-2-Färbung (A, E) zeigt die komplette Abwesenheit des LIMP-2-Proteins in der Leber der LIMP-2^{-/-}-Maus. Ebenfalls ist in der LIMP-2^{-/-}-Leber (F) im Vergleich zur Wildtyp-Situation (B) jegliche Immunreaktivität für die β GC verloren, während die LAMP-1-Färbung (C, G) deutliche Signale sowohl bei der LIMP-2^{+/+}- als auch bei der LIMP-2^{-/-}-Maus ergibt. Die Teilabbildungen D und H zeigen in der Überlagerung vergrößert die Ausschnitte aus den Teilabbildungen B bzw. F. Es ist in der Wildtyp-Leber deutlich die lysosomale Lokalisation der β GC erkennbar, die in der *ko*-Situation gänzlich fehlt. Maßstabsbalken: A - C, E - G: 250 μ m, D, H: 50 μ m. Die Experimente wurden in Kooperation mit Judith Blanz (Universität Kiel, Kiel, D) durchgeführt.

bestätigt. Cryoschnitte der Milz (Daten nicht gezeigt) und der Leber (s. Abb. 4.23) wurden gegen LIMP-2, die β GC oder LAMP-1 gefärbt. In Wildtyp-Geweben kolokalisierten die β GC und LIMP-2 mit LAMP-1 im Lysosom, während in den LIMP-2^{-/-}-Geweben weder eine LIMP-2- noch eine β GC-Färbung sichtbar war. In den LIMP-2^{-/-}-Geweben war aber die intrazelluläre Verteilung von LAMP-1 unverändert, was dafür spricht, dass die Integrität des lysosomalen Kompartimentes auch in LIMP2^{-/-}-Zellen erhalten blieb.

4.2.4 Ansammlung von Glukosylceramid in LIMP-2-defizienten Geweben

Die Reduktion der β GC-Enzymaktivität korreliert mit einem Anstieg der Menge des β GC-Substrates Glukosylceramid (GlkCer) in den Organen von Gaucher-Patienten (Brady et al., 1965; Nilsson et al., 1985; Nilsson und Svennerholm, 1982). Die massenspektroskopische Analyse der GlkCer-Menge in LIMP-2^{-/-}-Geweben zeigte eine fast zweifache Zunahme der GlkCer-Spiegel in Leber und Lunge im Vergleich zu Kontrollgeweben (s. Tab. 4.6).

| Gewebe | LIMP-2-Genotyp | GlkCer (ng/mg Gewebe) | Standard- abweichung |
|--------|----------------|--------------------------|-------------------------|
| Leber | +/+ | 47 | 11 |
| | -/- | 88 | 21 |
| Lunge | +/+ | 53 | 11 |
| | -/- | 98 | 11 |

Tab. 4.6: Analyse und Vergleich der Glukosylceramid (GlkCer)-Spiegel in Geweben von LIMP-2^{+/+}- und LIMP-2^{-/-}-Mäusen. Leber- und Lungenproben (jeweils n = 4) wurden mithilfe einer auf Massenspektroskopie beruhenden Methode auf die enthaltenen GlkCer-Mengen hin untersucht. Die Experimente wurden in Kooperation mit David Reczek (Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA) durchgeführt.

4.2.5 Untersuchung LIMP-2-defizienter Zellen

Um die molekularen Mechanismen genauer charakterisieren zu können, die zur Reduktion sowohl der Aktivität als auch der Menge der β -Glukocerebrosidase in LIMP-2-defizienten Geweben führten, wurden murine embryonale Fibroblasten (MEF) untersucht, die von LIMP-2-defizienten Embryonen oder entsprechenden Kontrollembryonen abstammten. Es zeigte sich, dass die enzymatische Aktivität auch in LIMP-2^{-/-}-Zellen im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert war (s. Abb. 4.24). Dieses Ergebnis lässt sich wiederum auf eine um über 60 % reduzierte Menge der β GC in Lysaten der LIMP-2^{-/-}-Zellen zurückzuführen, wie Immunoblot-Analysen offenbarten (s. Abb. 4.25).

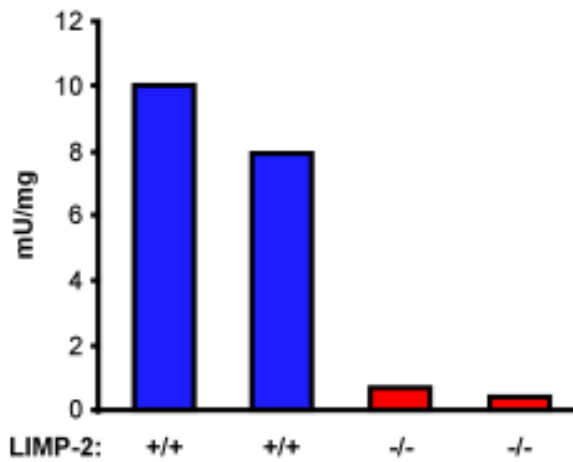
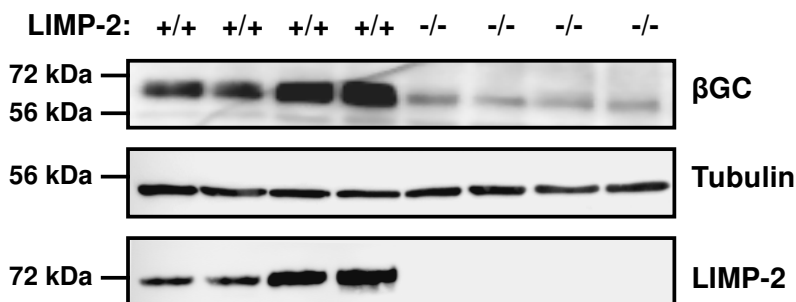


Abb. 4.24: Starke Reduktion der spezifischen enzymatischen Aktivität der β -Glukocerebrosidase in LIMP-2-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten. Es wurde die enzymatische Aktivität der β -Glukocerebrosidase in jeweils zwei voneinander unabhängigen MEF-Zelllinien untersucht.

In Doppelfärbung mit dem lysosomalen Membranprotein LAMP-2 war die β GC in immunocytochemischen Untersuchungen in LIMP2^{+/+}-Zellen als ein mit der lysosomalen Membran assoziiertes Protein erkennbar, während sie in den LIMP2^{-/-}-MEF kaum nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 4.26). In einigen LIMP-2^{-/-}-MEF war noch eine sehr geringe Menge β GC detektierbar, die aber kaum lysosomal lokalisiert war. Ebenfalls war eine deutliche Reduktion der Expression der β GC in HeLa-Zellen beobachtbar, in denen LIMP-2 mittels siRNA ausgeschaltet wurde (s. Abb. 4.27).

A



B

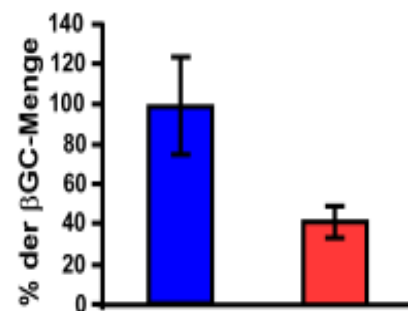


Abb. 4.25: Die β -Glukocerebrosidase ist in LIMP-2-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten stark in ihrer Menge reduziert. A) Es wurde Zelllysat von jeweils vier voneinander unabhängigen LIMP-2^{+/+}- bzw. LIMP-2^{-/-}-MEF-Zelllinien verwendet. Eine Ladekontrolle (Tubulin) ist in der mittleren Zeile dargestellt. Die Abwesenheit des LIMP-2-Proteins in den LIMP-2^{-/-}-MEF zeigt die untere Zeile. B) Quantifizierung der in Teilabbildung A nachgewiesenen β GC. Die Menge der β GC in den LIMP-2^{+/+}-MEF wurde gleich 100 % gesetzt und die Menge in den LIMP-2^{-/-}-Zellen relativ dazu ausgedrückt. (LIMP-2^{+/+}: blau, LIMP-2^{-/-}: rot ; die Fehlerbalken geben jeweils die Standardabweichung an)

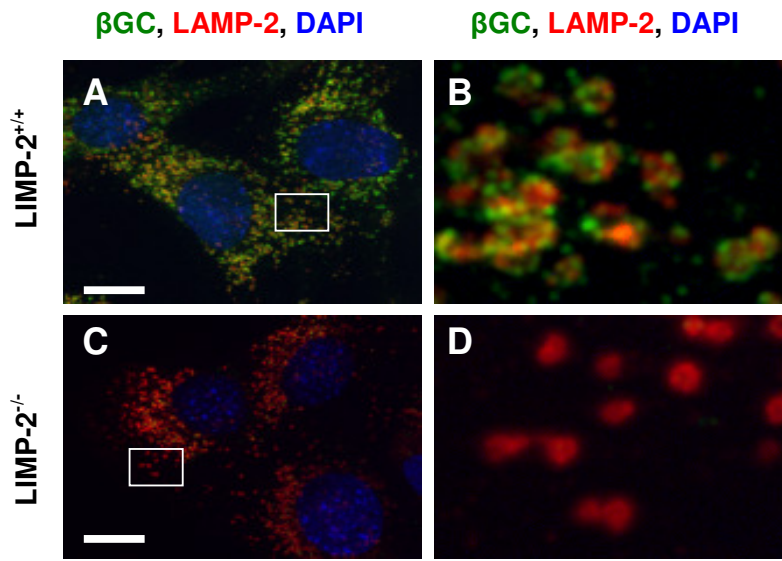


Abb. 4.26: Die β -Glukocerebrosidase ist in LIMP-2-defizienten Lysosomen stark in ihrer Menge reduziert. MEF (A, B LIMP-2^{+/+}; C, D LIMP-2^{-/-}) wurden in 4 % PFA/PBS fixiert. Die Zellen wurden gegen LAMP-2 (rot) und gegen die β GC (grün) gefärbt. Die Zellkerne sind durch DAPI blau dargestellt. Die Abbildungen B und D stellen Vergrößerungen der Ausschnitte aus den Abbildungen A und C dar. Maßstabsbalken: 10 μ m

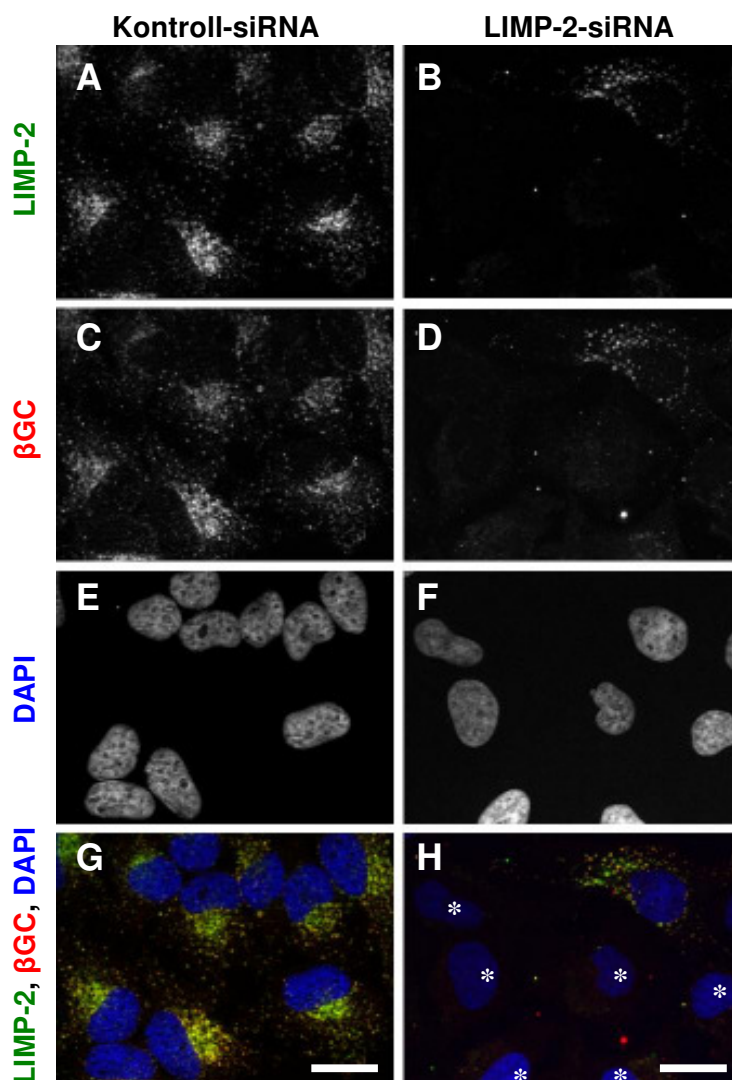


Abb. 4.27: Die Reduktion der endogenen LIMP-2-Expression durch siRNA in HeLa-Zellen führt ebenfalls zu verringerten Mengen des β -Glukocerebrosidase-Proteins. HeLa-Zellen wurden entweder mit unspezifischer Kontroll-siRNA (A, C, E, G) oder mit siRNA behandelt, die spezifisch für humanes LIMP-2 ist (B, D, F, H). Drei Tage nach Transfektion wurde die endogene LIMP-2- (A, B) und β GC-Expression (C, D) untersucht. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (E, F). Überlagerte Bilder sind in G und H gezeigt. Zellen, in denen LIMP-2 erfolgreich herunterreguliert wurde, sind mit einem * markiert. Diese Zellen zeigen ebenfalls eine verminderte Immunreaktivität gegenüber der β GC. Maßstabsbalken: 10 μ m

4.2.6 Die β GC-mRNA ist in LIMP-2-defizienten Zellen und Geweben unverändert

Mithilfe einer *Northern-Blot*-Analyse wurden die mRNA-Mengen und damit die Transkription des β GC-Gens in LIMP-2-defizienten Zellen und Geweben untersucht. Dazu wurde Gesamt-RNA aus Niere und Leber von LIMP-2^{+/+}- und LIMP-2^{-/-}-Mäusen bzw. -MEF gewonnen. Es zeigte sich, dass die LIMP-2-defizienten Proben vergleichbare Mengen an β GC-mRNA enthielten (s. Abb. 4.28). Die Abnahme der intrazellulären β GC-Menge in diesen Geweben/Zellen ist wahrscheinlich auf post-transkriptionelle Ereignisse zurückzuführen.

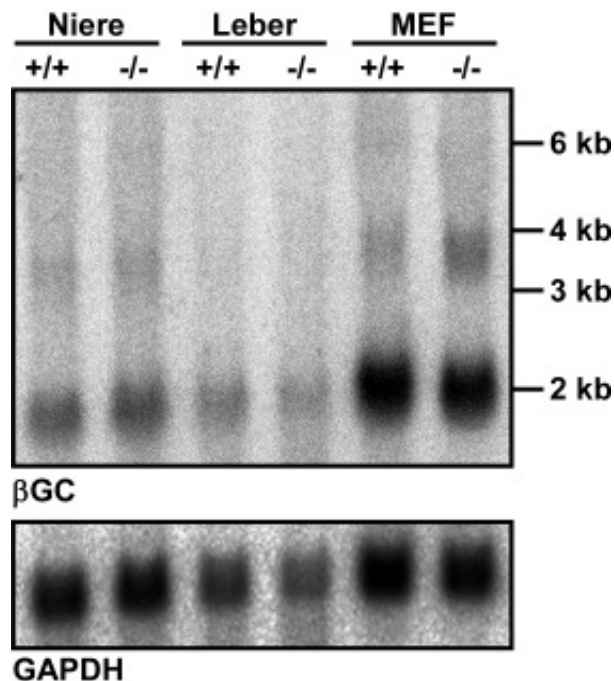


Abb. 4.28: Northern-Blot-Analyse der β GC-mRNA aus Nieren-, Leber- und MEF-Proben.

Jeweils gleiche Mengen Gesamt-RNA von LIMP-2^{+/+}- bzw. LIMP-2^{-/-}-Proben wurden aufgetragen. Als Ladekontrolle sind im unteren Teil der Abbildung GAPDH-mRNA-Spiegel gezeigt. Die Experimente wurden in Kooperation mit Michael Schwake (Biochemisches Institut, Universität Kiel, Kiel, D) durchgeführt.

4.2.7 In LIMP-2-defizienten Zellen überexprimierte β -Glukocerebrosidase wird im endoplasmatischen Reticulum zurückgehalten

In LIMP-2-defizienten Zellen ist die Expression der β GC deutlich reduziert und das Protein kaum noch immunochemisch detektierbar (vergl. Abb. 4.25 - 4.27). Um zu klären, wo in der Zelle die Immunoreaktivität der β GC verloren geht, wurden LIMP-2^{+/+}- bzw. LIMP-2^{-/-}-MEF mit humaner bzw. muriner β GC transient transfiziert und immunozytochemisch untersucht. Die überexprimierte β GC war in Kontrollzellen wie die endogene β GC lysosomal lokalisiert, wie eine Kofärbung mit dem lysosomalen Membranprotein LAMP-2 zeigte (s. Abb. 4.29). In LIMP-2^{-/-}-Zellen erreichte die β GC dagegen nicht mehr das lysosomale Kompartiment, sondern wurde im ER zurückgehalten, wie eine Doppelfärbung mit einem Antikörper zeigte, der gegen das Retentionsmotiv KDEL von im ER befindlichen Proteinen gerichtet war (s. Abb. 4.29).

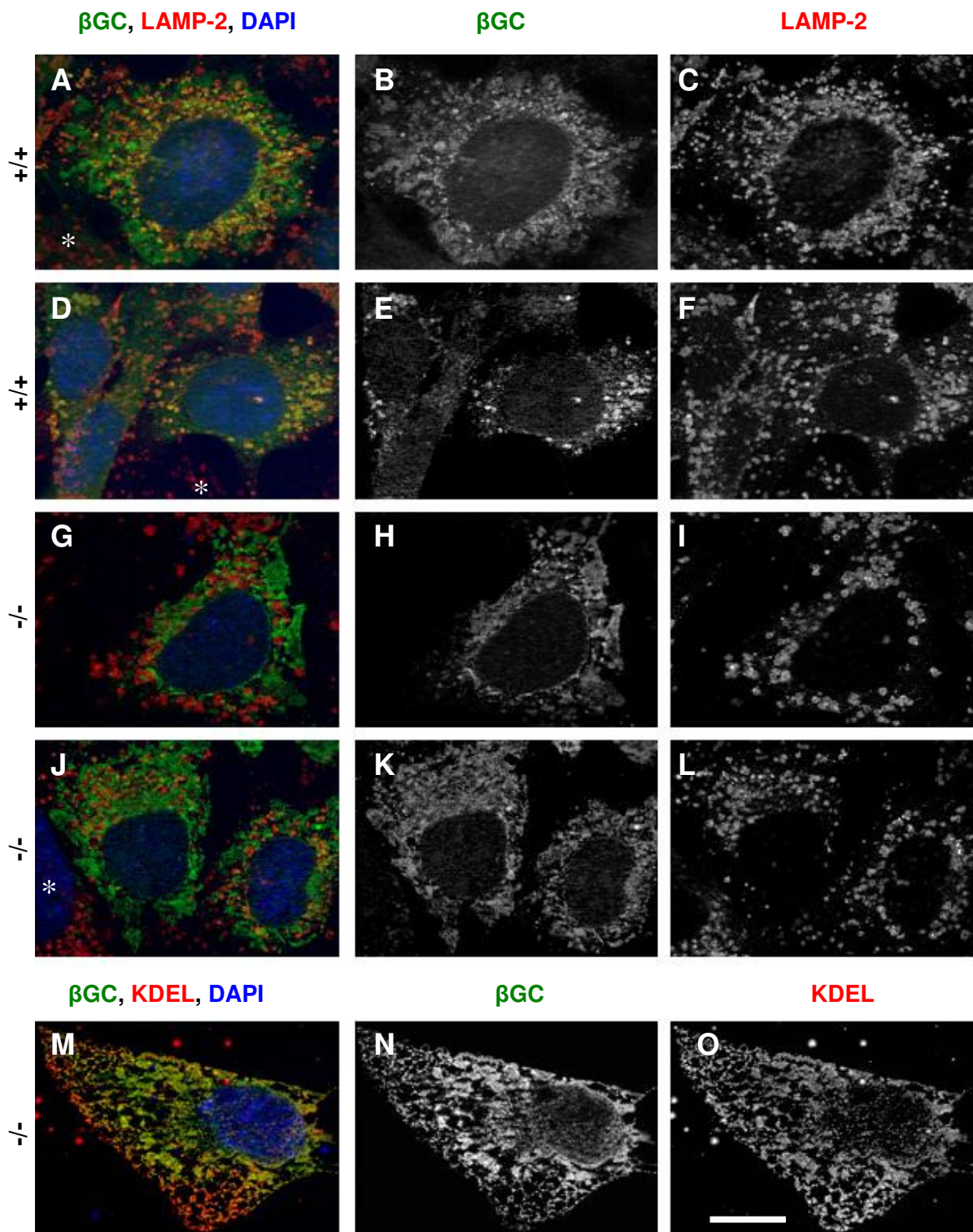


Abb. 4.29: Überexprimierte β -Glukocerebrosidase ist in Abwesenheit von LIMP-2 im endoplasmatischen Reticulum lokalisiert. Wildtyp (A - F) und LIMP-2 defiziente murine embryonale Fibroblasten (G - O) wurden mit β GC-Expressionskonstrukten transfiziert und gegen β GC und LAMP-2 gefärbt (A - L). Die überlagerten Bilder (linke Spalte) zeigen, dass sich die überexprimierte β GC (mittlere Spalte) in Wildtyp-Zellen zu großen Teilen im

lysosomalen Kompartiment befindet, wie die Kolorisierung mit dem lysosomalen Markerprotein LAMP-2 zeigt. In LIMP-2-defizienten Zellen ist dagegen keine Überlappung der Signale der β GC und von LAMP-2 festzustellen. Stattdessen wird die überexprimierte β GC im ER zurückgehalten, wie die Kofärbung mit einem Antikörper gegen das ER-Retentionsmotiv „KDEL“ zeigt (M - O). Es ist eine deutliche Übereinstimmung der beiden Signale feststellbar. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt. Nicht transfizierte Zellen sind mit einem * markiert. Maßstabsbalken: 10 μ m. Eine gleich starke Transfektionseffizienz wurde mittels Immunoblot-Analyse (s. Abb. 4.30) nachgewiesen.

Um zu überprüfen, dass die lysosomale Lokalisation der β GC in LIMP-2^{+/+}-MEF und die ER-Lokalisation der β GC in LIMP-2^{-/-}-MEF kein Artefakt unterschiedlicher Expressionsstärke waren, wurde parallel eine Immunoblot-Analyse der für Abb. 4.29 verwendeten Zellen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass beide Zellpopulationen nach transients Transfektion gleich stark die h β GC exprimierten (s. Abb. 4.30).

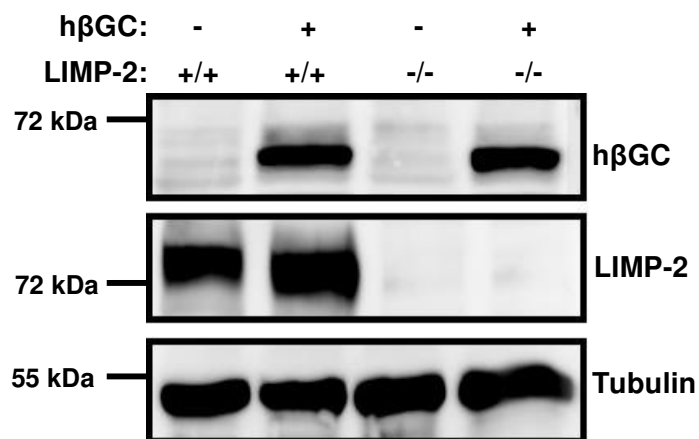


Abb. 4.30: Die Immunoblot-Analyse zeigte eine vergleichbare Transfektionseffizienz der Wildtyp- und der LIMP-2-defizienten Zellen (obere Reihe). Die LIMP-2-Defizienz wurden in der mittleren Zeile bestätigt. Eine Ladekontrolle (Tubulin) wird in der unteren Reihe dargestellt.

4.2.8 Die Retransfektion LIMP-2-defizienter Zellen mit LIMP-2 führt zu gesteigerter lysosomaler Expression der β -Glukocerebrosidase

Im den vorangegangenen Abschnitten konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von LIMP-2 zu einer stark reduzierten Expression und abnormalen intrazellulären Verteilung der β GC führte. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt direkt auf die Abwesenheit von LIMP-2 zurückzuführen ist, wurden LIMP-2^{-/-}-MEF mit einem Fusionsprotein aus murinem LIMP-2 und einem C-terminal lokalisierten myc-Epitop retransfiziert (s. Abb. 4.31). Transfizierte Zellen konnten durch Antikörper identifiziert werden, die sich gegen das myc-Epitop richten. In 95 % der mit LIMP-2 transfizierten Zellen erreichte die β GC-Expression wieder das Niveau von LIMP-2^{+/+}-Zellen (vergl. Abb. 4.26) und das Enzym kolokalisierte mit LIMP-2 und dem lysosomalen Markerprotein LAMP-1.

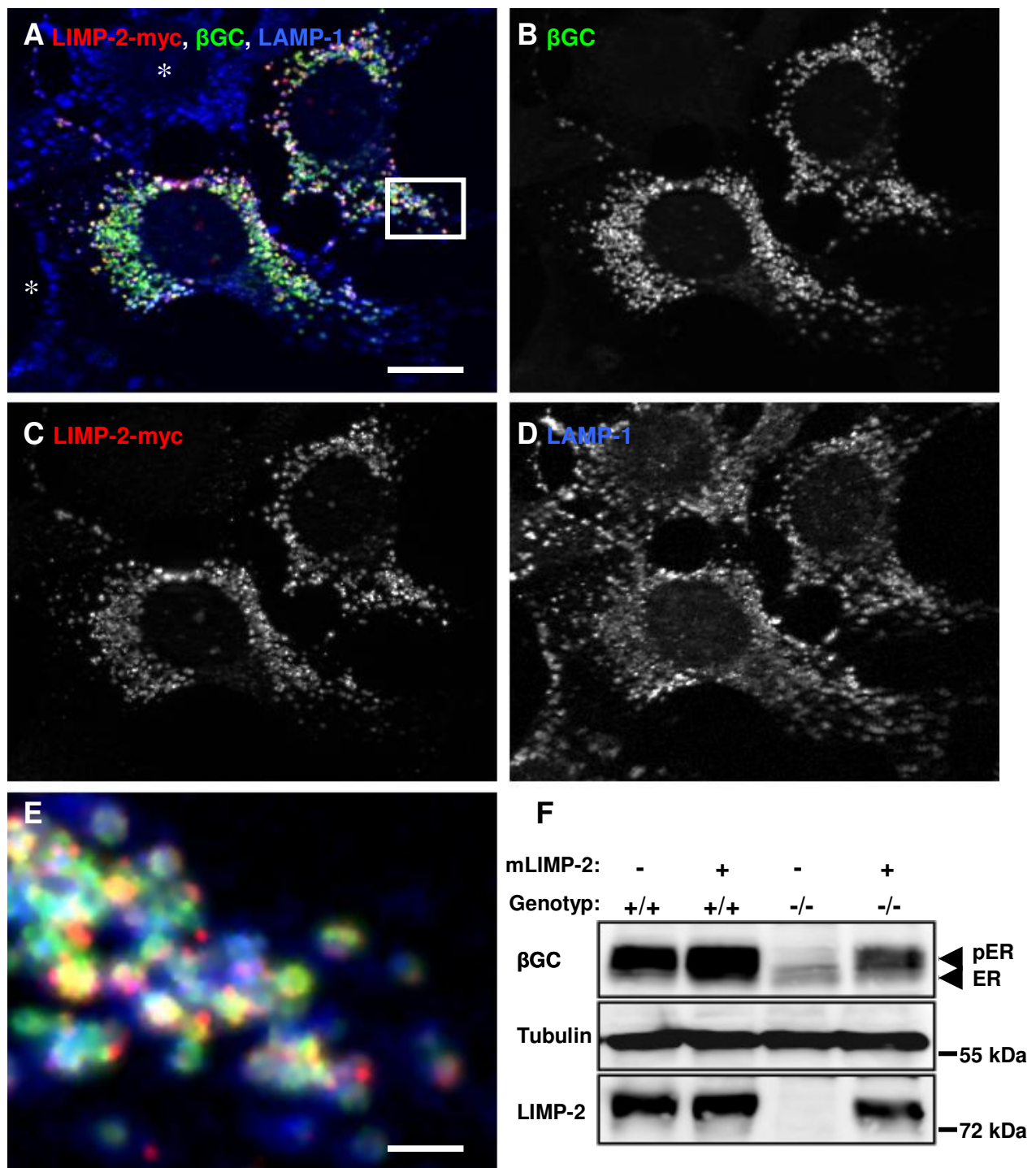


Abb. 4.31: Die Retransfektion von LIMP-2 führte zu gesteigerter lysosomaler Expression der β -Glucocerebrosidase in LIMP-2-defizienten Zellen. A) LIMP-2 defiziente murine embryonale Fibroblasten wurden mit einem mLIMP2-myc-Expressionskonstrukt transfiziert und gegen β GC (grün), LIMP2-myc (rot) und LAMP-1 (blau) gefärbt. Die einzelnen Färbungen für die β GC (B), LIMP-2 (C) und LAMP-1 (D) sind ebenfalls dargestellt. Nicht transfizierte Zellen sind mit einem * markiert. In Abbildung E ist der in Abbildung A eingezeichnete

Ausschnitt vergrößert dargestellt. Man erkennt, dass die endogene Menge an lysosomal lokalisierter β GC in mit LIMP-2 retransfizierten Zellen stark zunahm und wieder der Wildtyp-Menge entsprach. Maßstabsbalken: A - D: 10 μ m, E: 1,7 μ m. F) Immunoblot-Analysen zeigten, dass sich die β GC-Menge in den LIMP-2-retransfizierten LIMP-2-defizienten MEF dem Wildtyp-Niveau annäherte (obere Reihe). Dabei muss berücksichtigt werden, dass nicht alle LIMP-2-defizienten Zellen transfiziert wurden und die LIMP-2-Menge nicht ganz der in LIMP-2^{+/+}-MEF entsprach (untere Reihe) Eine Ladekontrolle (Tubulin) wird in der mittleren Reihe dargestellt. Es fällt auf, dass sich die β GC in den untransfizierten LIMP-2-defizienten MEF nicht nur in ihrer Menge von den LIMP-2^{+/+}-MEF unterscheidet, sondern sie weist auch ein um ca. 3 kDa geringeres Molekulargewicht auf. Bei dieser kleineren Form der β GC handelt es sich um die unreife, noch im ER befindliche Form. In den retransfizierten LIMP-2^{-/-}-MEF liegt verstärkt die post-ER (pER), vermutlich lysosomal lokalisierte Form der β GC vor.

Die Überexpression des lysosomalen Membranproteins LAMP-2 hat dagegen keinen Einfluss auf die Expression der β GC (Daten nicht gezeigt). In den Immunfluoreszenzaufnahmen war deutlich erkennbar, dass sich die β GC in mit LIMP-2 retransfizierten Zellen wieder in der Nähe der lysosomalen Membran befand, wie es das ringförmige Färbemuster andeutete.

Auch im Immunoblot konnte bestätigt werden, dass LIMP-2-Retransfektion zu gesteigerter Expression der β GC führte und insbesondere die reife, höchstwahrscheinlich lysosomale Form der β GC zunahm (s. Abb. 4.31 F).

4.2.9 Eine im endoplasmatischen Reticulum verbleibende LIMP-2-Mutante hält auch die β -Glukocerebrosidase im endoplasmatischen Reticulum fest

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die β GC in LIMP-2-defizienten Geweben und Zellen signifikant in ihrer Menge reduziert war. Nach Überexpression der β GC in LIMP-2^{-/-}-MEF verblieb das Enzym im ER. Dies deutet darauf hin, dass LIMP-2 für den intrazellulären Transport der β GC und insbesondere für den Export des Enzyms aus dem ER verantwortlich sein könnte. Dafür wäre eine Interaktion dieser beiden Proteine bereits im ER erforderlich. Dies wurde mithilfe einer LIMP-2-Mutante untersucht (Michael Schwake, Biochemisches Institut, Universität Kiel, Kiel, D), die ein starkes ER-Retentionsmotiv trägt (Zerangue et al., 2000). Diese LIMP-2-Mutante war unfähig, das endoplasmatische Reticulum zu verlassen und sie hielt nach Expression in Cos7-Zellen, trotz des endogenen LIMP-2, die β GC im ER zurück (s. Abb. 4.32 A - F). Dies deutet stark darauf hin, dass LIMP-2 bereits im ER mit der β GC Kontakt aufnimmt. Die Ergebnisse wurden von Koimmunopräzipitations-Experimenten unterstrichen, die zeigten, dass sowohl das Wildtyp-LIMP-2 als auch die ER-Retentionsmutante sowohl mit endogener als auch überexprimierter β GC interagierten (s. Abb. 4.32 G).

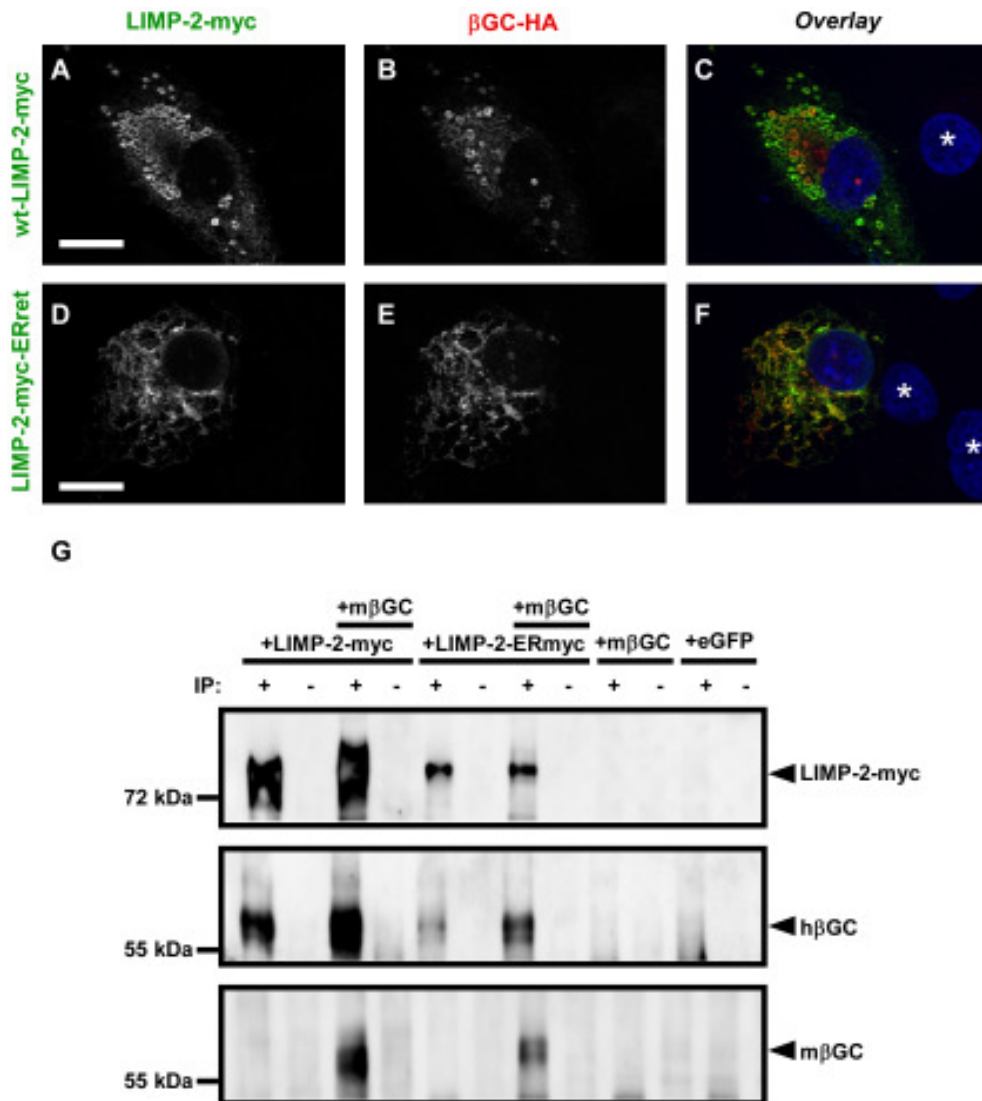


Abb. 4.32: Fehlsortierung von LIMP-2 verändert auch die intrazelluläre Lokalisation der β GC. A - F) Cos7-Zellen wurden mit einem m β GC-HA-Expressionskonstrukt und mit einem Wildtyp-mLIMP2-myc-Expressionskonstrukt (A - C) oder mit einer mLIMP-2-Mutante mit einem starken ER-Retentionsmotiv (D - F) transfiziert. Die LIMP-2-myc-Proteine wurden mithilfe eines myc-Antikörpers (A, D) und die m β GC-HA mit einem HA-Antikörper (B, E) detektiert. Die überlagerten Bilder sind in den Abbildungen C und F dargestellt. Die Zellkerne wurden mit dem Kernfarbstoff DAPI blau angefärbt. Nicht transfizierte Zellen sind mit einem * markiert. Maßstabsbalken: 10 μ m. G): Cos7-Zellen wurden mit Wildtyp-mLIMP-2-myc, der mLIMP-2-myc-ER-Retentionsmutante (LIMP-2-ERmyc) und/oder der murinen β GC (m β GC) transfiziert. Pull-down-Experimente mit den entsprechenden Zelllysaten und Antikörpern gegen (LIMP-2)-myc (+) führten zu einer Koimmunopräzipitation sowohl der endogenen β GC (h β GC, kreuzreagiert mit Cos7- β GC) als auch der überexprimierten m β GC. Als Negativkontrolle dienten Ansätze ohne Zugabe des (LIMP-2)-myc-Antikörpers (-) sowie mit muriner β GC allein oder mit einem eGFP-Expressionskonstrukt transfizierte Zellen. Die Experimente wurden in Kooperation mit Michael Schwake und Judith Blanz (Biochemisches Institut, Universität Kiel, Kiel, D) durchgeführt.

4.2.10 Eine Sekretionsmutante von LIMP-2 führt zur Abgabe der β GC in den Zellkulturüberstand

Nachdem festgestellt wurde, dass eine ER-Retentionsmutante von LIMP-2 die β GC im ER zurückhält, sollte mit dem folgenden Experiment getestet werden, ob die β GC auch durch andere LIMP-2-Mutanten fehlsortiert werden kann. Hierzu wurde eine lösliche LIMP-2-Mutante generiert, indem die luminale Domäne des Proteins an das β GC-Signalpeptid fusioniert war (Michael Schwake, Biochemisches Institut, Universität Kiel, Kiel, D). Dadurch wurde diese LIMP-2-Mutante von Cos7-Zellen in den extrazellulären Raum abgegeben. Die Koexpression der β GC mit dieser LIMP-2-Mutante führte zu einer zehnfach stärkeren Sekretion der β GC im Vergleich zu allein überexprimierter β GC (s. Abb. 4.33). Eine solche gesteigerte Sekretion der β GC wurde nicht beobachtet, wenn das Enzym zusammen mit Wildtyp-LIMP-2 überexprimiert wurde. Diese Daten unterstreichen zum einen die Interaktion der beiden Proteine und sprechen zum anderen dafür, dass die Interaktion der beiden Proteine von längerer Dauer ist.

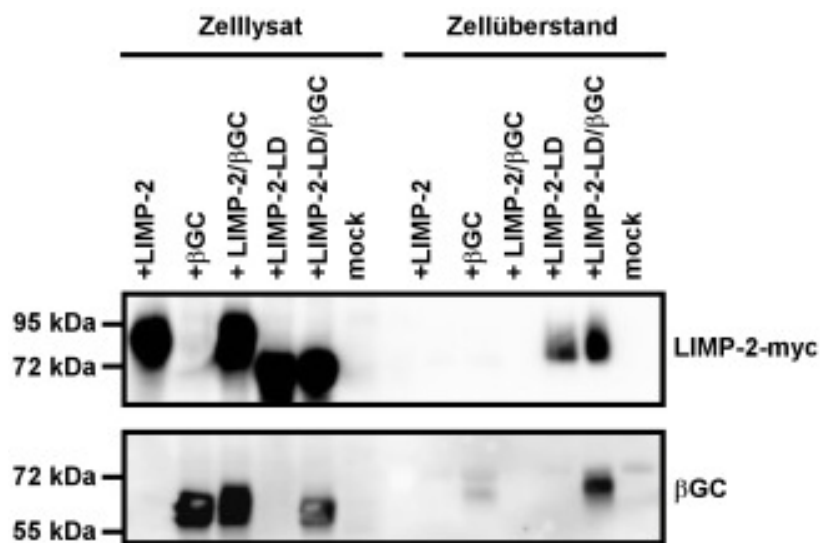


Abb. 4.33: Eine Sekretionsmutante von LIMP-2 führt zur Abgabe der β GC in den Zellkulturüberstand. Cos7-Zellen wurden entweder mit Wildtyp-LIMP-2, einer LIMP-2-Sekretionsmutante (LIMP-2-LD) und/oder der murinen β GC transfiziert. Anschließend wurden gleiche Proteinmengen an Zelllysat bzw. TCA-gefälltem Zellkulturüberstand im SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDV-Membran geblottet. Die anschließende Immunoblot-Analyse ergab, dass die Expression der löslichen LIMP-2-Mutante ebenfalls zu einer vermehrten Sekretion der β GC in den Zellkulturüberstand führte. Obere Abbildung: die LIMP-2-Expression wurde mit einem myc-spezifischen Antikörper nachgewiesen; untere Abbildung: die β GC wurde mit einem mausspezifischen β GC-Antikörper nachgewiesen. Das Experiment wurde in Kooperation mit Michael Schwake (Biochemisches Institut, Universität Kiel, Kiel, D) durchgeführt.

4.2.11 Äquimolare Mengen von LIMP-2 sind für eine starke und lysosomale Expression der β -Glukocerebrosidase ausreichend

Um zu quantifizieren, wie viel LIMP-2 für den Transport der β GC zum Lysosom notwendig ist, wurden LIMP-2-defiziente Zellen mit einem Expressionskonstrukt der humanen β GC und verschiedenen Mengen eines mLIMP-2-myc-Konstruktes transfiziert (s. Abb. 4.34). Um den Transport der β GC zum Lysosom zu verfolgen, wurden die Zelllysate mit dem Enzym Endoglykosidase H (Endo H) verdaut. Endo H deglykosyliert diejenigen N-glykosylierten Proteine einer Zelle, die den medialen Golgi-Komplex noch nicht erreicht haben und deren Zuckerketten somit noch nicht zu komplexen Zuckerketten umgebaut wurden (Trimble et al., 1978).

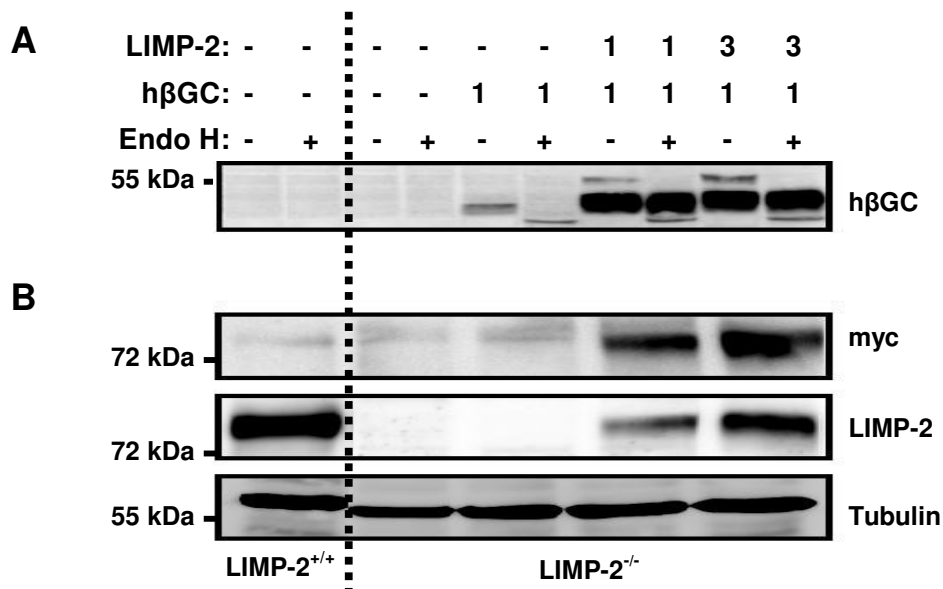


Abb. 4.34: Äquimolare Mengen LIMP-2 sind für einen effizienten Transport der β GC zum Lysosom ausreichend. A) LIMP-2-defiziente MEF wurden entweder unbehandelt gelassen, mit h β GC allein oder mit h β GC und LIMP-2-myc in einem Verhältnis von 1 : 1 bzw. 1 : 3 transfiziert. Um die Menge der β GC zu bestimmen, die unter den jeweiligen Bedingungen im ER verbleibt, wurde ein Teil jedes Zellextraktes mit (+) oder ohne (-) Endo H inkubiert. Wenn die h β GC allein exprimiert wurde, war sie komplett Endo H-sensitiv und vermutlich im ER befindlich. Die Transfektion der β GC zusammen mit LIMP-2 in einem Verhältnis von 1 : 1 führt zu einem signifikanten Anstieg der Expression der β GC und zugleich zur Bildung einer Endo H-resistenten, post-ER bzw. wahrscheinlich lysosomalen Form der β GC. Die Erhöhung der Menge von LIMP-2 auf das dreifache der Menge der β GC führte weder zu einer Zunahme der Menge noch der Endo H-Resistenz der β GC. B) Die LIMP-2 Expression wird mithilfe eines anti-myc- (oben) bzw. anti-LIMP-2-Antikörpers (mitte) dargestellt. Die Gesamtmenge an LIMP-2 entsprach nicht ganz der Menge in LIMP-2^{+/+}-Zellen, da nicht alle Zellen transfiziert wurden. In der unteren Zeile dient eine Tubulinfärbung als Ladekontrolle.

Es zeigte sich, dass eine annähernd vollständige Endo H-Insensitivität der h β GC, die vermutlich mit einem erfolgreichen Transport des Enzyms ins Lysosom einhergeht, durch äquimolare Mengen des LIMP-2-Expressionsplasmids erreicht werden konnte. Die Menge des gebildeten LIMP-2-myc-Proteins lag dabei deutlich unter der Menge von LIMP-2 in Wildtyp-MEF. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass nur ein Drittel der Zellen transfiziert wurde. In der Immunfluoreszenz konnte beobachtet werden, dass nach gemeinsamer Transfektion von mLIMP-2-myc und h β GC über 90 % der Zellen beide Proteine exprimierten (Daten nicht gezeigt). Transfektion von größeren Mengen LIMP-2 führte weder zu verstärkter Expression noch Reifung der h β GC. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass LIMP-2 und die β GC einen Transportkomplex mit einer Stöchiometrie von 1 : 1, 2 : 2 etc. ausbilden.

Um die genaue Stöchiometrie des LIMP-2/ β GC-Komplexes innerhalb der lebenden Zelle nachzuweisen, wurden Quervernetzungsexperimente mit dem membranpermeablen Vernetzungsreagenz Disuccinimidylsuberat (DSS) durchgeführt. Dazu wurden LIMP-2-defiziente MEF entweder mit der h β GC allein oder mit der h β GC und mit einem mLIMP-2-myc-Fusionskonstrukt transient transfiziert. Die Zellen wurden direkt in Kultur 30 min bei 37° C mit dem *Crosslinker* DSS inkubiert, lysiert und myc-getaggte Proteine immunopräzipitiert. Anschließend wurde ein *Western Blot* mit einem myc- sowie mit einem h β GC-spezifischen Antikörper durchgeführt (s. Abb. 4.35).

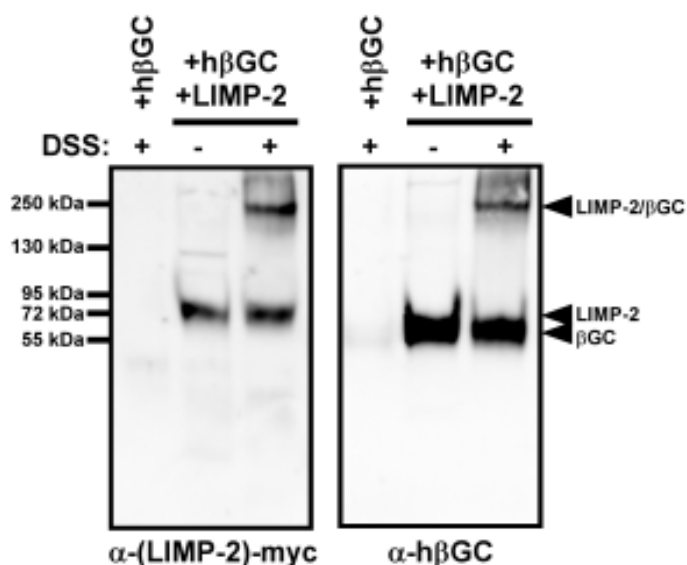


Abb. 4.35: Quervernetzungs-Experimente weisen auf einen ca. 250 kDa großen Komplex aus β GC und LIMP-2 hin. LIMP-2-defiziente MEF wurden entweder mit h β GC allein transient transfiziert oder mit h β GC und Wildtyp-mLIMP-2-myc. Die Zellen wurden direkt in Kultur mit dem *Crosslinker* DSS inkubiert, lysiert und myc-getaggte Proteine immunopräzipitiert. Anschließend wurde ein *Western Blot* mit einem myc- sowie mit einem h β GC-spezifischen Antikörper durchgeführt. Man konnte neben den LIMP-2-myc- und h β GC-Monomeren jeweils einen ca. 250 kDa großen Proteinkomplex nachweisen.

Man konnte neben den LIMP-2-myc und den h β GC-Monomeren jeweils einen ca. 250 kDa großen Proteinkomplex nachweisen. Da der h β GC-positive Komplex über einen anti-myc-Antikörper präzipitiert wurde, ist es wahrscheinlich, dass es sich um den gleichen Komplex handelte, der auch mit dem myc-Antikörper detektiert werden konnte. Die Größe von ca. 250 kDa deutet auf eine 1 : 2, 2 : 1 oder 2 : 2 Stöchiometrie des LIMP-2/ β GC-Komplexes hin. Eine genauere Angabe der Stöchiometrie ist nicht möglich, da die Quervernetzung der Proteine ihr Laufverhalten im SDS-Gel im Vergleich zu monomeren, komplett entfalteten Proteinen verändern kann, und so die im SDS-Gel gezeigte Größe nicht dem tatsächlichen Molekulargewicht entspricht. Dass nur ein geringer Teil der gesamten Menge von LIMP-2 und der β GC miteinander vernetzbar sind, könnte die transiente Interaktion der beiden Proteine unterstreichen. LIMP-2 bindet wahrscheinlich nur während des Transportes vom ER bis in das endosomale Kompartiment die β GC. Im Lysosom dissoziieren die beiden Proteine vermutlich voneinander (Reczek et al., 2007). Der Anteil der vernetzbaren β GC oder LIMP-2 konnte durch Zugabe höherer DSS-Konzentrationen nicht gesteigert werden (Daten nicht gezeigt).

4.2.12 In LIMP-2-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten wird auch die endogene β -Glukocerebrosidase im endoplasmatischen Reticulum zurückgehalten

Es konnte gezeigt werden, dass überexprimierte humane β GC im endoplasmatischen Reticulum LIMP-2-defizienter Zellen zurückgehalten wird (vergl. Abschnitt 4.2.7). Um zu überprüfen, wo die wenige, in LIMP-2-defizienten Zellen noch befindliche endogene β GC lokalisiert ist, wurden Zelllysate LIMP-2-defizienter MEF mit Endo H (vergl. Abschnitt 4.2.11) oder N-Glykosidase F (PNGase F) behandelt. Im Gegensatz zur Endo H spaltet die PNGase F alle N-gebundenen Kohlenhydratketten – unabhängig von ihrer Zusammensetzung – ab, und lässt ein Polypeptid mit eventuellen O-gebundenen Zuckern zurück (Tarentino et al., 1985).

Ein Immunoblot gegen die endogene β GC bestätigte, dass die β GC in LIMP-2^{-/-}-MEF im Vergleich zu LIMP-2^{+/+}-MEF deutlich in ihrer Menge reduziert war (s. Abb. 4.36). Das Molekulargewicht der β GC war aber in beiden Zelllinien sowohl vor als auch nach einem PNGase F-Verdau mit 54 kDa bzw. 50 kDa identisch. Dagegen waren in LIMP-2^{+/+}-Zellen ca. 90 % der β GC Endo H-resistent, während in LIMP-2 defizienten MEF fast die gesamte β GC-Population Endo H sensitiv war. Dies bedeutet, dass in LIMP-2^{+/+}-Zellen der größte Teil der endogenen β GC den Golgi-Apparat passiert hatte und vermutlich im Lysosom lokalisiert war, während in den LIMP-2^{-/-}-MEF die wenige intrazellulär befindliche β GC im ER „gefangen“ war.

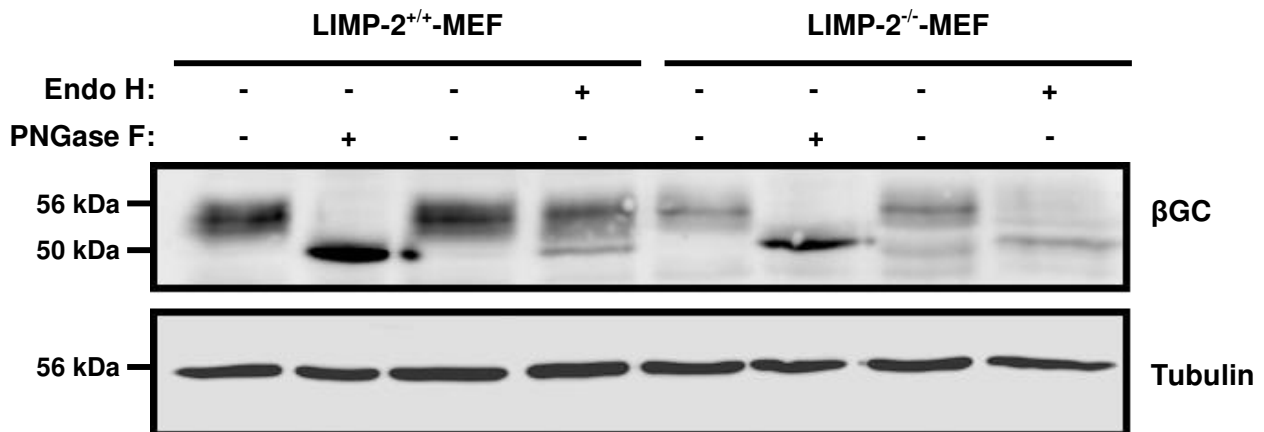


Abb. 4.36: In LIMP-2-defizienten MEF wird die endogene βGC im ER zurückgehalten. LIMP-2^{+/+}- und LIMP-2^{-/-}-MEF wurden entweder mit PNGase F oder Endo H verdaut. Es zeigte sich, dass der größte Teil der βGC in LIMP-2^{+/+}-Zellen Endo H-resistent ist, d.h. das endoplasmatische Reticulum verlassen hat. In LIMP-2-defizienten MEF ist die βGC dagegen größtenteils Endo H-sensitiv und wird daher als im ER befindlich angesehen. In der unteren Zeile dient eine Tubulinfärbung als Ladekontrolle.

4.2.13 LIMP-2-defiziente Zellen sekretieren einen großen Teil der β-Glukocerebrosidase

In MPR-defizienten Mäusen und bei Patienten, die an der *I-Cell*-Krankheit leiden, konnten erhöhte Spiegel verschiedener lysosomaler Enzyme im Serum gemessen werden (Storch und Braulke, 2005). Dies ist auf eine Fehlsortierung der lysosomalen Enzyme in Abwesenheit ihrer Transporter bzw. des Transportsignals zurückzuführen. Es sollte überprüft werden, ob die βGC in Abwesenheit von LIMP-2 auch ins Serum abgegeben wird, was die Hypothese einer Transportfunktion von LIMP-2 für die βGC unterstützen würde. Dazu wurde Serum von Wildtyp- und LIMP-2^{-/-}-Mäusen mittels Immunoblot untersucht. Während bei gleichmäßiger Beladung im Serum der Kontrolltiere keine βGC nachgewiesen werden konnte, waren im Serum der LIMP-2-defizienten Mäuse deutlich Signale der βGC detektierbar (s. 4.37 A). Diese Beobachtung ging mit einem elffachen Anstieg der βGC-Aktivität im Serum der LIMP-2^{-/-}-Tiere einher (s. Abb. 4.37 B), während die Aktivitäten der lysosomalen Hydrolasen β-Hexosaminidase, α-Mannosidase und Arylsulfatase A nicht signifikant verändert waren (Daten nicht gezeigt). Die Resultate deuten darauf hin, dass die βGC bei Abwesenheit von LIMP-2 *in vivo* in den extrazellulären Raum sekretiert wird.

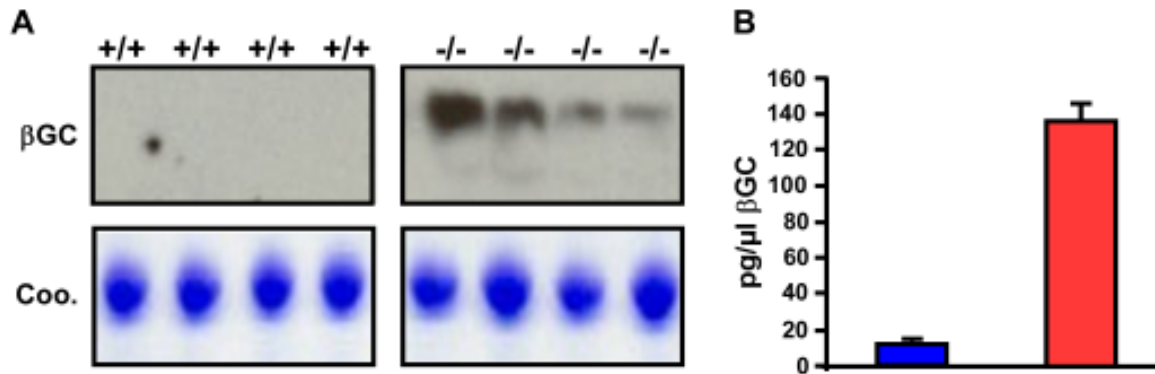


Abb. 4.37: Die β GC wird bei LIMP-2-defizienten Mäusen verstärkt ins Serum abgegeben. A) Immunoblot-Analyse der β GC im Serum von jeweils vier sechs Monate alten LIMP-2^{+/+}- und LIMP-2^{-/-}-Mäusen. Der untere Teil der Abbildung zeigt als Ladekontrolle ein identisch beladenes Coomassie-Gel. B) Die Aktivität der β GC ist im Serum LIMP-2-defizienter Mäuse (rot) im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (blau) ca. elffach erhöht. Die Experimente wurden in Kooperation mit David Reczek (Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA) durchgeführt.

Um die Sekretion der β GC besser verstehen zu können, sollten die *in vivo* Daten im Zellsystem reproduziert werden. Die Zellen, die bei unter Morbus Gaucher leidenden Patienten am stärksten betroffen sind, sind Makrophagen, da sie unter anderem für den Abbau alter Erythrozyten verantwortlich sind und große Mengen Glukosylceramid degradieren müssen. Makrophagen exprimieren große Mengen der β GC und wurden deshalb als Modellsystem untersucht. Dazu wurden Makrophagen mittels Injektion von Thioglykolat aus dem Peritoneum von Wildtyp- und LIMP-2-defizienten Mäusen isoliert und für 24 Std in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurde die Menge der β GC in Zellen und Zellkulturüberständen im Immunoblot bestimmt. Die Überstände wurden dafür mit TCA gefällt. Während im Zellextrakt LIMP-2-defizienter Makrophagen die Menge der β GC im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert war, so war sie im Überstand der LIMP-2^{-/-}-Makrophagen verstärkt zu finden (s. Abb. 4.38 A). Eine Quantifizierung zeigte, dass sich in Wildtyp-Makrophagen 5 – 7 % der gesamten β GC im Medium befanden, während es in den LIMP-2^{-/-}-Makrophagen 46 – 47 % waren (s. Abb. 4.38 B). Ähnliche Beobachtungen konnten auch in LIMP-2-defizienten MEF gemacht werden. Während in wt-MEF lediglich 5 – 10 % der β GC extrazellulär lokalisiert waren, waren es in den LIMP-2^{-/-}-Zellen bis zu 55 % (s. Abb. 4.38 C, D).

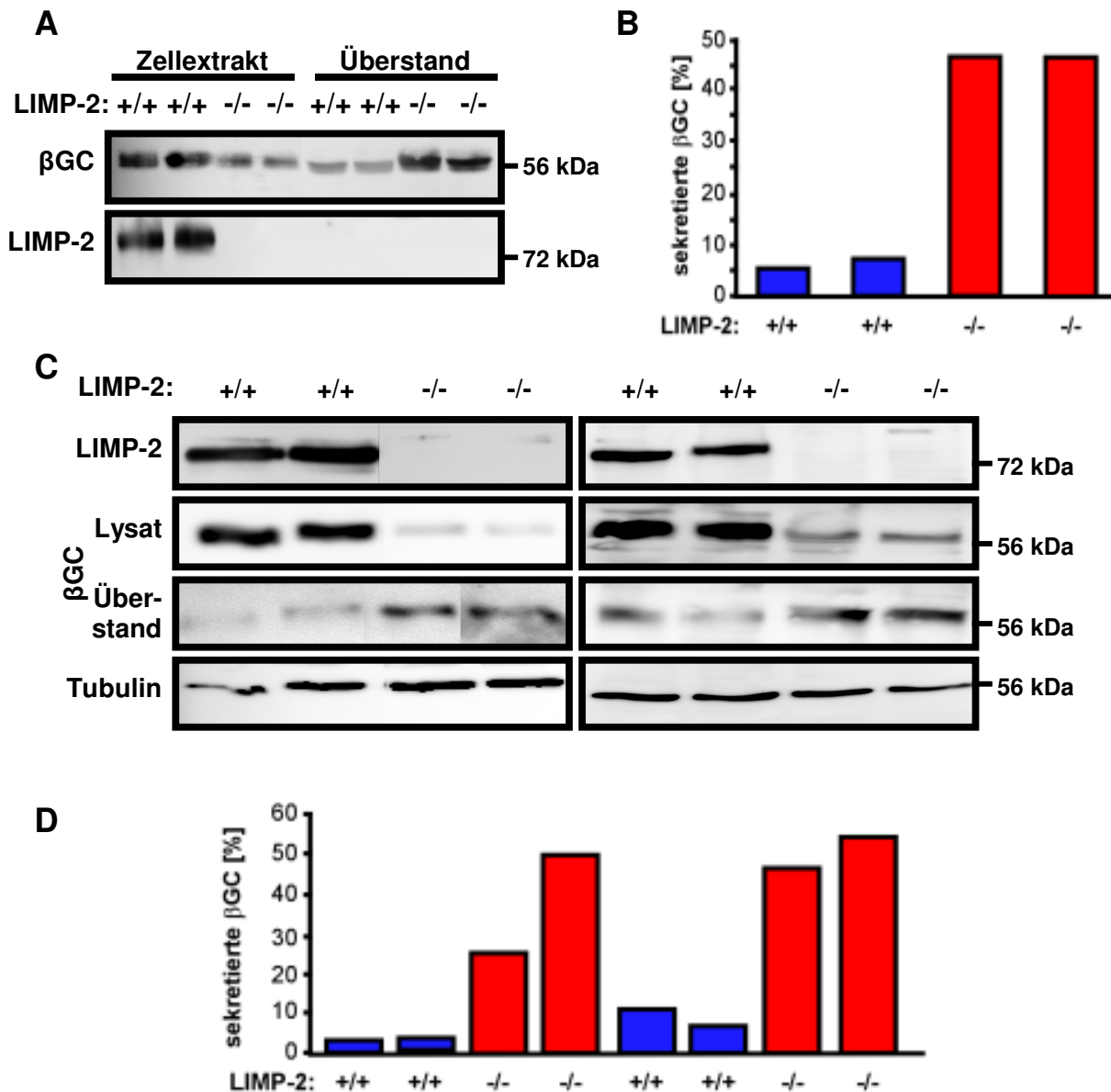


Abb. 4.38: In LIMP-2-defizienten Zellen wird ein großer Teil der β GC sekretiert. A) Makrophagen wurden nach Thioglykolat-Injektion aus dem Peritoneum von Wildtyp- und LIMP-2-defizienten Mäusen isoliert und anschließend kultiviert. Der Überstand wurde mit TCA gefällt und zusammen mit dem Zelllysat im Immunoblot untersucht. In Wildtyp-Makrophagen befand sich ca. 90 % der β GC intrazellulär, während LIMP-2-defiziente Makrophagen ca. die Hälfte der gebildeten β GC ins Zellkulturmedium sekretierten (oben). Bestätigung der LIMP-2-Defizienz (unten). B) Densitometrische Quantifizierung der Banden in Abbildung A. Es wird der Anteil der sekretierten β GC in Prozent angegeben. C) Zelllysat und TCA-gefällter Überstand von jeweils zwei unabhängigen LIMP-2^{+/+}- und LIMP-2^{-/-}-MEF-Zelllinien wurden auf die Expression von LIMP-2 (obere Zeile), der β GC (mittlere Zeilen) und Tubulin (untere Zeile) im Immunoblot untersucht. Auch in den murinen embryonalen Fibroblasten wurde bei Abwesenheit von LIMP-2 bis zu 55 % der gesamten β GC in den Zellkulturüberstand abgegeben, während der Anteil der β GC im Überstand von LIMP-2^{+/+}-Zellen nur ca. 10 % betrug. D) Densitometrische Quantifizierung der Banden in Abbildung C. Es wird der Anteil der sekretierten β GC in Prozent angegeben.

4.2.14 *Pulse-Chase*-Experimente zeigen eine verminderte Reifung und verstärkte Sekretion der β -Glukocerebrosidase in mit LIMP-2-siRNA behandelten HeLa-Zellen

Mit *Pulse-Chase*-Experimenten sollte die Menge und die Reifung der β GC über die Zeit verfolgt werden. Dazu wurden zum einen HeLa-Zellen verwendet, in denen LIMP-2 mittels siRNA ausgeschaltet wurde, und HeLa-Zellen, die mit unspezifischer Kontroll-siRNA behandelt wurden. Die Zellen wurden 2 Std mit Medium behandelt, das ^{35}S -Methionin/Cystein enthielt (*Pulse*), und anschließend für verschiedene Zeiten in Normalmedium mit einem Überschuss an nicht-radioaktivem Methionin und Cystein inkubiert (*Chase*). Das Zellkulturmedium wurde geerntet und die Zellen lysiert. Die β GC wurde mittels eines gegen die humane β GC gerichteten Antikörpers immunopräzipitiert und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Reifung bzw. der Transport der β GC vom ER zum Lysosom konnte durch Endo H-Verdau verfolgt werden. Während im ER bzw. cis-Golgi befindliche β GC Endo H-sensitiv ist, sind reifere Formen der β GC Endo H-resistent.

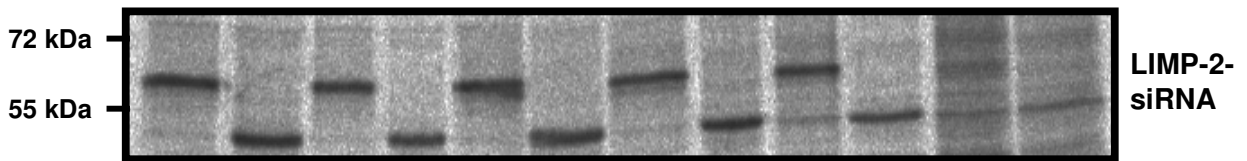
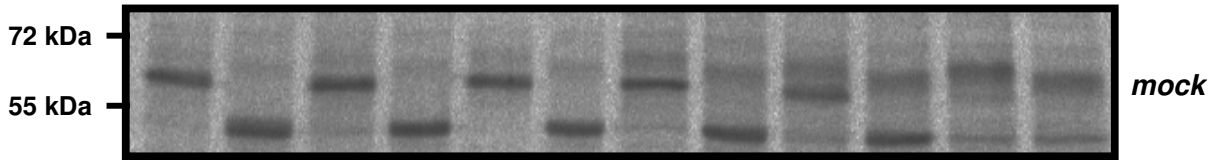
In Kontrollzellen war die β GC nach 0 min und 10 min noch komplett Endo H-sensitiv, also im ER befindlich. Nach 30 min traten erste Spuren einer Endo H-resistenten, vermutlich lysosomalen Form der β GC auf. Die Menge der Endo H-resistenten, post-Golgi β GC-Form nahm im Laufe der Zeit kontinuierlich zu, während die endoplasmatische Form der β GC abnahm. Nach 8 Std hatte die gesamte β GC das endoplasmatische Reticulum verlassen und den Golgi-Apparat passiert (s. Abb. 4.39 A).

In HeLa-Zellen, in denen LIMP-2 mittels siRNA ausgeschaltet wurde (s. Abb. 4.39 C und 4.39 E), konnte selbst nach 8 Std keine Endo H-resistente Form der β GC detektiert werden (s. Abb. 4.39 A). Die intrazelluläre β GC blieb 2 Std lang bei unveränderter Menge Endo H-sensitiv und war nach 8 Std nahezu komplett verschwunden. Eine Überprüfung der Zellkulturüberstände zeigte, dass nach 2 Std sowohl bei den unbehandelten als auch bei den mit LIMP-2-siRNA behandelten Zellen nur wenig β GC im Medium zu finden war. Dagegen nahm nach 8 Std die Menge der β GC in den mit LIMP-2-siRNA behandelten Zellüberständen um 300 % zu, während sie in den Kontrollüberständen auf dem Niveau von 2 Std blieb (s. Abb. 4.39 B).

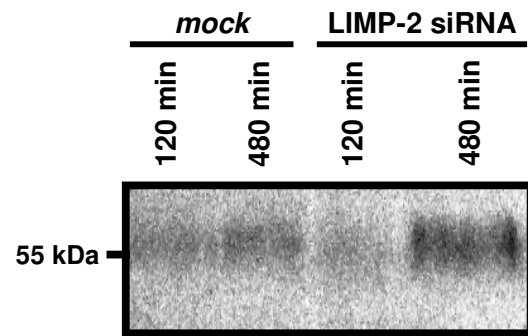
Dagegen hatte die Herunterregulation von LIMP-2 mittels siRNA keinen Einfluss auf die Expression und Reifung der lysosomalen Hydrolase Cathepsin D (s. Abb. 4.39 F). Direkt nach der metabolischen Prozessierung waren die vorherrschenden Formen von Cathepsin D a) der unprozessierte Vorläufer mit einem Molekulargewicht von 53 kDa und b) die 47 kDa große intermediäre Form. Nach 60 min trat erstmals die reife Form von Cathepsin D auf (31 kDa),

A

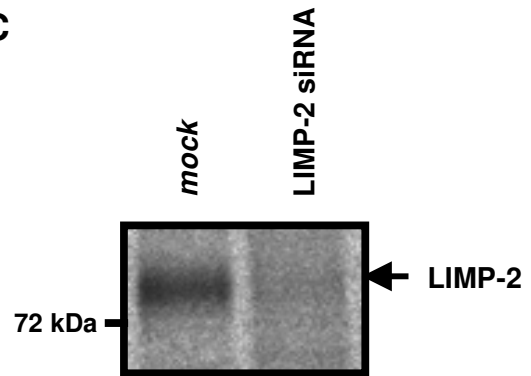
| | | | | | | |
|---------|-------|--------|--------|--------|---------|---------|
| Chase: | 0 min | 10 min | 30 min | 60 min | 120 min | 480 min |
| Endo H: | - + | - + | - + | - + | - + | - + |



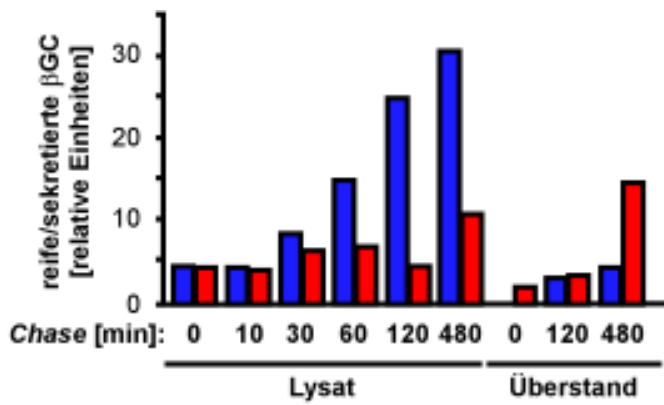
B



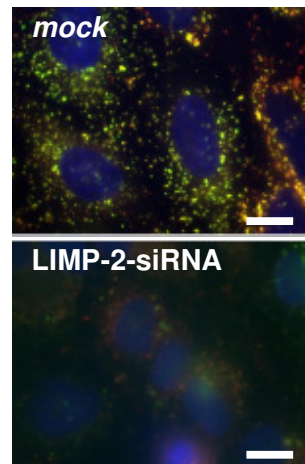
C



D



E



F

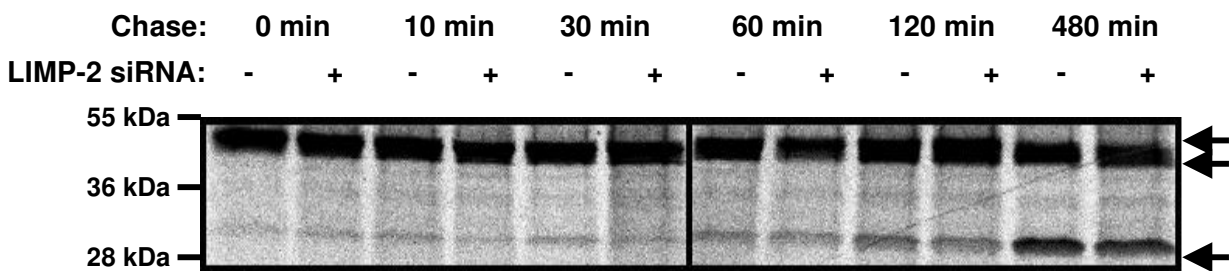


Abb. 4.39: Pulse-Chase-Analyse der β GC-Expression in metabolisch markierten HeLa-Zellen mit oder ohne LIMP-2-siRNA-Behandlung. HeLa-Zellen wurden entweder mit LIMP-2-spezifischer oder mit unspezifischer Kontroll-siRNA (*mock*) transfiziert. Die Zellen wurden 2 Std mit Medium behandelt, das ^{35}S -Methionin/Cystein enthielt (*Pulse*), und anschließend für verschiedene Zeiten in Normalmedium mit einem Überschuss an nicht-radioaktivem Methionin und Cystein inkubiert (*Chase*). Das Zellkulturmedium wurde geerntet und die Zellen lysiert. A) Autoradiographie von β GC-Immunopräzipitaten aus Zelllysaten mit und ohne Endo H-Behandlung. B) Autoradiographie von β GC-Immunopräzipitaten aus dem Zellüberstand der HeLa-Zellen (\pm LIMP-2-siRNA). C) Überprüfung des LIMP-2-*knock-downs* mittels Immunopräzipitation von Zelllysaten und Autoradiographie. D) Quantifizierung der murenen β GC der Teilabbildungen A) und B). E) Kontrolle des LIMP-2-*knock-downs* und dessen Effekt auf die Expression der β GC in mit LIMP-2-siRNA behandelten HeLa (unten) im Vergleich zu *mock*-transfizierten Zellen (oben). (LIMP-2: grün, β GC: rot, DAPI: blau, Maßstabsbalken: 10 μm) F) Der LIMP-2-*knock-down* mittels siRNA hat keinen Einfluss auf die Expression und Reifung der lysosomalen Hydrolase Cathepsin D (unprozessierter Vorläufer: 53 kDa, intermediäre Form: 47 kDa, reife Form: 31 kDa).

die sodann kontinuierlich zunahm. Nach 8 Std war die Vorläuferform komplett verschwunden. Es konnten nur noch die intermediäre und die reife Form von Cathepsin D gefunden werden. Es war kein Unterschied in der Reifung von Cathepsin D zwischen mit Kontroll- oder mit LIMP-2-siRNA behandelten Zellen feststellbar. LIMP-2-Defizienz hat also keinen generellen Effekt auf die Reifung lysosomaler Enzyme.

4.2.15 Proteasomale Inhibitoren haben keinen Einfluss auf die Menge der β -Glukocerebrosidase in LIMP-2-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten

Die vorausgegangenen Experimente konnten zeigen, dass in LIMP-2-defizienten Zellen ein Großteil der β GC sekretiert wurde. Um zu überprüfen, welchen Einfluss die Abwesenheit von LIMP-2 auf die Stabilität der β GC hat, wurde der Effekt der proteasomalen Inhibitoren ALLN und MG132 auf die Expression und Halbwertszeit der β GC untersucht. Ron und Horowitz konnten 2005 zeigen, dass bestimmte Mutationen in der β GC (z.B. D409H/D409H) zu einer Retention des Proteins im ER und zum anschließenden Abbau durch das Qualitätskontrollsystem des ER (ERAD = *ER-associated degradation*) führten. Behandlung von Zellen, die diese Mutation trugen, mit den proteasomalen Inhibitoren führte zu einer deutlichen Zunahme der Menge der β GC.

Um zu überprüfen, ob es in LIMP-2-defizienten Zellen zu einer Fehlfaltung der β GC und zum anschließenden Abbau durch das Proteasom kommt, wurden LIMP-2-defiziente Zellen mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 behandelt. Im *Western Blot* konnte sowohl in LIMP2^{+/+}- als auch

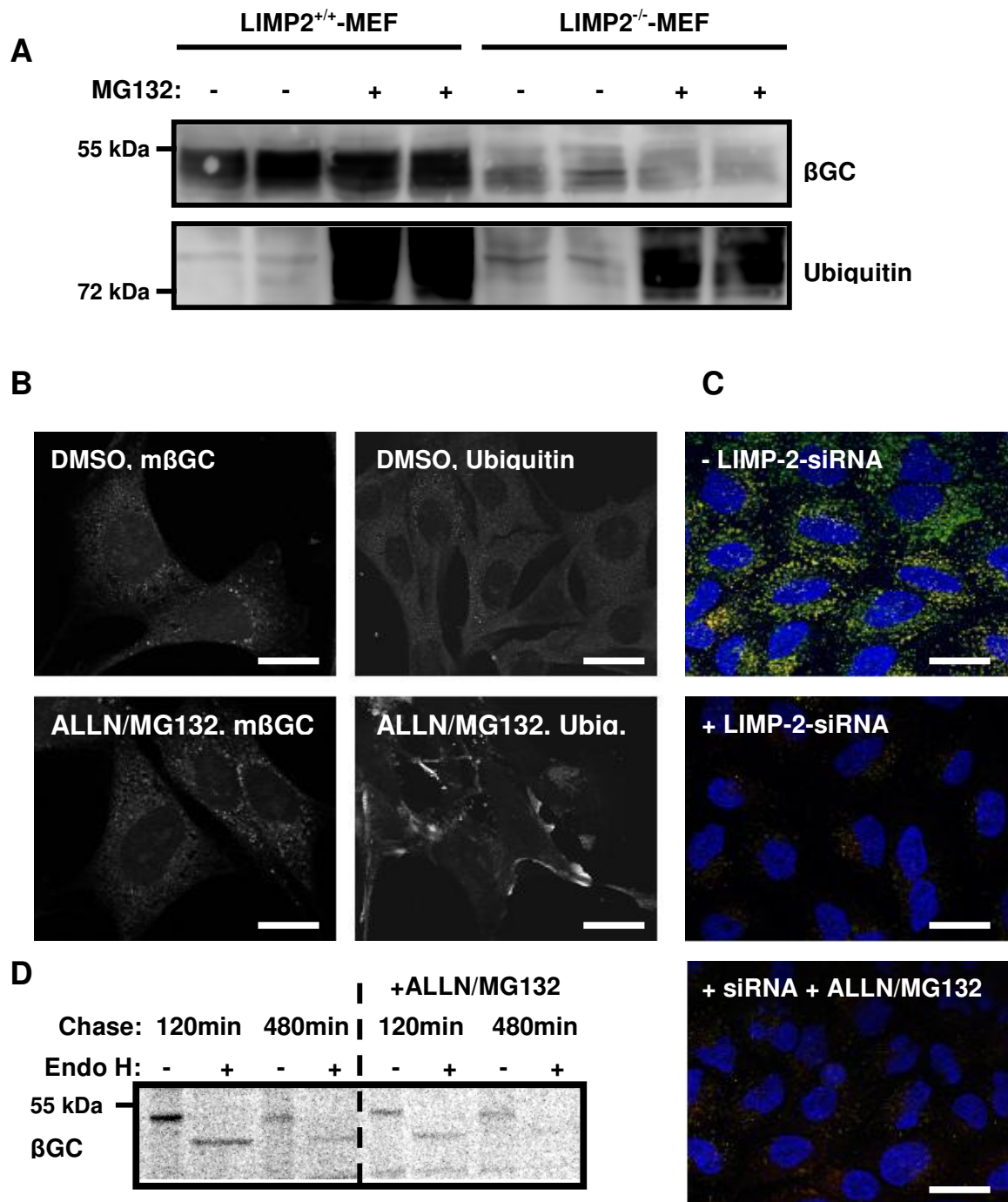


Abb. 4.40: Proteasomale Inhibitoren haben keinen Einfluss auf die β GC-Menge in LIMP-2-defizienten Zellen.

A) Wildtyp und LIMP-2-defiziente murine embryonale Fibroblasten wurden 8 Std mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 in normalem Zellkulturmedium behandelt. Die endogene β GC-Expression wurde mittels Immunoblot-Analyse detektiert. Die Inkubation der Zellen mit dem proteasomalen Inhibitor führte zu keiner Zunahme der β GC-Spiegel in LIMP-2-defizienten Zellen. Die proteasomale Inhibierung wurde durch die Akkumulation hochmolekularer Ubiquitinaggregate überprüft. B) Eine ähnliche Behandlung mit einer Kombination der beiden

proteasomalen Inhibitoren MG132 und ALLN führte ebenfalls zu keinen erhöhten lysosomalen β GC-Mengen, wie die Immunfluoreszenzanalyse mit anti-m β GC-Antikörpern zeigte. Eine Färbung gegen Ubiquitin bestätigte wie in Abb. A durch die Zunahme der anti-Ubiquitin färbung die proteasomale Inhibierung. Maßstabsbalken: 10 μ m. C) Auch in mit LIMP-2-siRNA behandelten HeLa-Zellen konnte keine Zunahme der Signalintensität der β GC (rot) nach Behandlung mit ALLN und MG132 festgestellt werden. Der *knock-down* von LIMP-2 konnte mit der entsprechenden Antikörperfärbung (grün) nachgewiesen werden. Maßstabsbalken: 20 μ m. D) Auch im *Pulse-Chase*-Experiment mit LIMP-2-siRNA transfizierten Zellen konnte keine verstärkte β GC-Expression oder -Reifung nach Hinzugabe von ALLN und MG132 beobachtet werden. Die Inhibitoren waren dem Zellkulturmedium während der gesamten *Pulse*- und *Chase*-Phase beigelegt.

in LIMP-2^{-/-}-MEF beobachtet werden, dass durch die Hemmung des Proteasoms poly-ubiquitinylierte Proteine in den Zellen akkumulierten. Ein Effekt auf die Menge der β GC konnte aber nicht festgestellt werden (s. Abb. 4.40 A). Auch in der Immunfluoreszenzmikroskopie konnte sowohl in LIMP-2-defizienten MEF als auch in mit LIMP-2-siRNA behandelten HeLa-Zellen keine Veränderung in der Expression oder Lokalisation der β GC nach proteasomaler Inhibition beobachtet werden (s. Abb. 4.40 B, C). Schließlich konnte auch in mit ³⁵S-metabolisch markierten und mit LIMP-2-siRNA behandelten HeLa-Zellen kein Effekt proteasomaler Inhibitoren auf die Reifung und die Menge neu synthetisierter β GC festgestellt werden. Die β GC blieb Endo H-sensitiv im ER und nahm in der Zeit von 2 Std bis 8 Std nach dem Puls in der Menge ab. Die Endo H-Sensitivität und die Abnahme der β GC-Menge war vergleichbar zwischen mit LIMP-2-siRNA allein behandelten Zellen und solchen, die zusätzlich mit proteasomalen Inhibitoren behandelt wurden.

Auch andere Proteaseinhibitoren wie die Serin- und Cystein-Proteaseinhibitoren Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und Leupeptin, der Serinproteaseinhibitor AEBSF (4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid) oder der Aspartatproteaseinhibitor Pepstatin A zeigten keinen Effekt auf den intrazellulären β GC-Spiegel (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass die β GC nicht im Lysosom abgebaut wird. Dies wurde durch Experimente bestätigt, in denen die Azidifizierung des Lysosoms durch die Basen Chloroquine oder Ammoniumchlorid bzw. den V-Typ-ATPase-Inhibitor Bafilomycin unterdrückt und dadurch die Aktivität der lysosomalen Hydrolasen reduziert wurde. Auch in diesen Experimenten blieb die intrazelluläre β GC-Menge sowohl in wt- als auch in LIMP-2-defizienten Zellen unverändert (Daten nicht gezeigt). LIMP-2 scheint folglich weder im ER noch im Lysosom einen Effekt auf die Konformation und die Stabilität der β GC zu haben.

5 Diskussion

Lysosomen stellen neben dem Proteasom das wichtigste Abbaukompartiment der tierischen Zelle dar. Es handelt sich um mit einer einfachen Membran umgebene Vesikel, deren Lumen sich durch einen niedrigen pH-Wert und die Anwesenheit verschiedener saurer Hydrolasen auszeichnet. Das charakteristische Merkmal der lysosomalen Membran ist die Anwesenheit von stark glykosylierten Transmembranproteinen, über deren genaue Funktion bisher wenig bekannt ist. In der vorliegenden Arbeit wurde in zwei getrennten Studien die Funktion der abundanten lysosomalen integralen Membranproteine LIMP-1 und LIMP-2 untersucht.

5.1 Charakterisierung einer LIMP-1-defizienten Maus

5.1.1 Das LIMP-1-Pseudogen auf Mausechromosom 18 ist vermutlich transkriptionell inaktiv

Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war die Funktionsanalyse von LIMP-1 mit Hilfe einer LIMP-1-defizienten Maus. Ein besonderes Problem bei der Herstellung einer LIMP-1-defizienten Maus liegt darin, dass die Maus neben dem eigentlichen LIMP-1-Gen auf Chromosom 10 eine weitere LIMP-1-verwandte Sequenz (*Cd63-related sequence 1*, Cd63-rs1) auf Chromosom 18 besitzt (Gwynn et al., 1996). Die Cd63-rs1 weist im Vergleich zum LIMP-1-Gen auf Chromosom 10 keine Intronbereiche auf, was auf einen retroviralen Ursprung hindeutet. Des Weiteren ist die Cd63-rs1 vermutlich erst spät in der Evolution entstanden, da weder im Affen- oder Eichhörnchen- noch im Rattengenom eine solche LIMP-1-verwandte Sequenz zu finden ist (Hotta et al., 1988). Dies deutet darauf hin, dass der Cd63-rs1-Genlocus eventuell keine große Bedeutung innerhalb der Gesamtheit der Mammalia hat und vielleicht auch in der Maus wie verschiedene andere Pseudogene transkriptionell inaktiv sein könnte (Balakirev und Ayala, 2003). Diese Vermutung konnte durch *in silico* Promotoranalysen bestätigt werden, die im Gegensatz zum LIMP-1-Gen auf Chromosom 10 keine Promotoraktivität für die Cd63-rs1 von Chromosom 18 aufzeigten.

Ein weiterer Punkt, der für die Inaktivität der Cd63-rs1 spricht, ist das Vorhandensein verschiedener Punktmutationen im Vergleich zum LIMP-1-Gen auf Chromosom 10. Eine dieser Punktmutationen liegt im Glycin-Tyrosin-Motiv des zytoplasmatischen C-Terminus des potentiellen LIMP-1-Proteins. Über dieses Glycin-Tyrosin-Motiv wird LIMP-1 Adaptorprotein-3 (AP-3)-abhängig zum Lysosom dirigiert (Hunziker et al., 1996; Le Borgne et al., 1998; Peters und von Figura, 1994; Rous et al., 2002). Der Austausch des Tyrosinrestes zu einem Histidinrest

würde den Transport des LIMP-1-Proteins zum Lysosom beeinträchtigen, wie immunozytochemische Experimente mit *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP)-Konstrukten zeigten.

5.1.2 Erfolgreiche Generierung eines LIMP-1-defizienten Mausmodells

Nachdem die vorausgegangenen Experimente darauf hindeuteten, dass die funktionelle LIMP-1-Gensequenz im Mausgenom auf Chromosom 10 lokalisiert ist, wurde diese durch das Einfügen einer Neomycinresistenzkassette in das Codon der dritten Aminosäure des LIMP-1-Proteins unterbrochen. Mithilfe von *Northern-Blot*-Analysen und reverser Transkriptase-PCR konnte gezeigt werden, dass die LIMP-1-mRNA in verschiedenen Geweben und Zellen, die aus der LIMP-1^{-/-}-Maus stammten, komplett fehlte. Diese Ergebnisse wurden im *Western Blot* bestätigt, wo ein LIMP-1-spezifischer Antikörper in PNGase F-deglykosylierten Wildtyp-Zell- und -Gewebe-lysaten eine deutliche Bande bei ca. 26 kDa zeigte, was der theoretisch berechneten Masse des LIMP-1-Proteins entsprechen würde. In LIMP-1-defizienten Zellen und Geweben war dagegen kein Signal detektierbar.

Insgesamt zeigten diese Ergebnisse, dass es gelungen war, ein Mausmodell herzustellen, in dem das lysosomale integrale Membranprotein 1 vollständig ausgeschaltet ist. Es gibt keine Hinweise auf eine transkriptionelle Aktivität der LIMP-1-Pseudogensequenz Cd63-rs1 auf Mauschromosom 18.

Der in dieser Arbeit verwendete affinitätsaufgereinigte polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen war der einzige Antikörper, mit dem sich spezifisch murines LIMP-1 nachweisen ließ. Alle anderen sowohl selbst generierten als auch kommerziellen Antikörper waren entweder komplett unspezifisch oder detektierten nur LIMP-1 mit einem Ursprung aus der Ratte oder dem Menschen. Die genaue Ursache für die geringe Immunität des murinen LIMP-1-Proteins ist unklar. Eine Ursache könnte darin liegen, dass große Teile des Tetraspanins innerhalb der Membran liegen und lediglich die zweite extrazelluläre Schleife (EC2) mit ca. 100 Aminosäuren Länge ein potentiell Ziel für Antikörper darstellt. Diese EC2 ist aber stark N-glykosyliert, was die Bindung von durch Peptidimmunisierung erzeugten Antikörpern an das native Protein beeinträchtigt. Deswegen war der in dieser Arbeit verwendete Antikörper nur in der Lage, im *Western Blot* deglykosyliertes LIMP-1 zu detektieren, aber nicht das native Protein. Dadurch konnte der Antikörper weder in der Immunohisto- oder -zytochemie noch in Immunopräzipitations-Experimenten erfolgreich eingesetzt werden.

Zur Zeit erfolgt in Kooperation mit Professor Dr. Friedrich Haag und Professor Dr. Friedrich Koch-Nolte (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg, D) ein erneuter Versuch, einen LIMP-1-Antikörper im Kaninchen zu generieren, und zwar mithilfe einer „Genimmunsierung“. Bei dieser Methode wird mittels einer „*Genegun*“ ein Expressionsplasmid, das in diesem Fall das murine LIMP-1 codiert, in die Haut eines Kaninchens eingebracht. Das codierte Protein wird vom Immunsystem des Kaninchens wie ein virales Protein als körperfremd erkannt und als Folge dessen werden spezifische Antikörper dagegen gebildet (Tang et al., 1992). Auf diese Weise dient im Gegensatz zu auf Peptiden beruhenden Antikörpern das gesamte Protein als Antigen. Diese Methode ist besonders gut zur Herstellung glykosylierter Transmembranproteine geeignet, deren rekombinante Herstellung in Bakterien schwierig ist (Tang et al., 1992).

5.1.3 LIMP-1-defiziente Mäuse weisen auf den ersten Blick keinen auffälligen Phänotyp auf

Homozygot LIMP-1-defiziente Mäuse sind fruchtbar und zeigen keine erhöhte Letalität. Sie weisen auf den ersten Blick auch keine Verhaltensauffälligkeiten, histologische Abnormalitäten oder andere offensichtliche gesundheitliche Beeinträchtigungen auf. Dies ist insofern unerwartet, als dass es sich bei LIMP-1 um ein ubiquitär exprimiertes Protein handelt (Sincock et al., 1997), für das zahlreiche Funktionen postuliert wurden u.a. bei der β 1-Integrin-vermittelten Zelladhäsion, der Signaltransduktion innerhalb von T- und Mastzellen oder der Regulation des Transportes der H^+, K^+ -ATPase in Kolon und Magen (vergl. Tab. 1.1). Außerdem steht dieser milde Phänotyp im Gegensatz zu anderen *knock-out*-Mausmodellen lysosomaler Membranproteine (vergl. Tab. 5.1). Während LIMP-2-defiziente Mäuse durch die Ausbildung von Taubheit, einer peripheren Neuropathie und Hydronephrosen sowie eine erhöhte Letalität gekennzeichnet sind (Gamp et al., 2003; Knipper et al., 2006), kommt es in LAMP-2-defizienten Mäusen zu einer Akkumulation von Autophagosomen in verschiedenen Geweben, was ebenfalls mit einer größeren Sterblichkeit assoziiert ist (Tanaka et al., 2000).

Auf der anderen Seite weisen LAMP-1-defiziente Mäuse bis auf eine milde regional beschränkte Astrogliose und eine veränderte Immunoreaktivität gegenüber Cathepsin D keinen auffälligen Phänotyp auf (Andrejewski et al., 1999). Ebenfalls zeichnen sich viele der bisher beschriebenen Tetraspanin-*knock-out*-Mausmodelle durch relativ milde Phänotypen aus (vergl. Tab.5.1). CD9-defiziente Mäuse waren vollkommen gesund (Cariappa et al., 2005). Als einziger, wenn auch sehr schwerer Phänotyp wurde bisher die stark reduzierte Fruchtbarkeit der CD9^{-/-}-Weibchen

beschrieben, da CD9 ein vermutlich essenzieller Faktor auf der Eizelle für die Fusion mit dem Spermium ist (Le Naour et al., 2000; Miyado et al., 2000). In CD37^{-/-}-Mäusen konnten lediglich leichte Beeinträchtigungen des Immunsystems detektiert werden (Knobeloch et al. 2000; van Spriel et al., 2001). CD81^{-/-}-Mäuse waren ebenfalls vital und fertil. Allerdings war die Expression von CD19 auf CD81^{-/-}-B-Lymphozyten reduziert, die wiederum weniger Antikörper im Vergleich zu Wildtyp-B-Zellen produzierten (Maecker und Levy, 1997; Tsitsikov et al., 1997; Miyazaki et al., 1997). Desweiteren war das retinale Pigment bei CD81^{-/-}-Mäusen verdickt (Song et al., 2004) und das Gehirn aufgrund erhöhter Gliazellzahlen vergrößert (Geisert et al., 2002). CD151-defiziente Mäuse waren überlebensfähig, fruchtbar und schienen zunächst gesund (Wright et al., 2004). Allerdings war die Hämostase in diesen Mäusen beeinträchtigt (Wright et al., 2004). Auch die Wundheilung wurde durch eine reduzierte Migrationsfähigkeit von Keratinozyten und einer Disorganisation der basalen Lamininstruktur verlangsamt (Cowin et al., 2006; Wright et al., 2004). Schließlich entwickelten CD151^{-/-}-Mäuse bereits ab der dritten Lebenswoche eine massive Proteinurie, die durch eine fokale Glomerulosklerose, eine Disorganisation der glomerulären Basalmembran sowie durch tubuläre zystische Erweiterungen hervorgerufen wurde, was zu einem Sterben der Mäuse im neunten Lebensmonat führte (Sachs et al., 2006). TSSC6^{-/-}-Mäuse waren ebenfalls vital und fertil. Bei diesen Mäusen war ähnlich wie bei CD151^{-/-}-Mäusen die Hämostase durch ein eingeschränktes α^{IIb}/β_3 -Integrin-Signalling beeinträchtigt (Goschnick et al., 2006) und TSSC6^{-/-}-T-Lymphozyten reagierten ähnlich wie CD37^{-/-}- und CD81^{-/-}-T-Zellen hyperproliferativ auf verschiedene Stimuli (Tarrant et al., 2002; van Spriel et al., 2001; Miyazaki et al., 1997).

Ursache für den wenig ausgeprägten Phänotyp der LIMP-1^{-/-}-Maus wie auch anderer Tetraspanin- oder LAMP-1-defizienter Mäuse könnte eine funktionelle Redundanz zu anderen Tetraspaninen oder anderen lysosomalen Membranproteinen sein. Ein Beispiel für eine solche Redundanz wurde für die lysosomal assoziierten Membranproteine LAMP-1 und LAMP-2 beschrieben. Während die einzeldefizienten Mäuse zumindest eingeschränkt lebensfähig waren (Andrejewski et al., 1999; Tanaka et al., 2000), führte die LAMP-1/LAMP-2-Doppeldefizienz zum Absterben der Mäuse zwischen Embryonaltag 14,5 und 16,5 (Eskelinen et al., 2004). In ähnlicher Weise könnten bestimmte Tetraspanine die Funktion eines anderen Familienmitglieds übernehmen. So kommen z.B. die Tetraspanine LIMP-1, CD9 und CD151 in vielen Geweben und Zelltypen gemeinsam vor (Sincock et al., 1997). In dieser Hinsicht wäre es interessant, durch Kreuzung mehrfache Tetraspanin-*knock-out*-Mäuse zu erzeugen und deren Phänotyp zu analysieren.

Tab. 5.1 : Phänotypen verschiedener Mäuse, die defizient für verschiedene Tetraspanine und lysosomale Membranproteine sind.

| Protein | Expressionsort | Phänotyp | Autor |
|-------------------|--|---|---|
| CD9 | B-Lymphozyten | - vital - stark reduzierte Fruchtbarkeit von CD9 ^{-/-} -Weibchen - unveränderte B-Zell-Funktion | Cariappa et al., 2005; Le Naour et al., 2000; Miyado et al., 2000 |
| CD37 | Lymphoide Zellen, v.a. reife B-Lymphozyten | - vital und fortpflanzungsfähig - verminderte B-Zell-Aktivierung in Abwesenheit von Adjuvantien oder viraler Infektion - Hyperproliferatät von T-Zellen | Knobeloch et al., 2000; van Spriël et al., 2001 |
| CD81 | ubiquitär, v.a. B- und T-Lymphozyten | - vital und fortpflanzungsfähig - reduzierte CD19-Expression auf B-Lymphozyten - reduzierte Antikörperproduktion - Hyperproliferatät von T-Zellen - Verdickung des retinalen Pigmentepithels - vergrößertes Gehirn und erhöhte Gliazellzahlen | Geisert et al., 2002; Maecker und Levy, 1997; Miyazaki et al., 1997; Song et al., 2004; Tsitsikov et al., 1997 |
| CD151 | Epithel, Endothel, Muskelzellen, Glomeruli sowie proximale/distale Tubuli der Niere, Thrombozyten, dendritische Zellen | - vital und fortpflanzungsfähig - Hämostase-Defekte durch eingeschränktes α^{IIb}/β_3 -Integrin-Signalling - eingeschränkte Wundheilung durch eingeschränkte Keratinozytenmigrationsfähigkeit - Hyperproliferatät von T-Zellen - Nierenversagen, Proteinurie, Glomerulosklerose, Disorganisation der glomerulären Basalmembran | Cowin et al., 2006; Lau et al., 2004; Sachs et al., 2006; Wright et al., 2004 |
| TSSC6 | hämatopoetische Zellen, Thrombozyten | - vital und fortpflanzungsfähig - Hämostase-Defekte durch eingeschränktes α^{IIb}/β_3 -Integrin-Signalling - Hyperproliferatät von T-Zellen | Goschnick et al., 2006; Tarrant et al., 2002 |
| LAMP-1 | ubiquitär | - vital und fortpflanzungsfähig - milde, regional beschränkte Astrogliose - veränderte Immunoreaktivität gegen Cathepsin D | Andrejewski et al., 1999 |
| LAMP-2 | ubiquitär | - eingeschränkt vital und fortpflanzungsfähig - Akkumulation von Autophagosomen in verschiedenen Geweben - Muskel- und Herzmuskelschwäche | Tanaka et al., 2000 |
| LAMP-1/ LAMP-2 | ubiquitär | - Embryonal letal zwischen E14,5 und E16,5 - Akkumulation von unverestertem Cholesterin in Fibroblasten - Akkumulation von Autophagosomen in verschiedenen Geweben | Eskelinen et al., 2004 |
| LIMP-2 | ubiquitär | - eingeschränkt vital und fortpflanzungsfähig - Taubheit - periphere Neuropathie - Ureterabgangsstenose, Hydronephrose | Gamp et al., 2003; Knipper et al., 2006 |
| LIMP-1 | ubiquitär | - vital und fortpflanzungsfähig - unveränderte Leukozytenreifung - unveränderte Thrombozytenfunktion - erhöhte Diurese sowie erhöhter Wasserverlust über den Kot | |

5.1.4 LIMP-1-Defizienz hat keine offensichtlichen Auswirkungen auf lysosomale Funktionen

LIMP-1 scheint nicht entscheidend an der lysosomalen Genese beteiligt zu sein. In dieser Arbeit konnte nämlich gezeigt werden, dass die Menge und intrazelluläre Verteilung verschiedener lysosomaler Membranproteine und Hydrolasen sowie deren Aktivität in unterschiedlichen LIMP-1-defizienten Zellen und Geweben unverändert zur Wildtyp-Situation war. Die Azidifizierung der Lysosomen erfolgte ebenfalls unabhängig von LIMP-1. Die Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPR46 und MPR300) befanden sich in LIMP-1^{-/-}-MEF im TGN, was für einen normalen Transport der lysosomalen Hydrolasen zum Lysosom sprach. Schließlich schien auch der autophagozytotische, phagozytotische sowie endozytotische Vesikelfluss in LIMP-1-defizienten Zellen unbeeinflusst zu sein (Daten nicht gezeigt).

Eventuell kompensieren andere lysosomale Membranproteine oder Tetraspanine wie bereits oben diskutiert das Fehlen von LIMP-1. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass LIMP-1 innerhalb der Lysosomen keine hervorgehobene Rolle spielt, sondern Lysosomen als eine Art Speicher für das Tetraspanin dienen und LIMP-1 bei Bedarf in bestimmten Zelltypen zur Plasmamembran transportiert wird, wo es seine eigentliche Funktion erfüllt. Dies könnte z.B. bei der Anheftung von neutrophilen Granulozyten an Endothelzellen (Toothill et al., 1990) der Fall sein.

5.1.5 LIMP-1^{-/-}-Mäuse besitzen weitgehend unveränderte Immunzellpopulationen in Knochenmark, Thymus, Milz, Lymphknoten und Peritoneum

LIMP-1 wird stark von verschiedenen Zellen des Immunsystems exprimiert (vergl. Abb. 4.4.; Sincock et al., 1997). Um Auswirkungen der LIMP-1-Defizienz auf das Immunsystem zu untersuchen, wurden FACS-Analysen durchgeführt. Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden: 1) Führt die LIMP-1-Defizienz zu Änderungen in der Zusammensetzung und Zellularität der primären und sekundären Organe des Immunsystems? 2) Spielt LIMP-1 bei der Differenzierung und Reifung des Immunsystems eine Rolle? 3) Ist der funktionelle Status der Zellen des Immunsystems verändert in Abwesenheit von LIMP-1? 4) Ist die Expression anderer Tetraspanine auf LIMP-1-defizienten Leukozyten verändert, was man als einen kompensatorischen Effekt innerhalb der Tetraspaninfamilie deuten könnte?

Spielt LIMP-1 eine Rolle bei der Entwicklung des Immunsystems?

Mit Antikörpern, die gegen entsprechende Markerproteine gerichtet waren, wurde die Anzahl einzelner Immunzellsubpopulationen in Knochenmark, Thymus, Milz, Lymphknoten und Peritoneum von LIMP-1^{-/-}-Mäusen bestimmt. Es konnten in den einzelnen lymphatischen Organen weder signifikante Unterschiede zu Wildtyp-Tieren in der Anzahl reifer Immunzellen festgestellt werden noch in der Anzahl der verschiedenen hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark. Lediglich die frühen Entwicklungsstufen der T-Lymphozyten im Thymus (DN1 und DN2) waren in ihrer Anzahl reduziert. Dieser Effekt spiegelt sich aber nicht in den späteren Entwicklungsstufen und in der Anzahl der reifen T-Lymphozyten in den sekundären Lymphorganen wieder. Histologische Analysen z.B. der Milz oder der Leber (Daten nicht gezeigt bzw. vergl. Abb. 4.14) zeigten ebenfalls keine Abnormalitäten, die auf eine Beeinträchtigung des Immunsystems in der LIMP-1-defizienten Maus hinwiesen. Ursache hierfür könnte die bereits oben beschriebene Kompensation der LIMP-1-Defizienz durch andere Tetraspanine sein.

Allgemein scheint die Entwicklung von T- und B-Zellen unabhängig von bestimmten Tetraspaninen zu sein, wie Untersuchungen an CD9- (Cariappa et al., 2005), CD37- (Knobeloch et al., 2000), CD81- (Maecker und Levy, 1997; Miyazaki et al., 1997; Tsitsikov et al., 1997), CD151- (Wright et al., 2004) und TSSC6-defizienten (Tarrant et al., 2002) Mäusen zeigten. Dies ist insofern überraschend, da alle diese Tetraspanine, teilweise stark, auf hämatopoetischen Zellen exprimiert werden (vergl. Tab. 5.1).

Spielt LIMP-1 eine Rolle für die Funktion von T-Lymphozyten?

Der Aktivierungsstatus von T-Zellen in LIMP-1-defizienten Mäusen war unverändert, wie mit einem Antikörper nachgewiesen werden konnte, der das frühe Aktivierungsantigen CD69 auf T-Zellen detektiert (Ziegler et al., 1994). 2004 konnte durch FACS-Analysen mit dem LIMP-1-spezifischen monoklonalen Antikörper 11C9 gezeigt werden, dass die Oberflächenexpression von LIMP-1 in T-Zellen stark anstieg, die durch dendritische Zellen aktiviert wurden (Pfistershammer et al., 2004). Eine zusätzliche Kostimulation der T-Zellen mit dem 11C9-Antikörper führte zu einer verstärkten Proliferation und Interleukin-2-Produktion (Pfistershammer et al., 2004). Es bleibt offen, welchen Einfluss die LIMP-1-Defizienz auf die Stimulierbarkeit von T-Zellen *in vitro* und *in vivo* hat.

LIMP-1 ist nicht das einzige Tetraspanin, das eine Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen spielen könnte. Das ubiquitär exprimierte Tetraspanin CD81 (*Target of an Anti-Proliferative*

Antibody, TAPA-1) wird besonders stark von B- und T-Lymphozyten gebildet (Maecker und Levy, 1997), während das Tetraspanin TSSC6 (*Tumor-Suppressing Subchromosomal Transferable Fragment cDNA 6*) auf allen hämatopoetischen Zellen sowie in lymphoiden Organen exprimiert wird (Tarrant et al., 2002). In CD81^{-/-}- und TSSC6^{-/-}-Mäusen war *in vitro* die T-Zellproliferation als Antwort auf Concanavalin A sowie CD3- oder CD28-Antikörper signifikant verstärkt, was mit einer erhöhten Interleukin 2-Produktion korrelierte (Maecker und Levy, 1997; Miyazaki et al., 1997; Tarrant et al., 2002). Auch CD37^{-/-}-T-Zellen reagierten mit einer stärkeren Interleukin-2-Produktion und Proliferation auf Stimulation mit Concanavalin A (van Spriel et al., 2004).

Spielt LIMP-1 eine Rolle für die Funktion von B-Lymphozyten?

Es ist offen, ob und wie stark LIMP-1 in B-Lymphozyten exprimiert wird und welche Rolle das Protein in diesen Zellen spielt. Andere Tetraspanine wie CD81 oder CD37 sind für die Funktion der B-Lymphozyten von großer Bedeutung (Knobeloch et al., 2000; Maecker und Levy, 1997; Miyazaki et al., 1997; Tsitsikov et al., 1997). CD81 bildet zusammen mit CD19 und CD21 den Korezeptorkomplex der B-Zelle, der das C3d-Fragment des Komplements erkennt und im Zytoplasma mit Tyrosinkinase und einer Phosphatidylinosit-3-Kinase assoziiert ist (Bradbury et al., 1992; Matsumoto et al., 1991). In CD81-defizienten B-Zellen war die Oberflächenexpression von CD19 (Maecker und Levy, 1997; Miyazaki et al., 1997; Tsitsikov et al., 1997) sowie die T-Zell-abhängige B-Zellaktivierung im Vergleich zu Wildtyp-Lymphozyten unter suboptimalen Stimulationsbedingungen, d.h. in Abwesenheit von Adjuvantien oder einer viralen Infektion reduziert (Maecker und Levy, 1997; Miyazaki et al., 1997). Auf der anderen Seite wurde eine verstärkte Antikörperproduktion nach T-Zell-unabhängiger Stimulation CD81-defizienter B-Zellen beobachtet (Tsitsikov et al., 1997). Auch in CD37^{-/-}-Mäusen war die T-Zell-abhängige B-Zellaktivierung unter suboptimalen Stimulationsbedingungen beeinträchtigt (Knobeloch et al., 2000).

B1-Zellen stellen eine von den B2-Zellen des Knochenmarks unabhängige B-Zell-Population im Peritoneum dar, die große Teile des im Serum vorhandenen IgM bilden. Zwei Studien konnten in CD81^{-/-}-Mäusen eine Reduktion der CD5⁺CD23⁺IgM⁺ B1-Zellen nachweisen (Miyazaki et al., 1997; Tsitsikov et al., 1997). Maecker und Levy, 1997, konnten diese Ergebnisse mit einem unabhängigen CD81^{-/-}-Mausstamm nicht bestätigen. In den LIMP-1-defizienten Mäusen konnte weder eine Veränderung innerhalb einzelner B-Zellpopulationen, noch eine Reduktion der B1-Zellen im Peritoneum, noch signifikante Veränderungen der Plasma-IgM, IgG1- oder IgG3-

Spiegel detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse deuten zunächst darauf hin, dass LIMP-1 keine hervorgehobene Rolle für die Genese und Funktion von B-Zellen besitzt. *In vivo* Experimente sollen in Zukunft mehr Informationen über die Bedeutung von LIMP-1 in B-Lymphozyten geben.

Die Rolle von LIMP-1 für die Funktion von Antigen-präsentierenden Zellen

Eine wichtige Eigenschaft vieler Immunzellen (Makrophagen, dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten) ist die Fähigkeit, Pathogene zu phagozytieren und anderen Zellen des Immunsystems (B- und T-Zellen) zu präsentieren. Sowohl Makrophagen als auch neutrophile Granulozyten exprimieren in hohen Mengen LIMP-1, was auf eine besondere Funktion dieses Tetraspanins in diesen Zellen hinweist. Vorläufige Experimente deuteten auf keine beeinträchtigte *in vitro* Phagozytose-Kapazität von opsonierten Latex-Kügelchen durch LIMP-1-defiziente neutrophile Granulozyten oder Makrophagen hin (Daten nicht gezeigt). Allerdings zeigten *in vivo* Infektionsexperimente mit dem Gram-positiven Bakterium *Listeria monocytogenes* eine erhöhte Überlebensrate der Bakterien in LIMP-1^{-/-}-Mäusen bzw. eine verminderte Abtötungseffizienz des LIMP-1-defizienten Immunsystems (Daten nicht gezeigt; Kooperation mit Carmen Alvarez-Dominguez, Hospital Universitario "Marqués de Valdecilla", Santander, Spanien). *L. monocytogenes* ist ein weit verbreitetes, intrazelluläres Pathogen, das in einer primären Immunantwort in Leber und Milz von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten phagozytiert und abgetötet wird (Portnoy et al., 2002). Die Gründe für die erhöhte Überlebensrate von *L. monocytogenes* in LIMP-1-defizienten Mäusen sind bisher unbekannt. Eventuell ist die Migrationsfähigkeit LIMP-1-defizienter Phagozyten zum Infektionsherd eingeschränkt oder es liegt ein Phagozytose- oder Abtötungsdefekt vor. Toothill *et al.*, postulierten bereits 1990 eine Funktion von LIMP-1 bei der Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an das Endothel. Hiermit stimmt die Beobachtung überein, dass LIMP-1-defiziente Leukozyten auch *in vivo* schlechter an Endothelzellen adhärirten (Daten nicht gezeigt; Kooperation mit Victoria Ridger und Daniel F. Cutler, „University College London“, London, Großbritannien).

Verschiedene Studien diskutieren eine Rolle von LIMP-1 in dendritischen Zellen (Mantegazza et al., 2004; Vyas et al., 2007). LIMP-1 soll zum einen nach Kontakt von dendritischen Zellen mit *Saccharomyces cerevisiae* zusammen mit verschiedenen Integrinen (β 1, β 2, α 5, α M) von der Plasmamembran durch Endozytose in das Zellinnere verlagert werden, was die

Migrationsfähigkeit immaturer dendritischer Zellen erhöhte (Mantegazza et al., 2004). Zum anderen kommt LIMP-1 in den endolysosomalen Tubuli vor, mit denen Peptid-beladene MHC-II-Komplexe an die Zelloberfläche transportiert werden (Vyas et al., 2007). Die Ausbildung dieser Tubuli scheint Mikrotubuli-abhängig zu sein (Vyas et al., 2007), aber die Rolle von LIMP-1 bei der Entstehung dieser endolysosomalen Tubuli ist unklar. *In vitro* kann die Fähigkeit von dendritischen Zellen, aber auch von Makrophagen, proteinogene Antigene zu endozytieren und zu spalten, mithilfe von DQTM-Ovalbumin bestimmt werden (Santambrogio et al., 1999; Weaver et al., 1996). Bei DQTM-Ovalbumin handelt es sich um ein verbessertes, pH-unabhängiges FITC-Ovalbumin, das auf der Ovalbumin-Oberfläche so viele Fluoreszenzmoleküle trägt, dass diese sich gegenseitig *quenchen*. Erst nach Aufspaltung in einzelne Peptidfragmente emittiert das DQTM-Ovalbumin eine grüne Fluoreszenz. In vorläufigen Experimenten konnten keine Veränderungen in der Leuchtintensität und damit der Antigenaufnahme und -Spaltung von LIMP-1^{-/-}-Makrophagen und dendritischen Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Interessant wird es aber sein, die Fähigkeit LIMP-1-defizienter Antigen-präsentierender Zellen, T- und B-Lymphozyten zu stimulieren, zu untersuchen. Dabei sollte ein besonderer Schwerpunkt in der Analyse komplexer Antigene, d.h. ganzer Proteine oder Bakterien liegen, bei denen die lysosomale Degradierung in MHC-präsentierbare Peptide eine besonders wichtige Rolle spielt.

Spielt LIMP-1 eine Rolle für den Transport und die Funktion bestimmter Oberflächenproteine in Leukozyten?

Das Tetraspanin CD81 spielte in B-Zellen eine essentielle Rolle für den Transport von CD19 zur Zelloberfläche (Maecker und Levy, 1997; Miyazaki et al., 1997; Tsitsikov et al., 1997), während CD37 mit dem C-Typ-Lektin Dectin-1 interagiert und CD37^{-/-}-Makrophagen weniger Dectin-1 auf ihrer Oberfläche exprimierten (Meyer-Wentrup et al., 2007). Für LIMP-1 konnte bereits eine Rolle bei der Endozytose sowohl H⁺,K⁺-ATPase des Magens und des Kolons nachgewiesen werden (Codina et al., 2005; Duffield et al., 2003).

Aber nicht nur für den Transport bestimmter Oberflächenproteine könnte LIMP-1 eine wichtige Bedeutung besitzen. LIMP-1 könnte auch direkt die Funktion verschiedener Proteine beeinflussen. In basophilen Granulozyten und Mastzellen ist LIMP-1 mit dem hoch affinen IgE-Rezeptor (FcεRI) assoziiert (Kitani et al., 1991). Der gegen LIMP-1 gerichtete monoklonale Antikörper 12A10 inhibierte die Degranulierung von Mastzellen. Darauf basierend wurde die

Hypothese aufgestellt, dass LIMP-1 eine wichtige Bedeutung für die Weiterleitung von Signalen des FcεRI besitzt, die zur Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren führen, die wiederum allergische Reaktionen auslösen (Kraft et al., 2005). In der Tat zeigten *in vitro* Untersuchungen LIMP-1-defizienter Mastzellen, dass diese Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen in geringerem Maße degranulierten (Daten nicht gezeigt; Kollaboration mit Stefan Kraft, „Beth Israel Deaconess Medical School“, Boston, USA).

In zukünftigen Koimmunopräzipitations-Experimenten oder *Split-Ubiquitin-Yeast-two-Hybrid*-Untersuchungen mit anschließender funktioneller Analyse soll geklärt werden, ob LIMP-1 auch eine Bedeutung für den Transport oder die Funktion weiterer Proteine in Leukozyten hat.

Kompensieren andere Tetraspanine den Verlust von LIMP-1 in LIMP-1-defizienten Leukozyten?

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in den LIMP-1-defizienten Mäusen die Anzahl der CD3⁺CD9⁺-T-Zellen signifikant erhöht war, wobei auch die mittlere Fluoreszenzintensität, also die Anzahl der CD9-Moleküle auf der Zelloberfläche, zunahm. Dies unterstützt die Hypothese, dass andere Tetraspanine wie z.B. CD9 die Funktion des fehlenden LIMP-1 übernehmen könnten. Die Expression des Tetraspanins CD81 war dagegen weder auf T- noch auf B-Zellen verändert, wie auch die Expression von CD9 auf B220⁺-B-Zellen. In zukünftigen Experimenten soll die Expression anderer Tetraspanine, wie z.B. CD37 oder CD53 auf LIMP-1-defizienten Leukozyten untersucht werden.

Insgesamt ist bis jetzt die Bedeutung von LIMP-1 für das Immunsystem unklar. Das Fehlen von LIMP-1 hat keinen generellen Einfluss auf die Reifung und den Anteil verschiedener Immunzell-Subpopulationen im Knochenmark, Thymus, Lymphknoten, der Milz oder im Peritoneum sowie auf die Konzentration einzelner Immunglobuline im Blut. In zukünftigen Experimenten gilt es nun, die Rolle von LIMP-1 für die Funktion verschiedener Immunzellen *in vitro* und *in vivo* zu klären.

5.1.6 Die Thrombozyten LIMP-1-defizienter Mäuse zeigen keine veränderte Aktivität

LIMP-1 assoziiert auf der Thrombozyten-Oberfläche mit dem Plättchen-spezifischen Integrin α^{IIb}/β₃-CD9-Komplex und indirekt über diesen Komplex mit dem Aktin-Zytoskelett (Israels et al., 2001). Ein monoklonaler Antikörper (D545), der gegen die zweite extrazelluläre Schleife (EC2) des humanen LIMP-1-Proteins gerichtet war, verhinderte zwar nicht direkt die Adhäsion von

Blutplättchen an immobilisiertes Fibrinogen, Kollagen, Laminin oder Fibronectin. Er beeinträchtigte jedoch die Ausbreitung der Thrombozyten auf einem Fibrinogen-Untergrund (Israels et al., 2001; Israels und McMillan-Ward, 2004).

Die LIMP-1-*knock-out*-Maus stellt nun ein geeignetes Mittel dar, um mehr über die Funktion von LIMP-1 in Blutplättchen *in vivo* zu erfahren. Es zeigte sich, dass LIMP-1-defiziente Thrombozyten in unveränderter Anzahl in der LIMP-1^{-/-}-Maus existierten und ein nahezu identisches Muster der wichtigsten Oberflächenproteine aufwiesen. Zudem wurden beide Thrombozytenpopulationen in vergleichbarem Maße durch ADP, Thrombin oder *Collagen-related Peptide* aktiviert, wie anhand der Zunahme der Oberflächenexpression von P-Selektin bzw. der von einer Konformationsänderung begleiteten Aktivierung des $\alpha^{\text{IIb}}/\beta_3$ -Integrindimers gezeigt werden konnte. Auch in der Aggregometrie mit den gleichen Agonisten verhielten sich die LIMP-1-defizienten Blutplättchen ähnlich. Besonders hervorzuheben ist, dass sich auch keine Unterschiede in der Thrombozytenadhäsion unter Fließbedingungen (*Flow-Chamber-Assay*) sowie *in vivo* zeigten. Die Funktionstüchtigkeit der Thrombozyten *in vivo* wurde bestimmt, indem die äußerste Spitze des Mausschwanzes mit einem scharfen Skalpell abgetrennt und anschließend der Blutaustritt über die Zeit verfolgt wurde. Insgesamt sprechen die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse dafür, dass LIMP-1 nicht essenziell für die Funktion der Thrombozyten *in vivo* ist.

Es wäre möglich, dass andere Proteine, z.B. andere Tetraspanine die Funktion von LIMP-1 in den *knock-out*-Thrombozyten übernehmen. Ein möglicher Kandidat ist CD9, ein Tetraspanin, das auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten einen Komplex mit LIMP-1 und dem $\alpha^{\text{IIb}}/\beta_3$ -Integrin-Dimer bildet (Israels et al., 2001). Es wurde in LIMP-1-defizienten Plättchen aber unverändert exprimiert (vergl. Abb. 4.12 D).

Weitere Proteine, die das fehlende LIMP-1 kompensieren könnten, sind die Tetraspanine TSSC6 sowie CD151 (*platelet endothelial tetraspanin antigen-3*, PETA-3). Beide Moleküle interagierten auf der Thrombozytenmembran mit dem $\alpha^{\text{IIb}}/\beta_3$ -Integrin-Dimer (Goschnick et al., 2006; Wright et al., 2004). Sowohl die TSSC6-*knock-out* Maus als auch die CD151^{-/-}-Maus zeigten Hämostasedefekte, die durch längere Blutungszeiten, einen stärkeren Blutverlust und die Tendenz zu erneuten Blutungen gekennzeichnet waren (Goschnick et al., 2006; Wright et al., 2004). Die Ursache für die beeinträchtigte Hämostase könnten in beiden Fällen Defekte im so genannten „*outside-in signalling*“ des $\alpha^{\text{IIb}}/\beta_3$ -Integrinkomplexes sein. Dies äußerte sich *in vitro* in einer schwächeren Plättchen-Aggregation als Antwort auf niedrige Kollagen- oder *protease-*

activated-receptor-4-agonistischen Peptid-Konzentrationen, in einer verlangsamten Thrombus-Zusammenballung und einer geringeren Ausbreitung von Blutplättchen auf Fibrinogen (Goschnick et al., 2006; Lau et al., 2004).

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass LIMP-1 keine essenzielle Funktion für die Thrombozyten-Funktion *in vivo* besitzt oder dass andere Proteine in der *knock-out*-Situation die Funktion von LIMP-1 übernehmen. Es wäre interessant, die Plättchenfunktion in LIMP-1, CD9, CD151 und TSSC6 mehrfach defizienten Mäusen zu untersuchen, um mögliche Redundanzeffekte zu erfassen.

5.1.7 LIMP-1^{-/-}-Mäuse weisen Einschlüsse in den Hauptzellen der Sammelrohre der Niere auf, deren Funktion beeinträchtigt ist

Die Organe LIMP-1-defizienter Mäuse waren histologisch sowohl lichtmikroskopisch als auch elektronenmikroskopisch nahezu vollständig unauffällig. Einzig auffällig waren abnormale Ansammlungen membranumgrenzter Organellen mit Anhäufungen lamellären Materials in den Hauptzellen des Sammelrohres der Niere zwölf Monate alter LIMP-1^{-/-}-Mäuse. Diese Veränderungen konnten in entsprechenden Wildtyp-Tieren nicht gefunden werden und schienen altersabhängig zu sein, da sie in drei Monate alten LIMP-1^{-/-}-Mäusen nicht nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt). Die Identität des gespeicherten Materials ist unklar, da sich dessen Analyse aufgrund des geringen Probenvolumens schwierig gestaltet. Eine Kombination aus Laser-gestützter Mikrodissektion (*laser capture microdissection*) und Massenspektrometrie, die bisher zur Proteomanalyse bestimmter Zellpopulationen eingesetzt wurde (Gozal et al., 2006), könnte ein Ansatz zur Identifikation des Speichermaterials sein. Ebenso ist unbekannt, um welche Art von Zellorganell, z.B. Endosomen oder Lysosomen, es sich bei den „Speichervakuolen“ handelt. Die Akkumulation von bestimmten Molekülen innerhalb der Zelle ist ein charakteristisches Merkmal einer lysosomalen Fehlfunktion.

Northern-Blot-Untersuchungen haben ergeben, dass LIMP-1 in der Maus besonders stark in der Niere exprimiert wird. Auch Sincock *et al.*, 1997, konnten in der humanen Niere eine deutliche Expression des LIMP-1-Proteins im Glomerulus, dem proximalen und distalen Konvolut sowie im Sammelrohr zeigen.

Zur Untersuchung der Auswirkungen der morphologischen Veränderung in den Hauptzellen der Sammelrohre wurde im Rahmen dieser Arbeit mithilfe metabolischer Käfige eine detaillierte Analyse der Nierenfunktion durchgeführt. Es zeigte sich, dass zwölf Monate alte LIMP-1^{-/-}-

Mäuse signifikant größere Urinmengen abgaben und eine entsprechend gesteigerte Wasseraufnahme durch Trinken zeigten. Während die Osmolalität des LIMP-1^{-/-}-Urins signifikant reduziert war, blieben die insgesamt abgegebenen Mengen an Elektrolyten, Phosphat, Harnstoff, Creatinin und Glukose unverändert zwischen beiden Genotypen. Die Plasmaosmolalität blieb ebenfalls unverändert im Vergleich von LIMP-1^{-/-}- zu LIMP-1^{+/+}-Tieren (Daten nicht gezeigt), so dass von einer ausbalancierten, gesteigerten Wasserdiurese auszugehen ist. Interessanterweise waren auch die einzelnen Kotballen LIMP-1-defizienter Mäuse größer und auch augenfällig feuchter im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Eine quantitative Analyse zeigte, dass die Trockenmasse zwischen den Genotypen nahezu identisch war, während der Wassergehalt deutlich erhöht war. LIMP-1-defiziente Mäuse zeigten deshalb neben dem höheren renalen auch einen gesteigerten fäkalen Wasserverlust.

5.1.8 Es liegt keine veränderte Expression oder Fehlverteilung des Wasserporenproteins Aquaporin-2 in LIMP-1-defizienten Sammelrohr-Hauptzellen vor

Eines der wichtigsten Proteine für den regulierten Wassertransport in Säugetieren ist das Aquaporin 2 (AQP-2) (Sasaki und Noda, 2007), ein wasserleitendes Porenprotein der Sammelrohrhauptzellen. Die Menge an luminal membranständigem AQP-2 unterliegt einer strengen hormonellen Kontrolle und bestimmt das Ausmaß der Wasserrückresorption in diesem Nephronabschnitt. Ein Pool aus rekrutierbarem AQP-2 befindet sich in intrazellulären Vesikeln dicht unterhalb der luminalen Membran. Unter Durstbedingungen stimuliert das aus dem *Hypothalamus* stammende Peptidhormon Vasopressin (Antidiuretische Hormon, ADH, Adiuretin) über den Vasopressin-Typ-2-Rezeptor die Einlagerung der intrazellulären AQP-2-Vesikel in die apikale Membran (vergl. Abb. 5.1 A). Mutationen im Gen von AQP-2 führen zur erblichen Form des *Diabetes Insipidus renalis*, einer Krankheit, die aufgrund der fehlenden Wasserresorption im Sammelrohr durch eine verringerte Urinosmolalität, Polyurie (vermehrte Urinausscheidung) und damit verbundener Polydipsie (vermehrtes Trinken) charakterisiert ist (Sasaki und Noda, 2007). Dieses Krankheitsbild stimmt qualitativ mit dem Nierenphänotyp der LIMP-1-defizienten Mäuse überein. Deshalb wurde bei weiteren Untersuchungen von der Hypothese ausgegangen, dass in LIMP-1-defizienten Sammelrohrhauptzellen evtl. der intrazelluläre Transport bzw. die intrazelluläre Verteilung des AQP-2 gestört sein könnte.

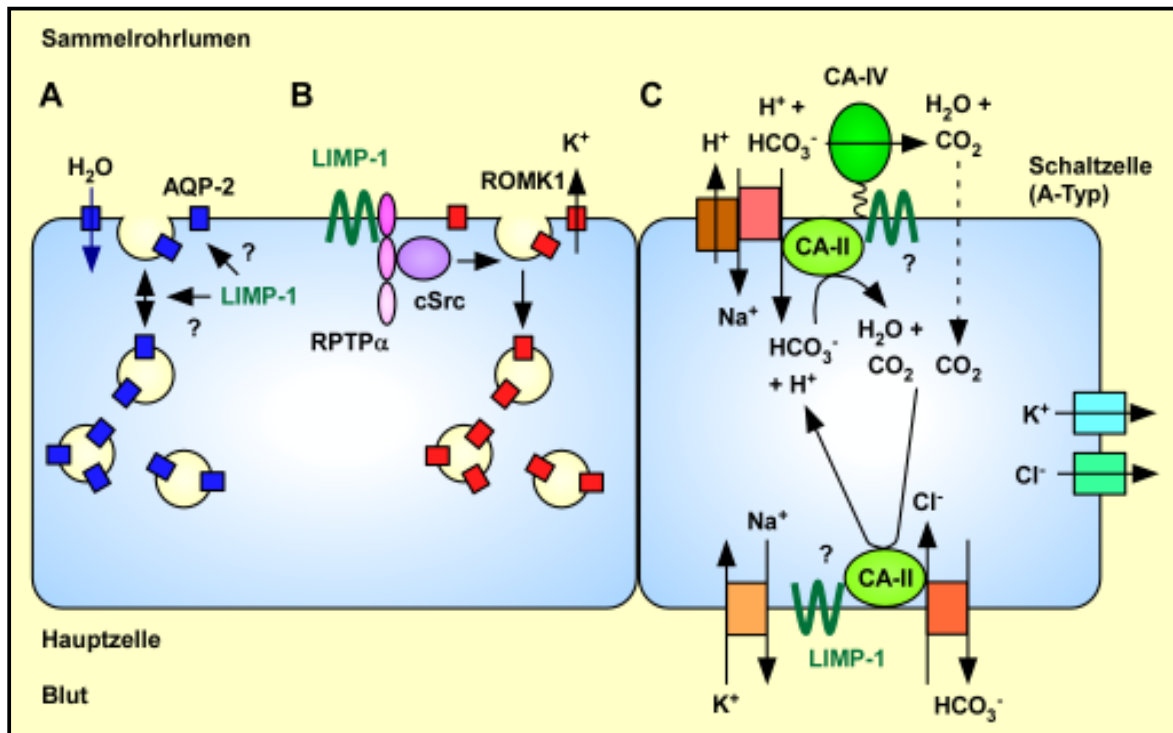


Abb. 5.1 Mögliche Bedeutung von LIMP-1 in der Niere A) Aquaporin-2 (AQP-2) wird in den Hauptzellen des Sammelrohrs der Niere exprimiert. Das Wasserporenprotein wird zunächst in kleinen Vesikeln unterhalb der apikalen Membran gelagert und in einer Wassermangelsituation nach Stimulation mit dem antidiuretischen Hormon Vasopression in die apikale Membran eingelagert. Es ist offen, ob LIMP-1 eine Funktion beim Transfer von AQP-2 in die bzw. aus der apikalen Membran besitzt oder direkt die Leitfähigkeit des Wasserkanals beeinflusst. B) ROMK1 ist Mitglied der Familie der einwärts-gleichrichtenden Kaliumkanäle (*inward rectifier*). ROMK1 wird in den Sammelrohrhauptzellen exprimiert und ist wichtig für die K⁺-Sekretion. LIMP-1 ist Teil eines Signalkomplexes aus der Rezeptor-gebundenen Proteintyrosinphosphatase α (RPTP α) und der Proteintyrosinkinase c-Src, der bei Kaliummangel die Endozytose von ROMK1 induziert (Lin et al., 2008). C) Die Carboanhydrase II (CA-II) katalysiert die reversible Hydratation von CO₂ und interagiert mit verschiedenen Bicarbonat-Transportern in den Schaltzellen des Sammelrohrs (nach Purkerson und Schwartz, 2007). Auf diese Weise spielt die CA-II eine wichtige Rolle im Säure-Base-Haushalt der Körpers. Bis jetzt ist unklar, ob LIMP-1 ebenfalls ein Bestandteil des „CA-II-Bikarbonat-Transportmetabolons“ ist.

Diese Hypothese wird von Beobachtungen unterstützt, die zeigen, dass LIMP-1 Einfluss auf den intrazellulären Transport bestimmter Proteine nehmen kann. Duffield *et al.* haben 2003 eine Interaktion von LIMP-1 mit der β -Untereinheit der H⁺,K⁺-ATPase in den Parietalzellen des Magens nachgewiesen. Beide Proteine koloalisieren im tubulo-vesikulären Kompartiment unterhalb der apikalen Membran. In Cos7-Zellen führte die Überexpression von LIMP-1 zu einer AP-2- und AP-3-vermittelten verstärkten endozytotischen Aufnahme der β -Untereinheit der

H⁺,K⁺-ATPase (Duffield et al., 2003). In der LIMP-1-defizienten Maus konnten jedoch keine histologischen Abnormalitäten der Parietalzellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt) und die intrazelluläre Verteilung der H⁺,K⁺-ATPase war unverändert wie immunohistochemische Untersuchungen zeigten (Daten nicht gezeigt). Schließlich zeigten die LIMP-1^{-/-}-Mäuse kein von Wildtyp-Tieren abweichendes Fressverhalten und einen normalen Gewichtsverlauf, sodass neben dem erhöhten fäkalen Wasserverlust keine Hinweise auf eine relevante Fehlfunktion des Magen-Darm-Traktes vorlagen.

Nicht nur die H⁺,K⁺-ATPase des Magens interagiert mit LIMP-1, sondern auch die H⁺,K⁺-ATPase des Kolons, wie ein *Yeast-two-Hybrid-Screen* und Immunoprecipitations-Studien zeigten (Codina et al., 2005). Allerdings schien im Kolon die α -Untereinheit der H⁺,K⁺-ATPase der direkte Interaktionspartner von LIMP-1 zu sein. Die Ausschaltung von LIMP-1 in Hek293-Zellen führte zu einer verstärkten Oberflächenexpression der überexprimierten α -Untereinheit der H⁺,K⁺-ATPase (Codina et al., 2005). Es ist bisher unklar, ob eine Fehlverteilung der H⁺,K⁺-ATPase im Kolon der LIMP-1^{-/-}-Maus vorliegt, welche Auswirkung diese Fehlverteilung auf die Funktion des Kolons der LIMP-1^{-/-}-Maus hat, und ob in dieser Fehlverteilung die Ursache für die vermehrte Wasserabgabe über den Kot liegt.

Um zu überprüfen, ob die vermehrte Diurese der LIMP-1^{-/-}-Maus auf eine Fehlverteilung des AQP-2 in den Hauptzellen der Sammelrohre der Niere zurückzuführen ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit immunohistochemische Untersuchungen sowohl an Nierenschnitten als auch an isolierten Sammelrohren durchgeführt. Bei der verfügbaren räumlichen Auflösung zeigten sich keine Veränderungen in der Expression und intrazellulären Lokalisation von AQP-2 zwischen LIMP-1-defizienten Mäusen und Wildtyp-Tieren. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass LIMP-1 generell nur den endozytotischen Vesikelfluss beeinflusst oder im Speziellen keine Interaktion mit dem AQP-2 eingeht. Es ist offen, ob LIMP-1 direkt den Wasserstrom durch das AQP-2 in der apikalen Membran beeinflusst. Die Vasopressin-Konzentration im Plasma von zwölf Monate alten LIMP-1^{-/-}-Männchen war im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Tieren ebenfalls unverändert (Daten nicht gezeigt). Da die Vasopressin-Ausschüttung und die intrazelluläre Verteilung von AQP-2 in der Niere unabhängig von LIMP-1 zu sein scheint, muss in zukünftigen Experimenten der Einfluss von LIMP-1 auf verschiedene andere Kanalproteine oder Transporter der Niere untersucht werden.

5.1.9 ROMK, CA-II und Integrine: Proteine, deren Funktion in der LIMP-1-defizienten Niere beeinträchtigt sein könnte

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass LIMP-1 im Zusammenspiel mit der Rezeptor-gebundenen Proteintyrosinphosphatase α (RPTP α), einem Typ-I-Transmembranprotein (den Hertog et al., 1999), die Aktivierung von c-Src und die Endozytose und Inaktivierung der ROMK-*Splice*-Isoform ROMK1 in den kortikalen Sammelrohrhauptzellen vermittelt (vergl. Abb. 5.1 B; Lin et al., 2008). ROMK1 (*Renal Outer Medullary Potassium (K^+) Channel*), wird auch als *Inwardly Rectifying K^+ -Kanal 1.1* ($K_{ir1.1}$) bezeichnet (Hebert et al., 2005). ROMK wird in der apikalen Membran sowohl von Zellen des dicken aufsteigenden Schenkels der Henleschen Schleife (Bleich et al., 1990) als auch von Sammelrohr-Hauptzellen exprimiert. In beiden Zelltypen ermöglicht der Kanal den passiven Rückfluss von Kaliumionen in das Tubuluslumen (Hebert et al., 2005).

Mutationen im Gen von ROMK führen zum so genannten Bartter Syndrom, einer autosomal-rezessiven Erbkrankheit, die u.a. durch einen hohen Salzverlust über den Urin, eine Volumenverringerng der extrazellulären Flüssigkeit, niedrigen Blutdruck und Hyperkalziurie gekennzeichnet ist (Ashcroft, 2000).

In LIMP-1-defizienten Mäusen müsste ROMK1 vermehrt in der apikalen Membran der kortikalen Sammelrohrhauptzellen lokalisiert sein und es müsste mehr Kalium mit dem Harn ausgeschieden werden. Dies wurde aber nicht beobachtet (vergl. Tab. 4.4). Eventuell kompensieren andere, bisher nicht identifizierte Ionenkanäle oder Transporter die potenzielle Fehlfunktion von ROMK1. Eventuell wirkt sich die LIMP-1-Defizienz auch auf die ROMK-*Splice*-Varianten 2 und 3 des dicken aufsteigenden Schenkels der Henleschen Schleife aus. Dies ist aber insofern unwahrscheinlich, als die apikale Expression dieser Isoformen nicht über Phosphorylierung und Endozytose reguliert wird (Gu et al., 2001). Dennoch ist ROMK ein wichtiger Kandidat zur Erklärung des Nierenphänotyps der LIMP-1-defizienten Maus, dessen Expression zunächst in immunohistologischen Experimenten überprüft werden soll.

Eine weitere Proteinfamilie, die in den LIMP-1-defizienten Nieren fehlreguliert sein könnte, sind die Carboanhydrasen (CA). Azetazolamid, ein Inhibitor der CA, der früher auch als Diuretikum eingesetzt wurde, zeigt ein Nebenwirkungsprofil, das Störungen im Wasser- und Elektrolythaushalt umfasst und dem Phänotyp der LIMP-1^{-/-}-Maus ähnelt (Aktories et al., 2005). Als Vertreter dieser Proteinfamilie wurde in dieser Arbeit zunächst die Carboanhydrase-Isoform II (CA-II) genauer untersucht (Purkerson und Schwartz, 2007). Das zytoplasmatische Zink-

Metalloenzym katalysiert die reversible Hydratation von CO_2 und wird in fast allen Nephronsegmenten exprimiert, d.h. im proximalen Tubulus, im dünnen absteigenden und im dicken aufsteigenden Schenkel sowie in den Schaltzellen des Sammelrohrs (Schwartz, 2002). Die CA-II ist in sogenannten $\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$ -Transport-Metabolons mit verschiedenen Bicarbonat-Transportern assoziiert wie dem $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Anionenaustauscher AE1 der Erythrozytenmembran oder den $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransportern NBC1 und NBC3 (vergl. Abb. 5.1 C). Die Interaktion wird über saure Erkennungsmotive in den C-Termini der Transporter vermittelt und führt zu einem schnelleren Bicarbonat-Transport (McMurtrie et al., 2004). Ebenfalls konnte eine Assoziation der CA-II mit dem Na^+/H^+ -Ionenaustauscher NHE1 der Niere nachgewiesen werden (Li et al., 2002). Es ist unbekannt, ob LIMP-1 als „*Molecular Facilitator*“ ein Teil des Bicarbonat-Transport-Metabolons ist.

In CA-II-defizienten Mäusen war die innerhalb von 24 Std abgegebene Urinmenge zwar vergleichbar zu Wildtyp-Tieren, aber der pH-Wert des Urins war erhöht (Brechue et al., 1991). Im Blut der CA-II^{-/-}-Mäuse wurde ein erniedrigter pH-Wert sowie ein erhöhter CO_2 -Partialdruck festgestellt (Lien und Lai, 1998). Ähnliche signifikante Veränderungen konnten in den LIMP-1-defizienten Mäusen nachgewiesen werden (vergl. Tab. 4.5). Die genaue Ursache dieser Veränderungen in den LIMP-1^{-/-}-Mäusen muss noch geklärt werden. Immunohistologische Untersuchungen ergaben keinerlei Hinweis auf eine veränderte Expression oder Lokalisation der CA-II in der Niere (Daten nicht gezeigt). Es wurden ebenfalls keine deutlichen Unterschiede in der Expression und Lokalisation der $\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$ -Transport-Metabolon-CA-II-Interaktionspartner AE1 (McMurtrie et al., 2004) und Pendrin (Slc26a4; Sun et al., 2008) festgestellt (Daten nicht gezeigt). Es ist wichtig, in zukünftigen Experimenten eine mögliche Interaktion zwischen LIMP-1 und Proteinen des $\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$ -Transport-Metabolons festzustellen und die funktionellen Auswirkungen der LIMP-1-Defizienz auf diese Proteine, z.B. in Oozyten-Versuchen zu testen.

Die LIMP-1^{-/-}-Maus ist nicht die einzige Tetraspanin-defiziente Maus, die pathologische Veränderungen der Niere aufweist. Auch die CD151^{-/-}-Maus ist durch eine Nephropathie gekennzeichnet (Sachs et al., 2006). CD151 wird u.a. in den Glomeruli sowie in den proximalen und distalen Tubuli der Niere exprimiert (Sincock et al., 1997; Sterk et al., 2002) und assoziiert, vergleichbar mit LIMP-1, mit den Laminin-bindenden Integrinen α^3/β_1 , α^6/β_1 und α^7/β_1 (Boucheix und Rubinstein, 2001; Hemler, 2005; Sterk et al., 2000; Sterk et al., 2002), wobei die Interaktion mit dem α^3/β_1 -Integrinkomplex besonders stark ausgeprägt ist (Yauch et al., 1998). CD151^{-/-}-Mäuse entwickelten ab der dritten Lebenswoche eine massive Proteinurie, die durch fokale

Glomerulosklerose, Disorganisation der glomerulären Basalmembran und tubuläre, zystische Erweiterungen hervorgerufen wurde (Sachs et al., 2006). Patienten mit einer *nonsense*-Mutation im CD151-Gen leiden ebenfalls unter einer Nephropathie mit Nierenversagen im Endstadium und zusätzlich unter regional begrenzter Bläschenbildung der Haut (*Epidermolysis bullosa*) sowie sensorineuraler Taubheit (Crew et al., 2004). In LIMP-1-defizienten Mäusen konnten weder histologisch glomeruläre oder tubuläre Veränderungen noch eine Proteinurie (Daten nicht gezeigt) detektiert werden. Dennoch ist es wichtig in zukünftigen histologischen sowie Zelladhäsions- und Migrationsexperimenten die Expression und Funktion verschiedener Integrine in LIMP-1-defizienten Zellen und Geweben zu untersuchen. LIMP-1 wird nämlich eine bedeutende Funktion bei der Zelladhäsion beigemessen, indem es mit verschiedenen Integrinen interagiert wie dem $\beta 1$ -Integrin in humanen Melanomazellen (Radford et al., 1996), mit dem $\alpha^3/\beta 1$ -Integrinkomplex in Lymphozyten und Melanomazellen (Berditchevski et al., 1995; Berditchevski et al., 1996), mit dem $\alpha^4/\beta 1$ -Komplex in T-Lymphoblasten (Mannion et al., 1996) und dem $\alpha^6/\beta 1$ -Dimer in verschiedenen Zelllinien (Berditchevski et al., 1996).

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass das auffallendste Merkmal der LIMP-1-defizienten Maus eine erhöhte Diurese ist, deren Ursache bis jetzt ungeklärt ist. Eventuell hat die Abwesenheit von LIMP-1 eine (negative) Wirkung auf den intrazellulären Transport, den Abbau oder die Funktion verschiedener potenzieller Interaktionspartnern des Tetraspanins wie z.B. AQP-2, ROMK oder die Carboanhydrase II. Die Suche nach potenziellen LIMP-1-Interaktionspartnern in der Niere durch Koimmunopräzipitations-Experimente wurde bisher durch das Fehlen eines Antikörpers verhindert, der murines LIMP1 im nativen Zustand erkennt. Eine alternative Möglichkeit wäre die Suche von Interaktionspartnern mit Hilfe eines *Split-Ubiquitin-Yeast-two-Hybrid-Screenings*, das speziell für Transmembranproteine entwickelt wurde.

5.2 Die Identifikation von LIMP-2 als intrazellulären Transporter der β -Glukocerebrosidase

In dieser Arbeit wurde eine neue Funktion des lysosomalen integralen Membranproteins 2 (LIMP-2) entdeckt. LIMP-2 fungiert als Transporter der lysosomalen Hydrolase β -Glukocerebrosidase (β GC) zum Lysosom. Während die meisten lysosomalen Enzyme über den inzwischen gut charakterisierten Mannose-6-Phosphatrezeptor (MPR)-abhängigen Weg an ihr Ziel innerhalb der Säugetierzelle gelangen, war der Mechanismus, durch den die β GC an ihren Bestimmungsort gelangt, bisher unbekannt. Die β GC ist nicht an ihren Zuckerseitenketten phosphoryliert, wie Aerts *et al.*, 1988, mit 32 P-Markierung und PNGase F-Verdau zeigen konnten. Diese Beobachtungen schließen einen MPR-abhängigen Transportweg der β GC zum Lysosom nahezu aus, da das nötige Sortierungssignal, der Mannose-6-Phosphatrest (M6P), nicht an das Enzym angeheftet wird. Dieses Ergebnis wurde durch eine elektronen-mikroskopische Studie bestätigt, in der gezeigt werden konnte, dass die β GC in Fibroblasten, die von Patienten stammten, die unter der *I-Cell*-Erkrankung (ICD) litten, nach wie vor lysosomal und Membran-assoziiert vorlag (van Dongen *et al.*, 1985). Bei der ICD liegen Mutationen im Gen der GlkNAc-Phosphotransferase vor, wodurch keine terminalen M6P-Reste auf lysosomale Enzyme übertragen werden.

Ausgehend von der Beobachtung, dass die β GC *in vitro* mit LIMP-2 assoziiert, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass beide Proteine tatsächlich in den gleichen intrazellulären vesikulären Kompartimenten vorkommen und dass die Aktivität, Menge und Lokalisation der β GC dramatisch mit der An- bzw. Abwesenheit von LIMP-2 korrelierte. Dies zeigte, dass die Unabhängigkeit der β GC von auf Mannose-6-Phosphatresten basierenden Transportmechanismen höchstwahrscheinlich auf dem durch LIMP-2 vermittelten Transfer zum Lysosom beruht. Lysosomale Membranproteine werden, im Gegensatz zu löslichen, MPR-bindenden lysosomalen Proteinen, durch Interaktion von spezifischen Motiven in ihren zytoplasmatischen Schwänzen mit multimeren Adaptorproteinen in Clathrin-ummantelte Vesikel verpackt und so vom Golgi-Apparat zum Lysosom transferiert. Im Fall von LIMP-2 wurde eine Assoziation mit den Adaptorproteinen AP-3 (Höning *et al.*, 1998) und AP-1 (Fujita *et al.*, 1999) vorgeschlagen.

5.2.1 Die Interaktion der β -Glukocerebrosidase mit LIMP-2 beginnt bereits im endoplasmatischen Reticulum

Die Interaktion der β GC mit LIMP-2 ist pH-abhängig, d.h. sie wird mit sinkendem pH-Wert schwächer, wie in *in vitro* Bindungsexperimenten festgestellt wurde (Reczek et al., 2007). Dies würde einer starken Bindung der beiden Proteine aneinander innerhalb der neutralen Umgebung des endoplasmatischen Reticulums (ER) und des Golgi-Apparates entsprechen und die Dissoziation der Proteine in den saueren späten Endosomen und Lysosomen begünstigen. Es ist anzumerken, dass nicht alle Protein-Protein-Interaktionen bei saurem pH-Wert instabil werden. So bleibt die Bindung von Pro-Cathepsin L und seinem Pro-Enzymrezeptor auch bei einem lysosomalen pH-Wert von 5 bestehen (McIntyre et al., 1994; McIntyre und Erickson, 1993).

Dass die Bindung der β GC an LIMP-2 bereits im endoplasmatischen Reticulum erfolgt, wurde durch Koimmunopräzipitations-Experimente bestätigt, in denen eine LIMP-2-Mutante, die ein ER-Retentionssignal trägt und das ER nicht verlässt, eine deutliche Interaktion mit LIMP-2 zeigte. Interessanterweise wird eine Mutante der β GC, L444P, die in homozygoter Ausprägung beim Menschen häufig zu der neuropathischen Form III von Morbus Gaucher führt (Guggenbuhl et al., 2007) und die gewöhnlich im ER zurückgehalten wird (Schmitz et al., 2005), nach Überexpression von LIMP-2 korrekt in die Lysosomen transportiert (Reczek et al., 2007). Diese Ergebnisse weisen nicht nur darauf hin, dass erhöhte LIMP-2-Spiegel von therapeutischem Interesse bei bestimmten β GC-Mutationen sind; sie unterstützen auch die Hypothese, dass die Interaktion zwischen β GC und LIMP-2 bereits im endoplasmatischen Reticulum auftritt. Dies ist anders als beim lysosomalen Transport M6P-abhängiger Proteine (Kornfeld, 1992) oder von Proteinen des *major histocompatibility complex* II (Trombetta und Mellman, 2005), wo die Bindung an den MPR bzw. die invariante Kette und die Abgrenzung vom konventionellen sekretorischen Weg erst nach dem *trans*-Golgi-Netzwerk erfolgt.

5.2.2 LIMP-2 ist für den effizienten Transport der β -Glukocerebrosidase aus dem endoplasmatischen Reticulum notwendig

Bei der Untersuchung des Schicksals neu synthetisierter β GC in Abwesenheit von LIMP-2 konnte in dieser Arbeit beobachtet werden, dass die β GC zunächst im ER zurückgehalten wurde, bevor sie fehlsortiert, d.h. sekretiert wurde. Dies spricht dafür, dass die Bindung von LIMP-2 an die β GC für ein effizientes Verlassen des Enzyms aus dem ER notwendig ist. Es ist unbekannt, ob die β GC ein ER-Retentionsmotiv trägt, welches durch die Bindung von LIMP-2 maskiert

wird, wie es für die α -Kette des hoch affinen Fc-Rezeptors für IgE (Fc ϵ RI) der Fall ist. Bei der Fc ϵ RI- α -Untereinheit wird das ER-Retentionsmotiv von der Fc ϵ RI- γ -Untereinheit maskiert (Kraft und Kinet, 2007). Auf der anderen Seite könnte auch erst durch die Assoziation von LIMP-2 und der β GC ein Signal generiert werden, das für den Transport der beiden Proteine aus dem ER hinaus notwendig ist. Um dies zu überprüfen, müssten β GC-defiziente Zellen auf eine Fehlsortierung von LIMP-2 hin untersucht werden. Es kam zumindest in verschiedenen Fibroblastenlinien von Gaucherpatienten, die unterschiedliche Mutationen trugen (L444P/L444P, N370S/N370S u.a.) zu keiner Fehlsortierung von LIMP-2 (Daten nicht gezeigt).

5.2.3 Die β -Glukocerebrosidase wird bei Abwesenheit von LIMP-2 sekretiert

Die β GC wird bei Abwesenheit von LIMP-2 sekretiert. Dies entspricht der Sekretion von Cathepsin D in MPR-defizienten Fibroblasten (Dittmer et al., 1999). Es kommt zu keiner generellen Destabilisierung/Konformationsänderung des Enzyms und zu keinem Abbau durch das Proteasom wie bei bestimmten β GC-Mutanten (Ron und Horowitz, 2005). Dies zeigten die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit verschiedenen proteasomalen, aber auch lysosomalen Proteaseinhibitoren, die keinen Einfluss auf den schnellen intrazellulären Verlust der β GC hatten.

Um auszuschließen, dass die Abgabe der β GC in den Kulturüberstand auf einen generellen Endozytose-Defekt LIMP-2-defizienter Zellen zurückzuführen ist, wurde die Aufnahme von mit 125 Jod markierter β GC bzw. 125 Jod markiertem Transferrin untersucht. Es konnten keine Unterschiede in der Endozytose-Effizienz zwischen Wildtyp- und LIMP-2-defizienten Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

5.2.4 LIMP-2 verstärkt die Membranassoziation der β -Glukocerebrosidase

Die β GC assoziiert mit Membranen in einer Weise, die von Kohlenhydratseitenketten unabhängig ist (Aerts et al., 1988; Leonova und Grabowski, 2000). Die Anheftung an die Membran bleibt vom ER bis zu den Lysosomen erhalten. Interessanterweise erhöhte die Überexpression von LIMP-2 in Cos7-Zellen die Membranassoziation koexprimierter β GC im Vergleich zur allein exprimierter β GC. Dies unterstreicht die Bedeutung der Interaktion von LIMP-2 und der β GC in allen vesikulären Kompartimenten. Die starke Interaktion der β GC mit LIMP-2 auch innerhalb des Golgi-Apparates wird dadurch verdeutlicht, dass eine sekretierte

LIMP-2-Mutante zu einer starken Fehlsortierung der β GC führte, d.h. zu einer Abgabe des Enzyms in den extrazellulären Raum.

5.2.5 LIMP-2 interagiert mit der β -Glukocerebrosidase vermutlich im Verhältnis 2:2

Die Bindung zwischen LIMP-2 und der β GC wird auf Seiten von LIMP-2 wahrscheinlich durch eine sogenannte *coiled-coil*-Domäne im Bereich der Aminosäuren 150 - 167 vermittelt (Reczek et al., 2007). Welcher Bereich auf Seiten der β GC für die Interaktion mit LIMP-2 verantwortlich ist, ist bislang ungeklärt. Die Suche nach der Bindungsstelle wird dadurch behindert, dass die 3-dimensionale Struktur der β GC sehr komplex ist und sich die einzelnen Domänen des Proteins aus verschiedenen Bereichen der Primärsequenz zusammensetzen (Dvir et al., 2003). Dadurch ist es schwieriger, Mutanten zu erstellen, in denen einzelne Domänen oder Bereiche des Proteins deletiert sind.

Eine weitere Möglichkeit, das LIMP-2-Bindungsmotiv auf Seiten der β GC zu identifizieren, besteht in der Analyse der Interaktionsfähigkeit verschiedener β GC-Mutanten, von denen bekannt ist, dass sie Morbus Gaucher auslösen. Allerdings sind bis jetzt über 200 krankheitsauslösende Mutationen bekannt, die über das gesamte Protein verteilt sind (<http://www.tau.ac.il/lifesci/bioinfo/genedis/gaucher/gaucher.html>). Einige dieser Mutationen hemmen teilweise oder vollständig die katalytische Aktivität. Andere reduzieren die Stabilität des Proteins und wieder andere führen zu einer Zurückhaltung des Proteins im endoplasmatischen Reticulum. Die häufigste Mutation N370S, die 70 % aller mutierten Allele innerhalb der Ashkenazi Juden und 25 % weltweit ausmacht (Beutler, 2006), beeinträchtigt nicht die Bindung der β GC an LIMP-2 (Reczek et al., 2007).

Ein weiteres weit verbreitetes Gaucher-Allel ist die β GC-L444P-Mutante, die im ER zurückgehalten wird (Schmitz et al., 2005). Interessanterweise führte die Überexpression dieses Proteins mit LIMP-2 in Cos7-Zellen zu einem effektiven Transport der Mutante zu den Lysosomen (Reczek et al., 2007). Dies deutet zum ersten darauf hin, dass die Aminosäure L444 der β GC nicht an der Bindung an LIMP-2 beteiligt ist. Zum zweiten unterstreicht diese Beobachtung, dass die β GC und LIMP-2 bereits im ER miteinander interagieren. Zum dritten kann die Überexpression von LIMP-2 zu einem Transport von β GC-Mutanten, die sonst im ER zurückgehalten werden, ins Lysosom führen.

Auch eine dritte, weit verbreitete β GC-Mutante (G202R), die *in vitro* eine annähernd normale enzymatische Aktivität aufweist, *in vivo* aber nicht lysosomal lokalisiert ist (Zimmer et al., 1999), wurde durch Überexpression von LIMP-2 ebenfalls zum Lysosom dirigiert (Reczek et al., 2007).

Im Gegensatz dazu wurde eine weitere klinische Mutante der β GC (P415R), die ebenfalls im ER zurückgehalten wird (Ron und Horowitz, 2005), auch bei Überexpression von LIMP-2 nicht in die Lysosomen dirigiert, sondern akkumulierte weiterhin im ER (Reczek et al., 2007). Ursache hierfür könnte eine direkte oder indirekte Beeinträchtigung der LIMP-2-Bindestelle innerhalb der β GC durch den Aminosäureaustausch sein, obwohl wahrscheinlicher ist, dass die Mutation die Gesamtstruktur der β GC zerstört, wie Strukturmodelle andeuteten (Daten nicht gezeigt).

Vermutlich werden röntgenkristallographische Untersuchungen des LIMP-2/ β GC-Komplexes notwendig sein, um die genaue Struktur und die Interaktionsdomänen beider Proteine exakt zu identifizieren. Vorläufige Quervernetzungs-Experimente, in denen LIMP-2 und die β GC in Cos7-Zellen koexprimiert wurden, zeigten einen Proteinkomplex von etwas 250 kDa, was einem Heterotetramer aus zwei β GC- und zwei LIMP-2-Molekülen entsprechen würde.

5.2.6 Recycling von LIMP-2 vom Lysosom zum Golgi-Apparat

Es ist noch unklar, ob LIMP-2 wie der Mannose-6-Phosphatrezeptor von den Endosomen zum Golgi-Apparat bzw. zum ER recyceln kann. Dadurch, dass über 90 % der gesamten zellulären Population von LIMP-2 im Lysosom residiert, ist es schwierig, dieses Protein im Transfer zwischen ER, Golgi, Endosomen und Lysosomen zu detektieren. Eine Möglichkeit wäre die Expression von LIMP-2 unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-abhängigen Promotors in LIMP-2-defizienten Zellen. Man würde die Zellen über eine bestimmte Zeitspanne LIMP-2 exprimieren lassen und danach den Promotor ausschalten. Anschließend wartete man einige Stunden, bis die gesamte Population von LIMP-2 das Lysosom erreicht hätte und würde die Zellen sodann mit einem β GC-Expressionskonstrukt transfizieren. Mit Hilfe eines *Tags* an der β GC könnte man zwischen endogener, alter β GC und der neu synthetisierten β GC unterscheiden. Nach einer bestimmten Zeitspanne würden die Zellen immunozytochemisch untersucht werden. Eine Lokalisation der „getaggen“ β GC im Lysosom würde dafür sprechen, dass LIMP-2 einem kontinuierlichen *Cycling*-Prozess unterliegt. Wäre die β GC dagegen im ER befindlich, deutete dies an, dass LIMP-2 nur einmal den Weg vom ER zum Lysosom gehen kann.

5.2.7 Andere Bindungspartner von LIMP-2

Bis jetzt gibt es keine Erkenntnisse darüber, ob auch andere lysosomale Enzyme an LIMP-2 binden und von diesem Protein transportiert werden. In affinitäts-chromatographischen Experimenten mit Mausleberextrakten konnten bisher keine anderen Proteine identifiziert werden, die spezifisch an LIMP-2 binden (Reczek et al., 2007). Außerdem konnte *in vitro* ebenfalls keine Assoziation von LIMP-2 mit den lysosomalen Enzymen α -Galaktosidase oder α -Glukosidase beobachtet werden. Dies spricht eher für eine spezifische Interaktion von LIMP-2 mit der β GC.

Aufgrund einer ähnlichen Topologie mit zwei Transmembrandomänen und einer Identität in der Aminosäuresequenz von ca. 30 % gehört LIMP-2 zur *CD36-scavenger receptor-like* Protein-Familie (Vega et al., 1991). Bei CD36 selbst handelt es sich um einen in der Plasmamembran befindlichen multifunktionellen Rezeptor für verschiedene Lipide, Kollagen und Thrombospondin-1 (TSP-1; Krieger, 2001). Obwohl ca. 34 % der Aminosäuren der luminalen Domäne von LIMP-2 und CD36 identisch sind, bindet die β GC unter Versuchsbedingungen, in denen sie an LIMP-2 bindet, nicht an CD36 (Reczek et al., 2007). Der Anti-Angiogenese-Faktor TSP-1 bindet dagegen sowohl an CD36 als auch an LIMP-2 (Asch et al., 1987; Crombie und Silverstein, 1998). Die unterschiedliche Fähigkeit dieser beiden Familienmitglieder der β GC-Bindung legt nahe, dass die β GC als Ligand eine höhere Spezifität für LIMP-2 hat als TSP-1. LIMP-2 ist hauptsächlich in intrazellulären, membranumhüllten Kompartimenten zu lokalisiert und nur geringe Mengen des Proteins sind auf der Zelloberfläche zu finden (Okazaki et al., 1992; Suárez-Quian, 1987). TSP-1 ist dagegen ein Protein der extrazellulären Matrix, das vermutlich nur zur Degradation ins Lysosom transportiert wird (Forsslöw et al., 2007). Daher ist es wahrscheinlich, dass die Interaktion zwischen LIMP-2 und TSP-1 unter physiologischen Bedingungen gering ist. Es könnte sein, dass es zwei Untergruppen der CD36-Familie gibt: Proteine wie LIMP-2, die intrazellulär agieren, und solche wie CD36, die v.a. auf der Zelloberfläche wirken.

5.2.8 LIMP-2 als Krankheitsgen im Menschen

Interessanterweise wurde LIMP-2 in einer kürzlich erschienenen Studie als Krankheitsgen für das „*Action Myoclonus Renal Failure Syndrom*“ (AMRF) identifiziert (Berkovic et al., 2008). Alle drei bei AMRF-Patienten identifizierten Mutationen im Gen für LIMP-2 führen zu einem kompletten Funktionsverlust des LIMP-2 Proteins. Beim AMRF handelt es sich um eine sehr

seltene Nierenerkrankung, die mit einer progressiv verlaufenden myoklonalen Epilepsie und der Ablagerung von bislang nicht näher definiertem Speichermaterial im Gehirn dieser Patienten assoziiert ist (Berkovic et al., 2008). In LIMP-2-defizienten Gehirnen, in denen eine stark reduzierte Expression der β GC festgestellt wurde, wurde vergleichbares Speichermaterial gefunden wie bei AMRF-Patienten. Inwieweit der lysosomale Transport der β GC in Gehirnen von AMRF-Patienten gestört ist und im Zusammenhang mit der neuronalen Speicherung steht, ist noch unklar. Im gleichen Zusammenhang werden zukünftige Experimente zeigen, ob LIMP-2 eine Bedeutung für die neuronale Speicherung hat, die bei bestimmten Gaucher-Patienten festgestellt wurde.

5.2.9 Modell der Interaktion von LIMP-2 und der β -Glukocerebrosidase

In Abb. 5.2 werden die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über LIMP-2 als den intrazellulären Transporter der β GC zusammengefasst. Mannose-6-Phosphatrezeptor (MPR)-abhängige lysosomale Hydrolasen werden im Golgi-Apparat mit einem Mannose-6-Phosphatrest versehen, der sodann von MPRs erkannt wird. Daraufhin werden die MPRs zusammen mit ihrer Fracht in Clathrin-umhüllte Vesikel verpackt, die die Enzyme zum Lysosom dirigieren (s. Abb. 5.2 B; Storch und Braulke, 2005). Fehlen die MPRs kommt es zur Sekretion vieler lysosomaler Hydrolasen (s. Abb. 5.2 A).

Die β GC wird wie alle lysosomalen Hydrolasen in das Lumen des endoplasmatischen Reticulums (ER) synthetisiert. Im ER erfolgt im Gegensatz zu MPR-abhängig sortierten Enzymen bereits die Bindung der β GC an ihren Transporter LIMP-2, wie die Untersuchungen mit einer LIMP-2-ER-Retentionsmutante zeigten (s. Abb. 5.2 A). Vermutlich durchläuft der Komplex aus β GC und LIMP-2 gemeinsam den Golgi-Apparat, bevor die Proteine gemeinsam im TGN AP-1- oder AP-3-abhängig in Transportvesikel verpackt und zum Lysosom befördert werden. Ein weiterer Unterschied zwischen dem MPR- und dem LIMP-2-vermittelten Transport besteht darin, dass der MPR bereits im endosomalen Kompartiment seine Fracht entlässt und zum TGN zurückkehrt, während LIMP-2 die β GC bis ins Lysosom hinein begleitet. Bis jetzt ist unklar, ob LIMP-2 ebenfalls die Fähigkeit besitzt, an einem gewissen Punkt auf seinem Transportweg die β GC zu entlassen und in das ER oder TGN zurückzukehren. In LIMP-2-defizienten Zellen (s. Abb. 5.1 B) kommt es entsprechend der Sekretion von Cathepsin D in MPR-defizienten Fibroblasten (Dittmer et al., 1999) zu einer Sekretion der β GC in den extrazellulären Raum.

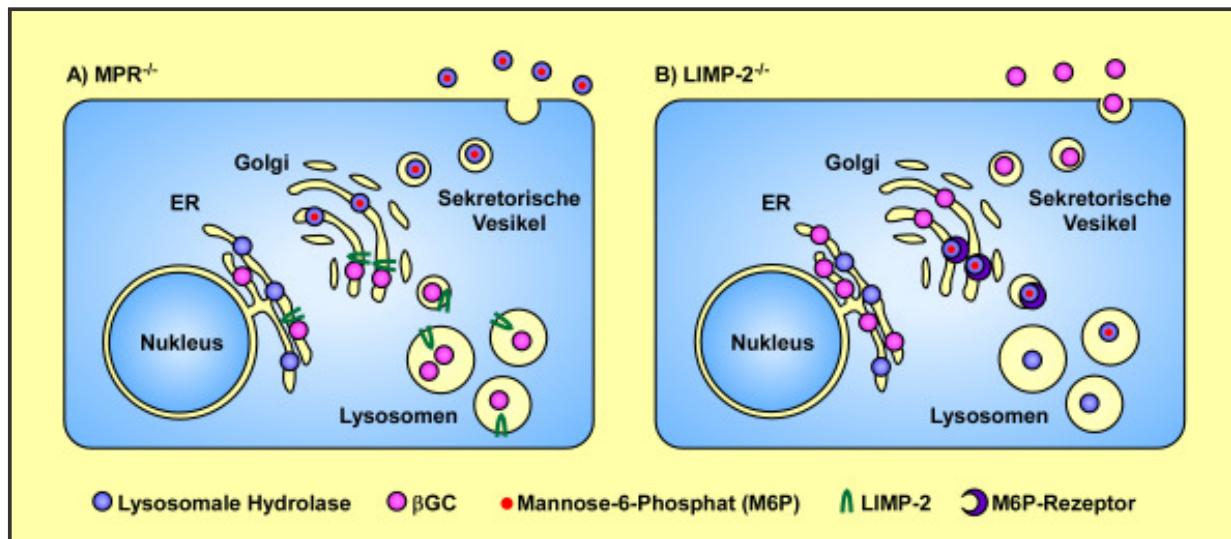


Abb. 5.1: Sortierungsdefekte in Zellen mit einer Defizienz der Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren im Vergleich zu Zellen mit einer Defizienz von LIMP-2. A) Die βGC wird unabhängig von M6P-Rezeptoren in das Lysosom transportiert, während M6P-tragende lysosomale Enzyme sekretiert werden. B) Fehlt dagegen LIMP-2, erhalten die Zellen über die M6P-Rezeptoren lysosomale Enzyme in das Lysosom geliefert. Dagegen wird die βGC sezerniert und nicht in Lysosomen angetroffen.

5.2.10 Die Bedeutung der Entdeckung von LIMP-2 als intrazellulärer Transporter der β-Glukocerebrosidase

Die in dieser Arbeit beschriebene Entdeckung von LIMP-2 als intrazellulärer Transporter der βGC ist zum einen ein völlig neu entdeckter Transport-Mechanismus innerhalb der Säugetierzelle und kann zum anderen zu einem besseren Verständnis und eventuell einer besseren Therapie der Erbkrankheit Morbus Gaucher führen.

Während die nicht-neuropathische Form von Morbus Gaucher (Typ I) durch Enzymersatztherapie bereits gut therapierbar ist, bestehen nach wie vor große Probleme bei Behandlung der neuropathischen Gaucher-Formen II und III (Kolter und Sandhoff, 2006), da die bei der Enzym-Substitutionstherapie applizierte rekombinante βGC nicht in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden.

Kürzlich konnte anhand eines Mausmodells gezeigt werden, dass trotz der starken Akkumulation von Glukosylceramid in Mikrogliazellen im Gehirn und deren anschließender starker Aktivierung, diese Zellen wahrscheinlich nicht für die Symptome der neuropathischen Gaucher-Formen verantwortlich sind (Enquist et al., 2007). Dies schmälert erheblich die Hoffnung, diese Krankheit durch Transplantation hämatopoetischer Stammzellen behandeln zu können. Eventuell

ist es in Zukunft möglich, in hämatopoetischen Stammzellen eine Sekretionsmutante von LIMP-2, z.B. die luminale Domäne dieses lysosomalen Transmembranproteins, zu überexprimieren, so dass diese Zellen die β GC sekretieren. Nach Transplantation dieser Zellen bestünde die Möglichkeit, dass diese Zellen als Mikrogliazellen in das Gehirn von Gaucher-Typ-II- oder -III-Patienten einwandern und so den betroffenen Neuronen β GC exogen zur Verfügung stellen.

Eine weitere praktische Anwendung der Entdeckung von LIMP-2 als intrazellulären Transporter der β GC besteht darin, mittelfristig die Kosten für die Produktion des zur Enzym-Substitutionstherapie verwendeten Enzyms zu senken. Bisher wird die β GC in CHO-Zellen rekombinant hergestellt (Grabowski et al., 1995). Dabei belaufen sich die Kosten für die Behandlung eines Patienten pro Jahr auf 500.000 US \$ (Sawkar et al., 2006). Würde man jedoch für die Herstellung der β GC Zellen verwenden, in denen das LIMP-2-Gen gentechnisch ausgeschaltet wurde bzw. die eine Sekretionsmutante des LIMP-2-Proteins überexprimieren, würde die β GC in den Zellkulturüberstand abgegeben werden. Dies würde den Aufreinigungsprozess des Enzyms vereinfachen und dadurch die Kosten für die Herstellung des Medikamentes senken.

Schließlich könnte versucht werden, durch kleine Moleküle, ähnlich wie bei molekularen Chaperonen, die Interaktion der β GC und LIMP-2 zu verstärken und so die Menge mutierter β GC in den Lysosomen von Morbus-Gaucher-Patienten zu erhöhen. In ähnlicher Weise konnte bereits durch die Überexpression von LIMP-2 die β GC-Mutante L444P vermehrt zum Lysosom transportiert werden (Reczek et al., 2007). Wäre der Wirkstoff in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, würde dies eine neue Therapie-Möglichkeit für Patienten darstellen, die unter einer neuropathogenen Form von Morbus Gaucher leiden, unter der Voraussetzung, dass die β GC dieser Patienten noch eine enzymatische Restaktivität aufweist.

5.3 Ausblick

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal eine Maus beschrieben, die eine Defizienz im lysosomalen integralen Membranprotein LIMP-1 aufwies. Es konnte keine Beeinträchtigung der generellen lysosomalen Funktion sowie der Thrombozytenfunktion nachgewiesen werden. Ebenfalls wurden keine generellen Abnormalitäten innerhalb einzelner Immunzellsubpopulationen dieser Maus festgestellt. In Zukunft gilt es nun, mögliche Effekte der LIMP-1-Defizienz auf die Funktion verschiedener Immunzellsubpopulationen zu untersuchen.

Ein wichtiger Ansatz ist hierbei, die Adhäsions- und Migrationsfähigkeit von z.B. Makrophagen, neutrophilen Granulozyten oder dendritischen Zellen *in vitro* zu untersuchen. Ebenfalls soll *in vitro* die Fähigkeit dieser Zellen untersucht werden, Pathogene zu phagozytieren, zu prozessieren und zu präsentieren. Schließlich soll in verschiedenen Immunisierungsszenarien die Funktionalität des gesamten Immunsystems der LIMP-1^{-/-}-Maus *in vivo* untersucht werden. Hierzu soll als Modellantigen das Hapten Trinitrophenol (TNP) verwendet werden. TNP kann durch Kopplung an das Polysaccharid Ficoll als T-Zell-unabhängiges Antigen der Klasse II dienen oder es fungiert nach Kopplung an Ovalbumin (OVA) oder das Hämocyanin der Schlüssellochnapfschnecke (KLH) als T-Zell-abhängiges Antigen. Durch Kopplung von TNP an Schafserythrozyten erhält man ein korpuskuläres Antigen. Durch Messung der Hapten-spezifischen Antikörper ist es möglich, die humorale B-Zell-Antwort zu quantifizieren und Rückschlüsse auf das gesamte Immunsystem zu ziehen.

Das auffälligste Merkmal der LIMP-1-defizienten Maus ist die stark erhöhte Diurese im Vergleich zu Wildtyp-Tieren, die durch eine vermehrte Wasserabgabe, aber nicht durch einen erhöhten Osmolytverlust bedingt wird. Nachdem keine Veränderungen in der Expression und intrazellulären Verteilung des Aquaporin-2 in den Hauptzellen der Sammelrohre festgestellt werden konnten, muss nun die Expression und Funktionalität anderer Proteine untersucht werden. Mögliche Kandidaten wären der Kaliumkanal ROMK, die Carboanhydrase II oder das β 1-Integrin. Zum einen muss in histologischen Schnitten die Expression und intrazelluläre Lokalisation dieser Proteine in der Niere untersucht werden. Zum anderen gilt es, die Interaktion von LIMP-1 mit den einzelnen Proteinen in Koimmunopräzipitations-Experimenten zu untersuchen und in einem so genannten *Yeast-two-Hybrid-Screen* weitere Kandidaten zu identifizieren, die einen Einfluss auf die Regulation des Wasserhaushaltes haben könnten.

In dem zweiten Teilprojekt dieser Arbeit konnte das lysosomale integrale Membranprotein LIMP-2 als intrazellulärer Transporter des lysosomalen Enzyms β -Glukocerebrosidase identifiziert werden. Die genau Struktur des Komplexes beider Proteine ist noch unklar. Hier müssen in Zukunft röntgenkristallographische Experimente die Interaktionsstellen der beiden Proteine identifizieren, auch wenn bereits eine *coiled-coil*-Domäne im Bereich der Aminosäuren 150 - 167 von LIMP-2 als β GC-bindende Domäne charakterisiert werden konnte.

Außerdem ist es bislang unklar, ob LIMP-2 noch als Rezeptor für andere lysosomale Proteine fungieren kann. Hier könnten zum einen potentielle Interaktionspartner mit einem *Yeast-two-Hybrid-Screen* identifiziert werden, die anschließend genauer charakterisiert werden müssen.

Daneben kann auch die über Röntgenkristallographie identifizierte Interaktionsdomäne auf Seiten der β GC durch Vergleiche mit der Struktur und Aminosäuresequenz anderer Proteine Hinweise auf mögliche andere Proteine liefern, die ebenfalls von LIMP-2 transportiert werden. Eine weitere Möglichkeit bestünde in einer vergleichenden Untersuchung des Serums von LIMP-2-defizienten und Wildtyp-Mäusen. Dazu würden die Proteine der einzelnen Seren mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und gemeinsam in einem Gel aufgetrennt werden. Anhand der Signalintensität der Farbstoffe innerhalb einzelner Banden im Gel kann abgeschätzt werden, ob ein Protein vermehrt oder vermindert im LIMP-2^{-/-}-Serum vorkommt. Proteine, die vermehrt im LIMP-2^{-/-}-Serum nachgewiesen werden, werden eventuell LIMP-2-abhängig transportiert und können mittels Massenspektroskopie identifiziert werden.

Schließlich steht noch aus, die LIMP-2-defiziente Maus auf mögliche Symptome von Morbus Gaucher hin zu untersuchen. Bis jetzt konnten keine Hepatosplenomegalie, Knochenschäden oder veränderte Makrophagen (Gaucher-Zellen) detektiert werden. Allerdings wurden in vorläufigen Experimenten Ablagerungen im Gehirn der LIMP-2^{-/-}-Maus festgestellt, die in ähnlicher Form sowohl bei Patienten, die unter dem „*Action Myoclonus Renal Failure Syndrom*“ (AMRF; Mutationen im LIMP-2-Gen; Berkovic et al., 2008) litten, auftraten, als auch bei einigen Gaucher-Patienten. In zukünftigen Experimenten muss die Art des jeweiligen Speichermaterials charakterisiert werden und überprüft werden, ob die Ablagerung in Zusammenhang mit der Fehlsortierung der β GC steht.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde erstmals eine Maus beschrieben, die defizient für das lysosomale integrale Membranprotein LIMP-1 ist. LIMP-1 gehört zur Proteinfamilie der Tetraspanine, die die Eigenschaft haben, mit verschiedenen anderen Proteinen zu interagieren und deren Eigenschaften zu beeinflussen. Trotz der ubiquitären Expression dieses Proteins war die LIMP-1^{-/-}-Maus uneingeschränkt lebensfähig und fruchtbar und zeigte keine offensichtlichen morphologischen oder histologischen Veränderungen sowie Verhaltensabnormalitäten. Die generelle Struktur und Funktion LIMP-1-defizienter Lysosomen war unverändert. Ebenfalls waren keine Unterschiede in der Aktivierbarkeit und Adhäsionsfähigkeit von Thrombozyten sowie in der Anzahl einzelner Immunzellsubpopulationen in Knochenmark, Milz, Lymphknoten und Peritoneum der LIMP-1^{-/-}-Mäuse feststellbar. Das Tetraspanin CD9 wurde allerdings stärker auf LIMP-1^{-/-}-T-Zellen exprimiert, was auf eine mögliche Redundanz dieser beiden Proteine hinweist.

In den Hauptzellen der Sammelrohre der Niere LIMP-1-defizienter Mäuse wurden auffällige lamelläre Einschlüsse beobachtet. Darauf aufbauende metabolische Untersuchungen ergaben, dass LIMP-1^{-/-}-Mäuse signifikant mehr Urin abgaben als Kontrolltiere. Diese vermehrte Diurese war durch einen erhöhten Wasserverlust gekennzeichnet, aber nicht durch den Verlust verschiedener Osmolyte wie Natrium-, Kalium- oder Chloridionen. Es konnte keine veränderte Expression oder intrazelluläre Fehlverteilung des Wasserporenproteins Aquaporin-2 beobachtet werden. Interessanterweise war die Wasserabgabe über den Kot in LIMP-1^{-/-}-Mäusen ebenfalls erhöht.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde eine neue Aufgabe des lysosomalen integralen Membranproteins LIMP-2 entdeckt, nämlich als Rezeptor der lysosomalen Hydrolase β -Glukocerebrosidase (β GC) für den Transport ins Lysosom. Während die meisten lysosomalen Enzyme über den inzwischen gut charakterisierten Mannose-6-Phosphatrezeptor-abhängigen Weg an ihr Ziel innerhalb der Säugetierzelle gelangen, war der Mechanismus, durch den die β GC an ihren Bestimmungsort gelangt, bisher unbekannt.

Ausgehend von der Beobachtung, dass die β GC *in vitro* mit LIMP-2 assoziiert, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass beide Proteine in den gleichen intrazellulären vesikulären Kompartimenten vorkamen, und dass die Aktivität, Menge und Lokalisation der β GC dramatisch mit der An- bzw. Abwesenheit von LIMP-2 korrelierte. Dies zeigt, dass die Unabhängigkeit des Transportes der β GC zum Lysosom vom Mannose-6-Phosphat-Rezeptor höchstwahrscheinlich auf dem durch LIMP-2 vermittelten Transfer beruht.

7 Summary

Mice deficient for the Lysosomal Integral Membrane Protein 1 (LIMP-1) are described in this study for the first time. LIMP-1 is a member of the tetraspanin protein family. Tetraspanins have the tendency to interact with a variety of other proteins thereby influencing their function. Despite the ubiquitous and abundant expression of LIMP-1, mice deficient for LIMP-1 are viable, fertile and do not manifest overt morphological, histological or behavioural abnormalities. An impairment of lysosomal structure and function could not be observed in cells or tissues derived from LIMP-1-deficient mice. Activation and adhesion of thrombocytes was also not disturbed in LIMP-1-knock-out mice. Leukocyte populations in bone-marrow, spleen, lymph node and peritoneum were not affected by the lack of LIMP-1. Interestingly, the expression level of the tetraspanin CD9 was increased in LIMP-1-deficient T-lymphocytes, indicating a compensatory role of this protein in the absence of LIMP-1.

Histological analysis of LIMP-1-deficient kidneys revealed lamellar inclusions within the principal cells of the collecting duct. Metabolic analyses based on these histological alterations indicated that, compared to age- and sex-matched controls, LIMP-1-deficient mice urinate significantly more. Increased diuresis was due to the enhanced secretion of water and was not due to an increased loss of osmolytes like sodium, potassium or chloride ions. Expression and intracellular distribution of the water-pore forming protein Aquaporin-2 in the principal cells of kidney collecting duct were unchanged in LIMP-1^{-/-}-mice. Interestingly the fecal water content of LIMP-1^{-/-}-mice was also significantly increased.

In the second part of this thesis, a novel role for the lysosomal transmembrane protein LIMP-2 as a sorting receptor required for the delivery of acid β -glucocerebrosidase (β GC) to lysosomes was described. The mannose-6-phosphate-receptor-dependent pathway has been very well characterized as a major route for the sorting of lysosomal enzymes, however the mechanism for the intracellular targeting of β GC remained unsolved.

In this thesis an association of β GC with LIMP-2 was demonstrated. Both proteins co-localized in intracellular vesicular compartments and the activity, levels and localization of β GC were strongly dependent on the presence of LIMP-2. This suggests that the mannose-6-phosphate-receptor-independent transport of β GC to lysosomes is due to transport by LIMP-2 through the lysosomal membrane protein delivery pathway.

8 Literaturverzeichnis

Acton, S.L., Scherer, P.E., Lodish, H.F. und Krieger, M. (1994) Expression cloning of Sr-Bi, a CD36-related class-B scavenger receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 21003-21009.

Adra, C.N., Zhu, S.C., Ko, J.L., Guillemot, J.C., Cuervo, A.M., Kobayashi, H., Horiuchi, T., Lelias, J.M., Rowley, J.D. und Lim, B. (1996) LAPT5: A novel lysosomal-associated multispinning membrane protein preferentially expressed in hematopoietic cells. *Genomics*, 35, 328-337.

Aerts, J.M., Schram, A.W., Strijland, A., van Weely, S., Jonsson, L.M., Tager, J.M., Sorrell, S.H., Ginns, E.I., Barranger, J.A. und Murray, G.J. (1988) Glucocerebrosidase, a lysosomal enzyme that does not undergo oligosaccharide phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 964, 303-308.

Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F. und Starke, K. (2005) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 9. Auflage, Urban und Fischer Verlag, München, D.

Alattia, J.R., Shaw, J.E., Yip, C.M. und Prive, G.G. (2007) Molecular imaging of membrane interfaces reveals mode of beta-glucosidase activation by saposin C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 17394-17399.

Altarescu, G., Hill, S., Wiggs, E., Jeffries, N., Kreps, C., Parker, C.C., Brady, R.O., Barton, N.W., Schiffmann, R., Bannarjee, T.K., Crutchfield, K., Frei, K., Mckee, M.A., Moore, D.F. und Tournay, A. (2001) The efficacy of enzyme replacement therapy in patients with chronic neuronopathic Gaucher's disease. *Journal of Pediatrics*, 138, 539-547.

Andrejewski, N., Punnonen, E.L., Guhde, G., Tanaka, Y., Lüllmann-Rauch, R., Hartmann, D., von Figura, K. und Saftig, P. (1999) Normal lysosomal morphology and function in LAMP-1-deficient mice. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 12692-12701.

Andrews, R.K. und Berndt, M.C. (2004) Platelet physiology and thrombosis. *Thrombosis Research*, 114, 447-453.

Arase, H., Saito, T., Phillips, J.H. und Lanier, L.L. (2001) Cutting edge: The mouse NK cell-associated antigen recognized by DX5 monoclonal antibody is CD49b (alpha2) integrin, very late antigen-2). *Journal of Immunology*, 167, 1141-1144.

Asch, A.S., Barnwell, J., Silverstein, R.L. und Nachman, R.L. (1987) Isolation of the Thrombospondin Membrane-Receptor. *Journal of Clinical Investigation*, 79, 1054-1061.

Ashcroft, F.M. (2000) *Ion Channels and Disease*. Academic Press, San Diego, USA.

Atkinson, B., Ernst, C.S., Ghrist, B.F.D., Herlyn, M., Blaszczyk, M., Ross, A.H., Herlyn, D., Steplewski, Z. und Koprowski, H. (1984) Identification of melanoma-associated antigens using fixed tissue screening of antibodies. *Cancer Research*, 44, 2577-2581.

Atkinson, B., Ernst, C.S., Ghrist, B.F.D., Ross, A.H., Clark, W.H., Herlyn, M., Herlyn, D., Maul, G., Steplewski, Z. und Koprowski, H. (1985) Monoclonal-antibody to a highly glycosylated protein reacts in fixed tissue with melanoma and other tumors. *Hybridoma*, 4, 243-255.

- Atrian, S., Lopez-Vinas, E., Gomez-Puertas, P., Chabas, A., Vilageliu, L. und Grinberg, D. (2008) An evolutionary and structure-based docking model for glucocerebrosidase-saposin C and glucocerebrosidase-substrate interactions - Relevance for Gaucher disease. *Proteins: Structure Function and Bioinformatics*, 70, 882-891.
- Austyn, J.M. und Gordon, S. (1981) F4-80, a monoclonal-antibody directed specifically against the mouse macrophage. *European Journal of Immunology*, 11, 805-815.
- Azorsa, D.O., Hyman, J.A. und Hildreth, J.E.K. (1991) CD63/Pltgp40 - a platelet activation antigen identical to the stage-specific, melanoma-associated antigen ME491. *Blood*, 78, 280-284.
- Bajic, V.B., Seah, S.H., Chong, A., Zhang, G.L., Koh, J.L.Y. und Brusic, V. (2002) Dragon Promoter Finder: recognition of vertebrate RNA polymerase II promoters. *Bioinformatics*, 18, 198-199.
- Balakirev, E.S. und Ayala, F.J. (2003) Pseudogenes: Are they "Junk" or functional DNA? *Annual Review of Genetics*, 37, 123-151.
- Barriocanal, J.G., Bonifacino, J.S., Yuan, L. und Sandoval, I.V. (1986) Biosynthesis, glycosylation, movement through the Golgi system, and transport to lysosomes by an N-linked carbohydrate-independent mechanism of three lysosomal integral membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 261, 16755-16763.
- Berditchevski, F., Bazzoni, G. und Hemler, M.E. (1995) Specific association of CD63 with the V α -3 and V α -6 integrins. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 17784-17790.
- Berditchevski, F. und Odintsova, E. (2007) Tetraspanins as regulators of protein trafficking. *Traffic*, 8, 89-96.
- Berditchevski, F., Tolia, K.F., Wong, K., Carpenter, C.L. und Hemler, M.E. (1997) A novel link between integrins, transmembrane-4 superfamily proteins (CD63 and CD81), and phosphatidylinositol 4-kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 2595-2598.
- Berditchevski, F., Zutter, M.M. und Hemler, M.E. (1996) Characterization of novel complexes on the cell surface between integrins and proteins with 4 transmembrane domains (TM4 proteins). *Molecular Biology of the Cell*, 7, 193-207.
- Berent, S.L. und Radin, N.S. (1981) Mechanism of activation of glucocerebrosidase by co-beta-glucosidase (glucosidase activator protein). *Biochimica et Biophysica Acta*, 664, 572-582.
- Bergfussman, A., Grace, M.E., Ioannou, Y. und Grabowski, G.A. (1993) Human acid beta-glucosidase - N-glycosylation site occupancy and the effect of glycosylation on enzymatic-activity. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 14861-14866.
- Berkovic, S.E., Dibbens, L.M., Oshlack, A., Silver, J.D., Katerelos, M., Vears, D.F., Lüllmann-Rauch, R., Blanz, J., Zhang, K.W., Stankovich, J., Kalnins, R.M., Dowling, J.P., Andermann, E., Andermann, F., Faldini, E., D'Hooge, R., Vadlamudi, L., Mc'Donell, R.A., Hodgson, B.L., Bayly, M.A., Savige, J., Mulley, J.C., Smyth, G.K., Power, D.A., Saftig, P. und Bahlo, M. (2008) Array-based gene discovery with three unrelated subjects shows SCARB2/LIMP-2 deficiency causes myoclonus epilepsy and glomerulosclerosis. *American Journal of Human Genetics*, 82, 673-684.
- Beutler, E. (2006) Gaucher disease: multiple lessons from a single gene disorder. *Acta Paediatrica*, 95, 103-109.

- Beutler, E. und Grabowski, G.A. (2001) Gaucher disease. in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, eds Scriver, C.R., Sly, W.S., Childs, B., Beaudet, A.L., Valle, D., Kinzler, K.W. und Vogelstein, B., McGraw-Hill Inc., New York, USA, 3635-3668.
- Bhandoola, A., von Böhmer, H., Petrie, H.T. und Zuniga-Pflucker, J.C. (2007) Commitment and developmental potential of extrathymic and intrathymic T cell precursors: Plenty to choose from. *Immunity*, 26, 678-689.
- Bleich, M., Schlatter, E. und Greger, R. (1990) The luminal K⁺ channel of the thick ascending limb of henle loop. *European Journal of Physiology*, 415, 449-460.
- Bleistein, J., Heidrich, H.G., Debuch, H. (1980) The phospholipids of liver lysosomes from untreated rats. *Hoppe Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 361, 595-597.
- Bonifacino, J.S. und Dell'Angelica, E.C. (1999) Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *Journal of Cell Biology*, 145, 923-926.
- Boucheix, C. und Rubinstein, E. (2001) Tetraspanins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58, 1189-1205.
- Bradbury, L.E., Kansas, G.S., Levy, S., Evans, R.L. und Tedder, T.F. (1992) The Cd19/Cd21 signal transducing complex of human lymphocytes-B includes the target of antiproliferative antibody-1 and Leu-13 molecules. *Journal of Immunology*, 149, 2841-2850.
- Brady, R.O., Kanfer, J.N. und Shapiro, D. (1965) Metabolism of glucocerebrosides. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Gaucher's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 18, 221-225.
- Brechue, W.F., Kinnesaffran, E., Kinne, R.K.H. und Maren, T.H. (1991) Localization and activity of renal carbonic-anhydrase (CA) in CA-II deficient Mice. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1066, 201-207.
- Bresciani, R., Denzer, K., Pohlmann, R. und von Figura, K. (1997) The 46 kDa mannose-6-phosphate receptor contains a signal for basolateral sorting within the 19 juxtamembrane cytosolic residues. *Biochemical Journal*, 327, 811-818.
- Briedé, J.J., Heemskerk, J.W.M., 't Veer, C., Hemker, H.C. und Lindhout, T. (2001) Contribution of platelet-derived factor Va to thrombin generation on immobilized collagen- and fibrinogen-adherent platelets. *Thrombosis and Haemostasis*, 85, 509-513.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. und Short, J.M. (1987) XL1-Blue - a high-efficiency plasmid transforming *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques*, 5, 376-379.
- Butters, T.D., Dwek, R.A. und Platt, F.M. (2005) Imino sugar inhibitors for treating the lysosomal glycosphingolipidoses. *Glycobiology*, 15, 43-52.
- Calvo, D. und Vega, M.A. (1993) Identification, primary structure, and distribution of Cla-1, a novel member of the CD36/LIMP-II gene family. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 18929-18935.
- Campbell, C.H., Fine, R.E., Squicciarini, J. und Rome, L.H. (1983) Coated vesicles from rat liver and calf brain contain cryptic mannose 6-phosphate receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 258, 2628-2633.

- Cariappa, A., Shoham, T., Liu, H.Y., Levy, H., Boucheix, C. und Pillai, S. (2005) The CD9 tetraspanin is not required for the development of peripheral B cells or for humoral immunity. *Journal of Immunology*, 175, 2925-2930.
- Cham, B.P., Gerrard, J.M. und Bainton, D.F. (1994) Granulophysin is located in the membrane of azurophilic granules in human neutrophils and mobilizes to the plasma-membrane following cell stimulation. *American Journal of Pathology*, 144, 1369-1380.
- Chapon, F., Latour, P., Diraison, P., Schaeffer, S. und Vandenberghe, A. (1999) Axonal phenotype of Charcot-Marie-Tooth disease associated with a mutation in the myelin protein zero gene. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 66, 779-782.
- Charrin, S., Manie, S., Oualid, M., Billard, M., Boucheix, C. und Rubinstein, E. (2002) Differential stability of tetraspanin/tetraspanin interactions: role of palmitoylation. *FEBS Letters*, 516, 139-144.
- Codina, J., Li, J. und Dubose, T.D. (2005) CD63 interacts with the carboxy terminus of the colonic H⁺-K⁺-ATPase to increase plasma membrane localization and ⁸⁶Rb⁺ uptake. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 288, 1279-1286.
- Cowin, A.J., Adams, D., Geary, S.M., Wright, M.D., Jones, J.C.R. und Ashman, L.K. (2006) Wound healing is defective in mice lacking tetraspanin CD151. *Journal of Investigative Dermatology*, 126, 680-689.
- Cox, T., Lachmann, R., Hollak, C., Aerts, J., van Weely, S., Hrebicek, M., Platt, F., Butters, T., Dwek, R., Moyses, C., Gow, I., Elstein, D. und Zimran, A. (2000) Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *Lancet*, 355, 1481-1485.
- Crew, V.K., Burton, N., Kagan, A., Green, C.A., Levene, C., Flinter, F., Brady, R.L., Daniels, G. und Anstee, D.J. (2004) CD151, the first member of the tetraspanin (TM4) superfamily detected on erythrocytes, is essential for the correct assembly of human basement membranes in kidney and skin. *Blood*, 104, 2217-2223.
- Crombie, R. und Silverstein, R. (1998) Lysosomal integral membrane protein II binds thrombospondin-1 - Structure-function homology with the cell adhesion molecule CD36 defines a conserved recognition motif. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 4855-4863.
- Cuervo, A.M. und Dice, J.F. (1998) Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *Journal of Molecular Medicine*, 76, 6-12.
- Dahms, N.M. und Kornfeld, S. (1989) The cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. Structural requirements for mannose 6-phosphate binding and oligomerization. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 11458-11467.
- de Bruijn, M.F.T.R., Van Vianen, W., Ploemacher, R.E., Bakker-Woudenberg, I.A.J.M., Campbell, P.A., van Ewijk, W. und Leenen, P.J.M. (1998) Bone marrow cellular composition in *Listeria monocytogenes* infected mice detected using ER-MP12 and ER-MP20 antibodies: a flow cytometric alternative to differential counting. *Journal of Immunological Methods*, 217, 27-39.
- de Duve, C. (1959) Lysosomes, a new group of cytoplasmic particles. in *Subcellular Particles*, ed. Hayashi, T., Ronald Press, New York, USA, 128-159.
- de Duve, C. (2005) The lysosome turns fifty. *Nature Cell Biology*, 7, 847-849.

- Delbruck, R., Desel, C., von Figura, K. und Hille-Rehfeld, A. (1994) Proteolytic processing of cathepsin-D in prelysosomal organelles. *European Journal of Cell Biology*, 64, 7-14.
- den Hertog, J., Blanchetot, C., Buist, A., Overvoorde, J., van der Sar, A. und Tertoolen, L.G.J. (1999) Receptor protein-tyrosine phosphatase signalling in development. *International Journal of Developmental Biology*, 43, 723-733.
- Denek, M., Pelchen-Matthews, A., Byland, R., Ruiz-Mateos, E. und Marsh, M. (2007) In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. *Journal of Cell Biology*, 177, 329-341.
- Diaz, E. und Pfeffer, S.R. (1998) TIP47: A cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking. *Cell*, 93, 433-443.
- Dicioccio, R.A. und Miller, A.L. (1993) Phosphorylation and subcellular location of alpha-L-fucosidase in lymphoid-cells from patients with I-Cell-Disease and pseudo-Hurler polydystrophy. *Glycobiology*, 3, 489-495.
- Dittmer, F., Hafner, A., Ulbrich, E.J., Moritz, J.D., Schmidt, P., Schmahl, W., Pohlmann, R. und von Figura, K. (1998) I-Cell-Disease-like phenotype in mice deficient in mannose 6-phosphate receptors. *Transgenic Research*, 7, 473-483.
- Dittmer, F., Ulbrich, E.J., Hafner, A., Schmahl, W., Meister, T., Pohlmann, R. und von Figura, K. (1999) Alternative mechanisms for trafficking of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphate receptor-deficient mice are cell type-specific. *Journal of Cell Science*, 112, 1591-1597.
- Dong, J.F., SaeTung, G. und Lopez, J.A. (1997) Role of glycoprotein V in the formation of the platelet high-affinity thrombin-binding site. *Blood*, 89, 4355-4363.
- Duffield, A.S., Kamsteeg, E., Brown, A.N. und Caplan, M.J. (2003) Association with the tetraspanin CD63 enhances the internalization of the H,K-ATPase beta-subunit. *Molecular Biology of the Cell*, 13, 516-516.
- Duncan, J.R. und Kornfeld, S. (1988) Intracellular movement of two mannose 6-phosphate receptors: return to the Golgi apparatus. *Journal of Cell Biology*, 106, 617-628.
- Dvir, H., Harel, M., McCarthy, A.A., Toker, L., Silman, I., Futerman, A.H. und Sussman, J.L. (2003) X-ray structure of human acid-beta-glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. *EMBO Reports*, 4, 704-709.
- Elzouki, A.N.Y., Segelmark, M., Wieslander, J. und Eriksson, S. (1994) Strong link between the alpha(1)-antitrypsin Piz allele and Wegeners granulomatosis. *Journal of Internal Medicine*, 236, 543-548.
- Engering, A., Kuhn, L., Fluitsma, D., Hoefsmit, E. und Pieters, J. (2003) Differential post-translational modification of CD63 molecules during maturation of human dendritic cells. *European Journal of Biochemistry*, 270, 2412-2420.
- Engering, A. und Pieters, J. (2001) Association of distinct tetraspanins with MHC class II molecules at different subcellular locations in human immature dendritic cells. *International Immunology*, 13, 127-134.
- Enquist, I.B., Lo Bianco, C., Ooka, A., Nilsson, E., Mansson, J.E., Ehinger, M., Richter, J., Brady, R.O., Kirik, D. und Karlsson, S. (2007) Murine models of acute neuronopathic Gaucher disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 17483-17488.

- Ernst, C.S., Shen, J.W., Litwin, S., Herlyn, M., Koprowski, H. und Sears, H.F. (1986) Multiparameter evaluation of the expression in situ of normal and tumor-associated antigens in human colorectal-carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 77, 387-395.
- Escola, J.M., Kleijmeer, M.J., Stoorvogel, W., Griffith, J.M., Yoshie, O. und Geuze, H.J. (1998) Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 20121-20127.
- Eskelinen, E.L., Illert, A.L., Tanaka, Y., Schwarzmann, G., Blanz, J., von Figura, K. und Saftig, P. (2002) Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, 13, 3355-3368.
- Eskelinen, E.L., Schmidt, C.K., Neu, S., Willenborg, M., Fuertes, G., Salvador, N., Tanaka, Y., Lüllmann-Rauch, R., Hartmann, D., Heeren, J., von Figura, K., Knecht, E. und Saftig, P. (2004) Disturbed cholesterol traffic but normal proteolytic function in LAMP-1/LAMP-2 double-deficient fibroblasts. *Molecular Biology of the Cell*, 15, 3132-3145.
- Eskelinen, E.L., Tanaka, Y. und Saftig, P. (2003) At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends in Cell Biology*, 13, 137-145.
- Fabbro, D. und Grabowski, G.A. (1991) Human acid beta-glucosidase - use of inhibitory and activating monoclonal-antibodies to investigate the enzymes catalytic mechanism and saposin-A and saposin-C binding-sites. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 15021-15027.
- Febbraio, M. und Silverstein, R.L. (2007) CD36: Implications in cardiovascular disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 2012-2030.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. und Danielsen, M. (1987) Lipofection - a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, 7413-7417.
- Forgac, M. (2000) Structure, mechanism and regulation of the clathrin-coated vesicle and yeast vacuolar H⁺-ATPases. *Journal of Experimental Biology*, 203, 71-80.
- Forslöv, A., Liu, Z. und Sundqvist, K.G. (2007) Receptor communication within the lymphocyte plasma membrane: a role for the thrombospondin family of matricellular proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 66-76.
- Franc, N.C., Dimarcq, J.L., Lagueux, M., Hoffmann, J. und Ezekowitz, R.A.B. (1996) Croquemort, a novel drosophila hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity*, 4, 431-443.
- Fujita, H., Saeki, M., Yasunaga, K., Ueda, T., Imoto, T. und Himeno, M. (1999) In vitro binding study of adaptor protein complex (AP-1) to lysosomal targeting motif (LI-motif). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 255, 54-58.
- Fujita, H., Takata, Y., Kono, A., Tanaka, Y., Takahashi, T., Himeno, M. und Kato, K. (1992) Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding the 85-kDa human lysosomal sialoglycoprotein (hLGP85) in human metastatic pancreas islet tumor-cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 184, 604-611.
- Funato, K., Beron, W., Yang, C.Z., Mukhopadhyay, A. und Stahl, P.D. (1997) Reconstitution of phagosome-lysosome fusion in streptolysin O-permeabilized cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 16147-16151.

- Furbish, F.S., Steer, C.J., Krett, N.L. und Barranger, J.A. (1981) Uptake and distribution of placental glucocerebrosidase in rat hepatic cells and effects of sequential deglycosylation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 673, 425-434.
- Fürst, W. und Sandhoff, K. (1992) Activator proteins and topology of lysosomal sphingolipid catabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1126, 1-16.
- Gamp, A.C., Tanaka, Y., Lüllmann-Rauch, R., Wittke, D., d'Hooge, R., de Deyn, P.P., Moser, T., Maier, H., Hartmann, D., Reiss, K., Illert, A.L., von Figura, K. und Saftig, P. (2003) LIMP-2/LGP85 deficiency causes ureteric pelvic junction obstruction, deafness and peripheral neuropathy in mice. *Human Molecular Genetics*, 12, 631-646.
- Geisert, E.E., Williams, R.W., Geisert, G.R., Fan, L., Asbury, A.M., Maecker, H.T., Deng, J. und Levy, S. (2002) Increased brain size and glial cell number in CD81-null mice. *Journal of Comparative Neurology*, 453, 22-32.
- Ghosh, P., Dahms, N.M. und Kornfeld, S. (2003) Mannose 6-phosphate receptors: New twists in the tale. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4, 202-212.
- Gibbins, J.M., Okuma, M., Farndale, R., Barnes, M. und Watson, S.P. (1997) Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain. *FEBS Letters*, 413, 255-259.
- Gieselmann, V., Pohlmann, R., Hasilik, A. und von Figura, K. (1983) Biosynthesis and transport of cathepsin D in cultured human fibroblasts. *The Journal of Cell Biology*, 97, 1-5.
- Ginsel, L.A. und Fransen, J.A. (1991) Mannose 6-phosphate receptor independent targeting of lysosomal enzymes (a mini-review). *Cell biology international reports*, 15, 1167-1173.
- Glickman, J.N. und Kornfeld, S. (1993) Mannose 6-phosphate independent targeting of lysosomal-enzymes in I-Cell-Disease B-lymphoblasts. *Journal of Cell Biology*, 123, 99-108.
- Glickman, J.N., Morton, P.A., Slot, J.W., Kornfeld, S. und Geuze, H.J. (1996) The biogenesis of the MHC class II compartment in human I-Cell-Disease B lymphoblasts. *Journal of Cell Biology*, 132, 769-785.
- Goschnick, M.W., Lau, L.M., Wee, J.L., Liu, Y.S., Hogarth, P.M., Robb, L.M., Hickey, M.J., Wright, M.D. und Jackson, D.E. (2006) Impaired "outside-in" integrin alpha(IIb)beta(3) signaling and thrombus stability in TSSC6-deficient mice. *Blood*, 108, 1911-1918.
- Gozal, P.M., Cheng, D.M., Duong, D.M., Lah, J.J., Levey, A.I. und Peng, J.M. (2006) Merger of laser capture microdissection and mass spectrometry: A window into the amyloid plaque proteome. *Amyloid, Prions, and Other Protein Aggregates*, 412, 77-93.
- Grabowski, G.A., Barton, N.W., Pastores, G., Dambrosia, J.M., Banerjee, T.K., McKee, M.A., Parker, C., Schiffmann, R., Hill, S.C. und Brady, R.O. (1995) Enzyme therapy in type-1 Gaucher disease - Comparative efficacy of mannose-terminated glucocerebrosidase from natural and recombinant sources. *Annals of Internal Medicine*, 122, 33-39.
- Gu, R.M., Wei, Y., Falck, J.R., Krishna, U.M. und Wang, W.H. (2001) Effects of protein tyrosine kinase and protein tyrosine phosphate on apical K⁺ channels in the TAL. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 281, 1188-1195.

- Guggenbuhl, P., Grosbois, B. und Chalès, G. (2007) Gaucher disease. *Joint, Bone, Spine*, 1-9.
- Gunther, W., Luchow, A., Cluzeaud, F., Vandewalle, A. und Jentsch, T.J. (1998) ClC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 8075-8080.
- Gwynn, B., Eicher, E.M. und Peters, L.L. (1996) Genetic localization of Cd63, a member of the transmembrane 4 superfamily, reveals two distinct loci in the mouse genome. *Genomics*, 35, 389-391.
- Hammond, C., Denzin, L.K., Pan, M., Griffith, J.M., Geuze, H.J. und Cresswell, P. (1998) The tetraspan protein CD82 is a resident of MHC class II compartments where it associates with HLA-DR, -DM, and -DO molecules. *Journal of Immunology*, 161, 3282-3291.
- Hardy, R.R. und Hayakawa, K. (1991) A developmental switch in B-lymphopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 11550-11554.
- Hardy, R.R., Kincade, P.W. und Dorshkind, K. (2007) The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage. *Immunity*, 26, 703-714.
- Hare, J.F. (1990) Mechanisms of membrane-protein turnover. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1031, 71-90.
- Hart, K. und Wilcox, M. (1993) A drosophila gene encoding an epithelial membrane-protein with homology to CD36 and LIMP-II. *Journal of Molecular Biology*, 234, 249-253.
- Hasilik, A. (1992) The early and late processing of lysosomal-enzymes - proteolysis and compartmentation. *Experientia*, 48, 130-151.
- Hebert, S.C., Desir, G., Giebisch, G. und Wang, W.H. (2005) Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. *Physiological Reviews*, 85, 319-371.
- Heemskerk, J.W.M., Vuist, W.M.J., Feijge, M.A.H., Reutelingsperger, C.P.M. und Lindhout, T. (1997) Collagen but not fibrinogen surfaces induce bleb formation, exposure of phosphatidylserine, and procoagulant activity of adherent platelets: Evidence for regulation by protein tyrosine kinase-dependent Ca^{2+} responses. *Blood*, 90, 2615-2625.
- Heijnen, H.F.G., Debili, N., Vainchencker, W., Breton-Gorius, J., Geuze, H.J. und Sixma, J.J. (1998) Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha-granules. *Blood*, 91, 2313-2325.
- Hemler, M.E. (2001) Specific tetraspanin functions. *Journal of Cell Biology*, 155, 1103-1107.
- Hemler, M.E. (2005) Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 801-811.
- Hildreth, J.E.K., Derr, D. und Azorsa, D.O. (1991) Characterization of a novel self-associating Mr 40,000 platelet glycoprotein. *Blood*, 77, 121-132.
- Ho, S.H., Martin, F., Higginbottom, A., Partridge, L.J., Parthasarathy, V., Moseley, G.W., Lopez, P., Cheng-Mayer, C. und Monk, P.N. (2006) Recombinant extracellular domains of tetraspanin proteins are potent inhibitors of the infection of macrophages by human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*, 80, 6487-6496.

- Hollak, C.E.M., Evers, L., Aerts, J.M. und van Oers, M.H.J. (1997) Elevated levels of M-CSF, sCD14 and IL8 in type 1 Gaucher disease. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 23, 201-212.
- Höning, S., Sandoval, I.V. und von Figura, K. (1998) A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3. *EMBO Journal*, 17, 1304-1314.
- Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S. und Monk, M. (1987) HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured-cells. *Nature*, 326, 292-295.
- Hotta, H., Hara, I., Miyamoto, H. und Homma M. (1991) Overexpression of the human melanoma-associated antigen ME491 partially suppresses in vivo malignant phenotypes of H-ras-transformed NIH3T3 cells in athymic nude mice. *Melanoma Research*, 1, 125-132.
- Hotta, H., Miyamoto, H., Hara, I., Takahashi, N. und Homma, M. (1992) Genomic structure of the ME491/CD63 antigen gene and functional-analysis of the 5'-flanking regulatory sequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 185, 436-442.
- Hotta, H., Ross, A.H., Hübner, K., Isobe, M., Wendeborn, S., Chao, M.V., Ricciardi, R.P., Tsujimoto, Y., Croce, C.M. und Koprowski, H. (1988) Molecular cloning and characterization of an antigen associated with early stages of melanoma tumor progression. *Cancer Research*, 48, 2955-2962.
- Hunziker, W., Simmen, T. und Höning, S. (1996) Trafficking of lysosomal membrane proteins in polarized kidney cells. *Néphrologie*, 17, 347-350.
- Israels, S.J., Gerrard, J.M., Jacques, Y.V., McNicol, A., Cham, B., Nishibori, M. und Bainton, D.F. (1992) Platelet dense granule membranes contain both granulophysin and P-selectin (GMP-140). *Blood*, 80, 143-152.
- Israels, S.J. und McMillan-Ward, E. (2004) CD63 modulates spreading and tyrosine phosphorylation of platelets on immobilized fibrinogen. *Blood*, 104, 437A-437A.
- Israels, S.J., McMillan-Ward, E., Easton, J., Robertson, C. und McNicol, A. (2001) CD63 associates with the alpha(IIb)beta(3) integrin-CD9 complex on the surface of activated platelets. *Thrombosis and Haemostasis*, 85, 134-141.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. und Shlomchik, M. (2002a) Die angeborene Immunität. in *Immunologie*. 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, D, 37-93.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. und Shlomchik, M. (2002b) Die Entstehung des Rezeptorrepertoires von reifen Lymphocyten. in *Immunologie*. 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, D, 201-312.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. und Shlomchik, M. (2002c) Die Erkennung von Antigenen. in *Immunologie*. 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, D, 99-196.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. und Shlomchik, M. (2002d) Einführung in die Immunologie und die angeborene Immunität. in *Immunologie*. 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, D, 1-98.
- Jang, H.I. und Lee, H. (2003) A decrease in the expression of CD63 tetraspanin protein elevates invasive potential of human melanoma cells. *Experimental and Molecular Medicine*, 35, 317-323.

- Jmoudiak, M. und Futerman, A.H. (2005) Gaucher disease: pathological mechanisms and modern management. *British Journal of Haematology*, 129, 178-188.
- Jolly, C. und Sattentau, Q.J. (2007) Human immunodeficiency virus type 1 assembly, budding, and cell-cell spread in T cells take place in tetraspanin-enriched plasma membrane domains. *Journal of Virology*, 81, 7873-7884.
- Kitani, S., Berenstein, E., Mergenhagen, S., Tempst, P. und Siraganian, R.P. (1991) A cell-surface glycoprotein of rat basophilic leukemia-cells close to the high-affinity IgE receptor (Fc-Epsilon-RI) - Similarity to human-melanoma differentiation antigen ME491. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 1903-1909.
- Klumperman, J., Hille, A., Veenendaal, T., Oorschot, V., Stoorvogel, W., von Figura, K. und Geuze, H.J. (1993) differences in the endosomal distributions of the 2 mannose 6-phosphate receptors. *Journal of Cell Biology*, 121, 997-1010.
- Knipper, M., Claussen, C., Ruttiger, L., Zimmermann, U., Lüllmann-Rauch, R., Eskelinen, E.L., Schröder, J., Schwake, M. und Saftig, P. (2006) Deafness in LIMP2-deficient mice due to early loss of the potassium channel KCNQ1/KCNE1 in marginal cells of the stria vascularis. *Journal of Physiology*, 576, 73-86.
- Knobeloch, K.P., Wright, M.D., Ochsenbein, A.F., Liesenfeld, O., Lohler, J., Zinkernagel, R.M., Horak, I. und Orinska, Z. (2000) Targeted inactivation of the tetraspanin CD37 impairs T-cell-dependent B-cell response under suboptimal costimulatory conditions. *Molecular and Cellular Biology*, 20, 5363-5369.
- Kolter, T. und Sandhoff, K. (2005) Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lipids. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, 81-103.
- Kolter, T. und Sandhoff, K. (2006) Sphingolipid metabolism diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 758, 2057-2079.
- Kondoh, M., Ueda, M., Ichihashi, M. und Mishima, Y. (1993) Decreased expression of human melanoma-associated antigen ME491 along the progression of melanoma pre-canceroses to invasive and metastatic melanomas. *Melanoma Research*, 3, 241-245.
- Kornfeld, S. (1989) The biogenesis of lysosomes. *Annual Reviews of Cell Biology*, 5, 483-525.
- Kornfeld, S. (1992) Structure and function of the mannose 6-phosphate insulin-like growth factor-II receptors. *Annual Review of Biochemistry*, 61, 307-330.
- Kornfeld, S. und Sly, W.S. (2000) I-Cell-Disease and pseudo-Hurler polydystrophy: Disorders of lysosomal enzyme phosphorylation and localization. in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, eds Scriver, C.R., Sly, W.S., Childs, B., Beaudet, A.L., Valle, D., Kinzler, K.W. und Vogelstein, B. McGraw-Hill Inc., New York, USA, 3469-3482.
- Koyama, Y., Yamanoha, B. und Yoshida, T. (1990) A novel monoclonal-antibody induces the differentiation of monocyte leukemic-cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 168, 898-904.
- Kraft, S., Fleming, T., Billingsley, J.M., Lin, S.Y., Jouvin, M.H., Storz, P. und Kinet, J.P. (2005) Anti-CD63 antibodies suppress IgE-dependent allergic reactions in vitro and in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 201, 385-396.

- Kraft, S. und Kinet, J.P. (2007) New developments in Fc epsilon RI regulation, function and inhibition. *Nature Reviews Immunology*, 7, 365-378.
- Kreisel, F.H., Blasius, A., Kreisel, D., Colonna, M. und Cella, M. (2006) Interferon-producing cells develop from murine CD3^{high}/Ly6C⁻ marrow progenitors. *Cellular Immunology*, 242, 91-98.
- Krieger, M. (2001) Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *Journal of Clinical Investigation*, 108, 793-797.
- Kuronita, T., Eskelinen, E.L., Fujita, H., Saftig, P., Himeno, M. und Tanaka, Y. (2002) A role for the lysosomal membrane protein LGP85 in the biogenesis and maintenance of endosomal and lysosomal morphology. *Journal of Cell Science*, 115, 4117-4131.
- Kuronita, T., Hatano, T., Furuyama, A., Hirota, Y., Masuyama, N., Saftig, P., Himeno, M., Fujita, H. und Tanaka, Y. (2005) The NH₂-Terminal transmembrane and luminal domains of LGP85 are needed for the formation of enlarged endosomes/lysosomes. *Traffic*, 6, 895-906.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lau, L.M., Wee, J.L., Wright, M.D., Moseley, G.W., Hogarth, P.M., Ashman, L.K. und Jackson, D.E. (2004) The tetraspanin superfamily member CD151 regulates outside-in integrin alpha(IIb)beta(3) signaling and platelet function. *Blood*, 104, 2368-2375.
- Lazzarino, D.A. und Gabel, C.A. (1988) Biosynthesis of the mannose 6-phosphate recognition marker in transport-impaired mouse lymphoma cells. Demonstration of a two-step phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 10118-10126.
- Le Borgne, R., Alconada, A., Bauer, U. und Hoflack, B. (1998) The mammalian AP-3 adaptor-like complex mediates the intracellular transport of lysosomal membrane glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 29451-29461.
- Le Naour, F., Andre, M., Boucheix, C. und Rubinstein, E. (2006) Membrane microdomains and proteomics: Lessons from tetraspanin microdomains and comparison with lipid rafts. *Proteomics*, 6, 6447-6454.
- Le Naour, F., Rubinstein, E., Jasmin, C., Prenant, M. und Boucheix, C. (2000) Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science*, 287, 319-321.
- Lefrancois, S., Zeng, J.B., Hassan, A.J., Canuel, M. und Morales, C.R. (2003) The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *EMBO Journal*, 22, 6430-6437.
- Lemansky, P., Hasilik, A., von Figura, K., Helmy, S., Fishman, J., Fine, R.E., Kedersha, N.L. und Rome, L.H. (1987) Lysosomal enzyme precursors in coated vesicles derived from the exocytic and endocytic pathways. *Journal of Cell Biology*, 104, 1743-1748.
- Leonova, T. und Grabowski, G.A. (2000) Fate and sorting of acid beta-glucosidase in transgenic mammalian cells. *Molecular Genetics and Metabolism*, 70, 281-294.
- Levy, S. und Shoham, T. (2005a) Protein-protein interactions in the tetraspanin web. *Physiology*, 20, 218-224.

- Levy, S. und Shoham, T. (2005b) The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nature Reviews Immunology*, 5, 136-148.
- Li, X.J., Alvarez, B., Casey, J.R., Reithmeier, R.A.F. und Fliegel, L. (2002) Carbonic anhydrase II binds to and enhances activity of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 36085-36091.
- Lien, Y.H.H. und Lai, L.W. (1998) Respiratory acidosis in carbonic anhydrase II-deficient mice. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 18, 301-304.
- Lin, D.H., Kamsteeg, E.J., Zhang, Y., Jin, Y., Sterling, H., Yue, P., Roos, M., Duffield, A., Spencer, J., Caplan, M. und Wang, W.H. (2008) Expression of tetraspan protein CD63 activates protein-tyrosine kinase (PTK) and enhances the PTK-induced inhibition of ROMK channels. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 7674-7681.
- Lloyd, J.B. und Forster, S. (1986) The lysosomal membrane. *Trends in Biochemical Sciences*, 11, 365-368.
- Lui, K., Commens, C., Choong, R. und Jaworski, R. (1988) Collodion babies with Gaucher's disease. *Archives of disease in childhood*, 63, 854-856.
- Lüllmann-Rauch, R. (2005) History and morphology of the lysosome. in *Lysosomes*, ed. Saftig, P., Springer Science + Business Media, New York, USA, 1-16.
- Ma, Z.M., Grubb, J.H. und Sly, W.S. (1991) Cloning, sequencing, and functional-characterization of the murine 46-kDa mannose 6-phosphate receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 10589-10595.
- Maecker, H.T. und Levy, S. (1997) Normal lymphocyte development but delayed humoral immune response in CD81-null mice. *Journal of Experimental Medicine*, 185, 1505-1510.
- Maecker, H.T., Todd, S.C. und Levy, S. (1997) The tetraspanin superfamily: Molecular facilitators. *FASEB Journal*, 11, 428-442.
- Maier, M., Castagner, F., Berger, P. und Suter, U. (2003) Distinct elements of the peripheral myelin protein 22 (PMP22) promoter regulate expression in Schwann cells and sensory neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 24, 803-817.
- Mainferme, F., Wattiaux, R. und von Figura, K. (1985) Synthesis, transport and processing of cathepsin-C in Morris Hepatoma 7777 cells and rat hepatocytes. *European Journal of Biochemistry*, 153, 211-216.
- Mannion, B.A., Berditchevski, F., Kraeft, S.K., Chen, L.B. und Hemler, M.E. (1996) Transmembrane-4 superfamily proteins CD81 (TAPA-1), CD82, CD63, and CD53 specifically associate with integrin alpha(4)beta(1) (CD49d/CD29). *Journal of Immunology*, 157, 2039-2047.
- Mantegazza, A.R., Barrio, M.M., Moutel, S., Bover, L., Weck, M., Brossart, P., Teillaud, J.L. und Mordoh, J. (2004) CD63 tetraspanin slows down cell migration and translocates to the endosomal-lysosomal-MIICs route after extracellular stimuli in human immature dendritic cells. *Blood*, 104, 1183-1190.
- Marks, M.S., Ohno, H., Kirchhausen, T. und Bonifacino, S.J. (1997) Protein sorting by tyrosine-based signals: Adapting to the Ys and wherefores. *Trends in Cell Biology*, 7, 124-128.

- Marsh, M., Schmid, S., Kern, H., Harms, E., Male, P., Mellman, I. und Helenius, A. (1987) Rapid analytical and preparative isolation of functional endosomes by free flow electrophoresis. *Journal of Cell Biology*, 104, 875-886.
- Marzella, L. und Glaumann, H. (1987) Autophagy, microautophagy, and crinophagy as mechanisms for protein degradation. in *Lysosomes: Their Role in Protein Breakdown*, ed. Glaumann, H. und Ballard, F.J., Academic Press Inc., New York, London. 319-367.
- Matsumoto, A.K., Kopickyburd, J., Carter, R.H., Tuveson, D.A., Tedder, T.F. und Fearon, D.T. (1991) Intersection of the complement and immune-systems - A signal transduction complex of the lymphocyte-B containing complement receptor type-2 and CD19. *Journal of Experimental Medicine*, 173, 55-64.
- Maxfield, F.R. und McGraw, T.E. (2004) Endocytic recycling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5, 121-132.
- McGookey, D., Fagerberg, K. und , A.R. (1983) Filipin-cholesterol complexes form in uncoated vesicle membrane derived from coated vesicles during receptor-mediated endocytosis of low density lipoprotein. *Journal of Cell Biology*, 96, 1273-1278.
- McIntyre, G.F. und Erickson, A.H. (1993) The lysosomal proenzyme receptor that binds procathepsin-L to microsomal-membranes at pH 5 is a 43-kDa integral membrane-protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 10588-10592.
- McIntyre, G.F., Godbold, G.D. und Erickson, A.H. (1994) The pH-dependent membrane association of procathepsin-L is mediated by a 9-residue sequence within the propeptide. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 567-572.
- McMurtrie, H.L., Cleary, H.J., Alvarez, B.V., Loiselle, F.B., Sterling, D., Morgan, P.E., Johnson, D.E. und Casey, J.R. (2004) The bicarbonate transport metabolon. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19, 231-236.
- Meerlo, T., Parmentier, H.K., Osterhaus, A.D.M.E., Goudsmit, J. und Schuurman, H.J. (1992) Modulation of cell-surface molecules during HIV-1 infection of H9 cells - An immunoelectron microscopic study. *AIDS*, 6, 1105-1116.
- Meivar-Levy, I., Horowitz, M. und Futerman, A.H. (1994) Analysis of glucocerebrosidase activity using N-(1-[¹⁴C]hexanoyl)-D-erythroglucosylsphingosine demonstrates a correlation between levels of residual enzyme activity and the type of Gaucher disease. *The Biochemical Journal*, 303, 377-382.
- Metcalf, D. (2007) On hematopoietic stem cell fate. *Immunity*, 26, 669-673.
- Metzelaar, M.J., Wijngaard, P.L.J., Peters, P.J., Sixma, J.J., Nieuwenhuis, H.K. und Clevers, H.C. (1991) CD63-antigen - A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening-procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 3239-3245.
- Meyer-Wentrup, F., Figdor, C.G., Ansems, M., Brossart, P., Wright, M.D., Adema, G.J. und van Spruiel, A.B. (2007) Dectin-1 interaction with tetraspanin CD37 inhibits IL-6 production. *Journal of Immunology*, 178, 154-162.
- Miura, Y. und Koyanagi, Y. (2005) HIV encephalopathy. *Rinsho Shinkeigaku*, 45, 887-889.
- Miyado, K., Yamada, G., Yamada, S., Hasuwa, H., Nakamura, Y., Ryu, F., Suzuki, K., Kosai, K., Inoue, K., Ogura, A., Okabe, M. und Mekada, E. (2000) Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science*, 287, 321-324.

- Miyamoto, H., Homma, M. und Hotta, H. (1994) Molecular-cloning of the murine homolog of CD63/ME491 and detection of its strong expression in the kidney and activated macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1217, 312-316.
- Miyazaki, T., Müller, U. und Campbell, K.S. (1997) Normal development but differentially altered proliferative responses of lymphocytes in mice lacking CD81. *EMBO Journal*, 16, 4217-4225.
- Mizukami, H., Mi, Y.D., Wada, R., Kono, M., Yamashita, T., Liu, Y.J., Werth, N., Sandhoff, R., Sandhoff, K. und Proia, R.L. (2002) Systemic inflammation in glucocerebrosidase-deficient mice with minimal glucosylceramide storage. *Journal of Clinical Investigation*, 109, 1215-1221.
- Morimoto, S., Kishimoto, Y., Tomich, J., Weiler, S., Ohashi, T., Barranger, J.A., Kretz, K.A. und O'Brien, J.S. (1990) Interaction of saposins, acidic lipids, and glucosylceramidase. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 1933-1937.
- Naef, R. und Suter, U. (1999) Impaired intracellular trafficking is a common disease mechanism of PMP22 point mutations in peripheral neuropathies. *Neurobiology of Disease*, 6, 1-14.
- Neiss, W.F. (1984) A coat of glycoconjugates on the inner surface of the lysosomal membrane in the rat kidney. *Histochemistry*, 80, 603-608.
- Neufeld, E.F. (1991) Lysosomal storage diseases. *Annual Review of Biochemistry*, 60, 257-280.
- Nieswandt, B., Bergmeier, W., Schulte, V., Rackebrandt, K., Gessner, J.E. und Zirngibl, H. (2000) Expression and function of the mouse collagen receptor glycoprotein VI is strictly dependent on its association with the FcR gamma chain. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 23998-24002.
- Nieswandt, B., Moser, M., Pleines, I., Varga-Szabo, D., Monkley, S., Critchley, D. und Fässler, R. (2007) Loss of talin 1 in platelets abrogates integrin activation, platelet aggregation, and thrombus formation in vitro and in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 204, 3113-3118.
- Nilsson, O., Grabowski, G.A., Ludman, M.D., Desnik, R.J. und Svennerholm, L. (1985) Glycosphingolipid studies of visceral tissues and brain from type I Gaucher disease variants. *Clinical Genetics*, 27, 443-450.
- Nilsson, O. und Svennerholm, L. (1982) Accumulation of glucosylceramide and glucosylsphingosine (psychosine) in cerebrum and cerebellum in infantile and juvenile Gaucher disease. *Journal of Neurochemistry*, 39, 709-718.
- Nishibori, M., Cham, B., McNicol, A., Shalev, A., Jain, N. und Gerrard, J.M. (1993) The protein CD63 is in platelet dense granules, is deficient in a patient with Hermansky-Pudlak syndrome, and appears identical to granulophysin. *Journal of Clinical Investigation*, 91, 1775-1782.
- Nishikata, H., Oliver, C., Mergenhagen, S.E. und Siraganian, R.P. (1992) The Rat Mast-Cell Antigen Ad1 (Homolog to Human Cd63 Or Melanoma Antigen Me491) Is Expressed in Other Cells in Culture. *Journal of Immunology*, 149, 862-870.
- Nydegger, S., Khurana, S., Kremontsov, D.N., Foti, M. und Thali, M. (2006) Mapping of tetraspanin-enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1. *Journal of Cell Biology*, 173, 795-807.

- O'Brien, J.S. und Kishimoto, Y. (1991) Saposin proteins: structure, function, and role in human lysosomal storage disorders. *FASEB Journal*, 5, 301-308.
- O'Neill, R.R., Tokoro, T., Kozak, C.A. und Brady, R.O. (1989) Comparison of the chromosomal localization of murine and human glucocerebrosidase genes and of the deduced amino-acid sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 5049-5053.
- Ogata, S. und Fukuda, M. (1994) Lysosomal targeting of LIMP-II membrane glycoprotein requires a novel Leu-Ile motif at a particular position in its cytoplasmic tail. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 5210-5217.
- Okazaki, I., Himeno, M., Ezaki, J., Ishikawa, T. und Kato, K. (1992) Purification and characterization of an 85 kDa sialoglycoprotein in rat-liver lysosomal membranes. *Journal of Biochemistry*, 111, 763-769.
- Orvisky, E., Sidransky, E., McKinney, C.E., LaMarca, M.E., Samimi, R., Krasnewich, D., Martin, B.M. und Ginns, E.I. (2000) Glucosylsphingosine accumulation in mice and patients with type 2 Gaucher disease begins early in gestation. *Pediatric Research*, 48, 233-237.
- Pain, R.H., Lah, T. und Turk, V. (1985) Conformation and processing of cathepsin-D. *Bioscience Reports*, 5, 957-967.
- Patrick, A.D. (1965) Short communications: a deficiency of glucocerebrosidase in Gaucher's disease. *The Biochemical Journal*, 97, 17C-18C.
- Peters, C. und von Figura, K. (1994) Biogenesis of lysosomal membranes. *FEBS Letters*, 346, 108-114.
- Pfistershammer, K., Majdic, O., Stockl, J., Zlabinger, G., Kirchberger, S., Steinberger, P. und Knapp, W. (2004) CD63 as an activation-linked T-cell costimulatory element. *Journal of Immunology*, 173, 6000-6008.
- Pohlmann, R., Boeker, M.W.C. und von Figura, K. (1995) The 2 mannose 6-phosphate receptors transport distinct complements of lysosomal proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 27311-27318.
- Portnoy, D.A., Auerbuch, V. und Glomski, I.J. (2002) The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. *Journal of Cell Biology*, 158, 409-414.
- Purkerson, J.M. und Schwartz, G.J. (2007) The role of carbonic anhydrases in renal physiology. *Kidney International*, 71, 103-115.
- Radford, K.J., Mallesch, J. und Hersey, P. (1995) Suppression of human-melanoma cell-growth and metastasis by the melanoma-associated antigen CD63 (ME491). *International Journal of Cancer*, 62, 631-635.
- Radford, K.J., Thorne, R.F. und Hersey, P. (1996) CD63 associates with transmembrane 4 superfamily members, CD9 and CD81, and with beta 1 integrins in human melanoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 222, 13-18.
- Radford, K.J., Thorne, R.F. und Hersey, P. (1997) Regulation of tumor cell motility and migration by CD63 in a human melanoma cell line. *Journal of Immunology*, 158, 3353-3358.

- Reczek, D., Schwake, M., Schröder, J., Hughes, H., Blanz, J., Jin, X.Y., Brondyk, W., Van Patten, S., Edmunds, T. und Saftig, P. (2007) LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell*, 131, 770-783.
- Renlund, M., Tietze, F. und Gahl, W. (1986) Defective sialic acid egress from isolated fibroblast lysosomes of patients with Salla disease. *Science*, 232, 759-762.
- Rijnboutt, S., Kal, A.J., Geuze, H.J., Aerts, J.M. und Strous, G.J. (1991) Mannose 6-phosphate-independent targeting of cathepsin-D to lysosomes in HepG2 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 23586-23592.
- Rome, L., Hill, D., Bame, K. und Crain, L. (1983) Utilization of exogenously added acetyl coenzyme A by intact isolated lysosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 258, 3006-3011.
- Ron, I. und Horowitz, M. (2005) ER retention and degradation as the molecular basis underlying Gaucher disease heterogeneity. *Human Molecular Genetics*, 14, 2387-2398.
- Rous, B.A., Reaves, B.J., Ihrke, G., Briggs, J.A.G., Gray, S.R., Stephens, D.J., Banting, G. und Luzio, J.P. (2002) Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes. *Molecular Biology of the Cell*, 13, 1071-1082.
- Ruiz-Mateos, E., Pelchen-Matthews, A., Deneka, M. und Marsh, M. (2008) CD63 is not required for the production of infectious human immunodeficiency virus type 1 in human macrophages. *Journal of Virology*, 82, 4751-4761.
- Russel, W.C., Newman, C. und Williamson, D.H. (1975) A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasma and virus. *Nature*, 253, 461-462.
- Sachs, N., Kreft, M., Weerman, M.A.V., Beynon, A.J., Peters, T.A., Weening, J.J. und Sonnenberg, A. (2006) Kidney failure in mice lacking the tetraspanin CD151. *Journal of Cell Biology*, 175, 33-39.
- Saftig, P. (2005) Lysosomal Membrane Proteins. in *Lysosomes*, ed. Saftig, P., Springer Science + Business Media, New York, USA. 64-77.
- Saftig, P., Hartmann, D., Lüllmann-Rauch, R., Wolff, J., Evers, M., Koster, A., Hetman, M., von-Figura, K. und Peters, C. (1997) Mice deficient in lysosomal acid phosphatase develop lysosomal storage in the kidney and central nervous system. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 18628-18635.
- Sambrook, J., Fritsch E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, USA.
- Sandoval, I.V., Arredondo, J.J., Alcalde, J., Noriega, A.G., Vandekerckhove, J., Jimenez, M.A. und Rico, M. (1994) The residues Leu(Ile)(475)-Ile(Leu,Val,Ala)(476), contained in the extended carboxyl cytoplasmic tail, are critical for targeting of the resident lysosomal membrane-protein LIMP-II to lysosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 6622-6631.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 5463-5467.

- Santambrogio, L., Sato, A.K., Carven, G.J., Belyanskaya, S.L., Strominger, J.L. und Stern, L.J. (1999) Extracellular antigen processing and presentation by immature dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 15056-15061.
- Sasaki, S. und Noda, Y. (2007) Aquaporin-2 protein dynamics within the cell. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 16, 348-352.
- Sato, K., Aoki, J., Misawa, N., Daikoku, E., Sano, K., Tanaka, Y. und Koyanagi, Y. (2008) Modulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity through incorporation of tetraspanin proteins. *Journal of Virology*, 82, 1021-1033.
- Sawkar, A.R., D'Haese, W. und Kelly, J.W. (2006) Therapeutic strategies to ameliorate lysosomal storage disorders - a focus on Gaucher disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63, 1179-1192.
- Schafer, J.A., Watkins, M.L., Li, L., Herter, P., Haxelmans, S. und Schlatter, E. (1997) A simplified method for isolation of large numbers of defined nephron segments. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 42, 650-657.
- Schmid, S.L. (1997) Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: An integrated process. *Annual Review of Biochemistry*, 66, 511-548.
- Schmitz, M., Alfalah, M., Aerts, J.M., Naim, H.Y. und Zimmer, K.P. (2005) Impaired trafficking of mutants of lysosomal glucocerebrosidase in Gaucher's disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37, 2310-2320.
- Schneider, J., Jonas, A., Smith, M. und Greene, AA. (1984) Lysosomal transport of cystine and other small molecules. *Biochem Soc Trans.*, 12, 908-910.
- Schröder, B., Wrocklage, C., Pan, C., Jäger, R., Kösters, B., Schäfer, H., Elsässer, H.P., Mann, M. und Hasilik, A. (2007) Integral and associated lysosomal membrane proteins. *Traffic*, 8, 1676-1686.
- Schütte, C.G., Pierstorff, B., Hüttler, S. und Sandhoff, K. (2001) Sphingolipid activator proteins: proteins with complex functions in lipid degradation and skin biogenesis. *Glycobiology*, 11, 81-90.
- Schwappach, B., Zerangue, N., Jan, Y.N. und Jan, L.Y. (2000) Molecular basis for K-ATP assembly: Transmembrane interactions mediate association of a K⁺ channel with an ABC transporter. *Neuron*, 26, 155-167.
- Schwartz, G.J. (2002) Physiology and molecular biology of renal carbonic anhydrase. *Journal of Nephrology*, 15, 61-74.
- Schweizer, A., Kornfeld, S. und Rohrer, J. (1997) Proper sorting of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor in endosomes depends on a pair of aromatic amino acids in its cytoplasmic tail. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 14471-14476.
- Sincock, P.M., Mayrhofer, G. und Ashman, L.K. (1997) Localization of the transmembrane 4 superfamily (TM4SF) member PETA-3 (CD151) in normal human tissues: Comparison with CD9, CD63, and alpha 5 beta 1 integrin. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 45, 515-525.

- Smith, M., Bleijs, R., Radford, K. und Hersey, P. (1997) Immunogenicity of CD63 in a patient with melanoma. *Melanoma Research*, 7, S163-S170.
- Song, B.K., Levy, S. und Geisert, E.E. (2004) Increased density of retinal pigment epithelium in CD81^{-/-} mice. *Journal of Cellular Biochemistry*, 92, 1160-1170.
- Sorge, J.A., West, C., Kuhl, W., Treger, L. und Beutler, E. (1987) The human glucocerebrosidase gene has 2 functional ATG initiator codons. *American Journal of Human Genetics*, 41, 1016-1024.
- Stein, M., Braulke, T., Krentler, C., Hasilik, A. und von Figura, K. (1987) 46-kDa mannose 6-phosphate-specific receptor: biosynthesis, processing, subcellular location and topology. *Hoppe Seylers Zeitschrift für Biologische Chemie*, 368, 937-947.
- Steinman, R., Mellman, I., Müller, W. und Cohn, Z. (1983) Endocytosis and recycling of plasma membrane. *Journal of Cell Biology*, 96, 1-27.
- Sterk, L.M.T., Geuijen, C.A.W., Oomen, L.C.J.M., Calafat, J., Janssen, H. und Sonnenberg, A. (2000) The tetraspan molecule CD151, a novel constituent of hemidesmosomes, associates with the integrin alpha 6 beta 4 and may regulate the spatial organization of hemidesmosomes. *Journal of Cell Biology*, 149, 969-982.
- Sterk, L.M.T., Geuijen, C.A.W., van den Berg, J.G., Claessen, N., Weening, J.J. und Sonnenberg, A. (2002) Association of the tetraspanin CD151 with the laminin-binding integrins alpha 3 beta 1, alpha 6 beta 1, alpha 6 beta 4 and alpha 7 beta 1 in cells in culture and in vivo. *Journal of Cell Science*, 115, 1161-1173.
- Stipp, C.S., Kolesnikova, T.V. und Hemler, M.E. (2003) Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 28, 106-112.
- Stone, D.L., Carey, W.F., Christodoulou, J., Sillence, D., Nelson, P., Callahan, M., Tayebi, N. und Sidransky, E. (2000) Type 2 Gaucher disease: the collodion baby phenotype revisited. *Archives of disease in childhood*, 82, 163-166.
- Storch, S. und Braulke, T. (2005) Transport of lysosomal enzymes, in *Lysosomes*, ed. Saftig, P., Springer Science + Business Media, New York, USA. 17-26.
- Suárez-Quian, C. (1987) The distribution of four lysosomal integral membrane proteins (LIMPs) in rat basophilic leukemia cells. *Tissue & Cell*, 19, 495-504.
- Sulston, J., Du, Z., Thomas, K., Wilson, R., Hillier, L., Staden, R., Halloran, N., Green, P., Thierymieg, J., Qiu, L., Dear, S., Coulson, A., Craxton, M., Durbin, R., Berks, M., Metzstein, M., Hawkins, T., Ainscough, R. und Waterston, R. (1992) The *C. elegans* genome sequencing project - A beginning. *Nature*, 356, 37-41.
- Sun, X.M., Soleimani, M. und Petrovic, S. (2008) Decreased expression of Slc26a4 (pendrin) and Slc26a7 in the kidneys of carbonic anhydrase II-deficient mice. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 21, 95-108.
- Sun, Y., Qi, X.Y. und Grabowski, G.A. (2003) Saposin C is required for normal resistance of acid beta-glucosidase to proteolytic degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 31918-31923.
- Suter, U. und Scherer, S.S. (2003) Disease mechanisms in inherited neuropathies. *Nature Reviews Neuroscience*, 4, 714-726.

- Tabuchi, N., Akasaki, K., Sasaki, T., Kanda, N. und Tsuji, H. (1997) Identification and characterization of a major lysosomal membrane glycoprotein, LGP85/LIMP II in mouse liver. *Journal of Biochemistry*, 122, 756-763.
- Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., Eskelinen, E.L., Hartmann, D., Lüllmann-Rauch, R., Janssen, P.M.L., Blanz, J., von Figura, K. und Saftig, P. (2000) Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature*, 406, 902-906.
- Tang, D.C., Devit, M. und Johnston, S.A. (1992) Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune-response. *Nature*, 356, 152-154.
- Tarentino, A.L., Gomez, C.M. und Plummer, T.H.Jr. (1985) Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F. *Biochemistry*, 24, 4665-4671.
- Tarrant, J.A., Groom, J., Metcalf, D., Li, R.L., Borobokas, B., Wright, M.D., Tarlinton, D. und Robb, L. (2002) The absence of Tssc6, a member of the tetraspanin superfamily, does not affect lymphoid development but enhances in vitro T-cell proliferative responses. *Molecular and Cellular Biology*, 22, 5006-5018.
- Tikkanen, R., Peltola, M., Oinonen, C., Rouvinen, J. und Peltonen, L. (1997) Several cooperating binding sites mediate the interaction of a lysosomal enzyme with phosphotransferase. *EMBO Journal*, 16, 6684-6693.
- Toothill, V.J., Vanmourik, J.A., Niewenhuis, H.K., Metzelaar, M.J. und Pearson, J.D. (1990) Characterization of the enhanced adhesion of neutrophil leukocytes to thrombin-stimulated endothelial-cells. *Journal of Immunology*, 145, 283-291.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets - procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 4350-4354.
- Trimble, R.B., Tarentino, A.L., Plummer, T.H.Jr. und Maley, F. (1978) Asparaginyl glycopeptides with a low mannose content are hydrolyzed by endo-beta-N-acetylglucosaminidase H. *Journal of Biological Chemistry*, 253, 4508-4511.
- Trombetta, E.S. und Mellman, I. (2005) Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annual Review of Immunology*, 23, 975-1028.
- Tsitsikov, E.N., GutierrezRamos, J.C. und Geha, R.S. (1997) Impaired CD19 expression and signaling, enhanced antibody response to type II T independent antigen and reduction of B-1 cells in CD81-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 10844-10849.
- Vaccaro, A.M., Ciaffoni, F., Tatti, M., Salvioli, R., Barca, A., Tognozzi, D. und Scerch, C. (1995) pH-dependent conformational properties of saposins and their interactions with phospholipid membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 30576-30580.
- Vaccaro, A.M., Salvioli, R., Tatti, M. und Ciaffoni, F. (1999) Saposins and their interaction with lipids. *Neurochemical Research*, 24, 307-314.
- Vaccaro, A.M., Tatti, M., Ciaffoni, F., Salvioli, R., Barca, A. und Scerch, C. (1997) Effect of saposins A and C on the enzymatic hydrolysis of liposomal glucosylceramide. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 16862-16867.

- van Dongen, J.M., Willemsen, R., Ginns, E.I., Sips, H.J., Tager, J.M., Barranger, J.A. und Reuser, A.J. (1985) The subcellular localization of soluble and membrane-bound lysosomal enzymes in I-Cell fibroblasts: a comparative immunocytochemical study. *European Journal of Cell Biology*, 39, 179-189.
- van Spriël, A.B., Puls, K.L., Sofi, M., Pouniotis, D., Hochrein, H., Orinska, Z., Knobloch, K.P., Plebanski, M. und Wright, M.D. (2004) A regulatory role for CD37 in T cell proliferation. *Journal of Immunology*, 172, 2953-2961.
- Vanderloo, J.C.M., Slieker, W.A.T., Kieboom, D. und Ploemacher, R.E. (1995) Identification of hematopoietic stem-cell subsets on the basis of their primitiveness using antibody Er-Mp12. *Blood*, 85, 952-962.
- Vega, M.A., Rodriguez, F., Segui, B., Cales, C., Alcalde, J. und Sandoval, I.V. (1991) Targeting of lysosomal integral membrane-protein LIMP-II - the tyrosine-lacking carboxyl cytoplasmic tail of LIMP-II is sufficient for direct targeting to lysosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 16269-16272.
- Vennegoor, C., Calafat, J., Hageman, P., van Buitenen, F., Janssen, H., Kolk, A. und Rümke, P. (1985) Biochemical characterization and cellular localization of a formalin-resistant melanoma-associated antigen reacting with monoclonal antibody NKI/C-3. *International Journal of Cancer*, 35, 287-295.
- von Lindern, J.J., Rojo, D., Grovit-Ferbas, K., Yeramian, C., Deng, C., Herbein, G., Ferguson, M.R., Pappas, T.C., Decker, J.M., Singh, A., Collman, R.G. und O'Brien, W.A. (2003) Potential role for CD63 in CCR5-mediated human immunodeficiency virus type 1 infection of macrophages. *Journal of Virology*, 77, 3624-3633.
- Vyas, J.M., Kim, Y.M., Artavanis-Tsakonas, K., Love, J.C., Van der Veen, A.G. und Ploegh, H.L. (2007) Tubulation of class II MHC compartments is microtubule dependent and involves multiple endolysosomal membrane proteins in primary dendritic cells. *Journal of Immunology*, 178, 7199-7210.
- Wall, S.M. (2005) Recent advances in our understanding of intercalated cells. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 14, 480-484.
- Weaver, D.J., Cherukuri, A., Carrero, J., Coelho-Sampaio, T., Durack, G. und Voss, E.W. (1996) Macrophage mediated processing of an exogenous antigenic fluorescent probe: Time-dependent elucidation of the processing pathway. *Biology of the Cell*, 87, 95-104.
- Wendeler, M., Hörnschemeyer, J., Hoffmann, D., Kolter, T., Schwarzmann, G. und Sandhoff, K. (2004) Photoaffinity labelling of the human GM2-activator protein - Mechanistic insight into ganglioside GM2 degradation. *European Journal of Biochemistry*, 271, 614-627.
- Werner, T. (1999) Models for prediction and recognition of eukaryotic promoters. *Mammalian Genome*, 10, 168-175.
- Wickner, W.T. und Lodish, H.F. (1985) Multiple mechanisms of protein insertion into and across membranes. *Science*, 230, 400-407.
- Wilkening, G., Linke, T. und Sandhoff, K. (1998) Lysosomal degradation on vesicular membrane surfaces - Enhanced glucosylceramide degradation by lysosomal anionic lipids and activators. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 30271-30278.
- Wright, C.S., Zhao, Q. und Rastinejad, F. (2003) Structural analysis of lipid complexes of GM2-activator protein. *Journal of Molecular Biology*, 331, 951-964.

- Wright, M.D., Geary, S.M., Fitter, S., Moseley, G.W., Lau, L.M., Sheng, K.C., Apostolopoulos, V., Stanley, E.G., Jackson, D.E. und Ashman, L.K. (2004) Characterization of mice lacking the tetraspanin superfamily member CD151. *Molecular and Cellular Biology*, 24, 5978-5988.
- Yauch, R.L., Berditchevski, F., Harler, M.B., Reichner, J. und Hemler, M.E. (1998) Highly stoichiometric, stable, and specific association of integrin alpha 3 beta 1 with CD151 provides a major link to phosphatidylinositol 4 kinase, and may regulate cell migration. *Molecular Biology of the Cell*, 9, 2751-2765.
- Yauch, R.L. und Hemler, M.E. (2000) Specific interactions among transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins and phosphoinositide 4-kinase. *Biochemical Journal*, 351, 629-637.
- Yoshida, T., Kawano, Y., Sato, K., Ando, Y., Aoki, J., Miura, Y., Komano, J., Tanaka, Y. und Koyanagi, Y. (2008) A CD63 mutant inhibits T-cell tropic human immunodeficiency virus type 1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. *Traffic*, 9, 540-558.
- You, K.H., Hsieh, C.L., Hayes, C., Stahl, N., Francke, U. und Popko, B. (1991) DNA-Sequence, genomic organization, and chromosomal localization of the mouse peripheral myelin protein zero gene - Identification of polymorphic alleles. *Genomics*, 9, 751-757.
- Young, P. und Suter, U. (2003) The causes of Charcot-Marie-Tooth disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60, 2547-2560.
- Yunta, M. und Lazo, P.A. (2003) Tetraspanin proteins as organisers of membrane microdomains and signalling complexes. *Cellular Signalling*, 15, 559-564.
- Zerangue, N., Jan, Y.N. und Jan, L.Y. (2000) An artificial tetramerization domain restores efficient assembly of functional Shaker channels lacking T1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 3591-3595.
- Zerangue, N., Schwappach, B., Jan, Y.N. und Jan, L.Y. (1999) A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K-ATP channels. *Neuron*, 22, 537-548.
- Zhao, H. und Grabowski, G.A. (2002) Gaucher disease: perspectives on a prototype lysosomal disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59, 694-707.
- Ziegler, S.F., Ramsdell, F. und Alderson, M.R. (1994) The Activation Antigen CD69. *Stem Cells*, 12, 456-465.
- Zimmer, K.P., Le Coutre, P., Aerts, J.M., Harzer, K., Fukuda, M., O'Brien, J.S. und Naim, H.Y. (1999) Intracellular transport of acid beta-glucosidase and lysosome-associated membrane proteins is affected in Gaucher's disease (G202R mutation). *Journal of Pathology*, 188, 407-414.

9 Anhang

Geräte

| | |
|--------------------------------|---|
| Agarosegeldokumentationsanlage | Gel Jet Imager, Intas, Göttingen, D |
| Agarosegelkammer | Modell H5, Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, USA |
| Aggregometer | Fibrinometer 4, APACT Laborgeräte und Analysensysteme, Hamburg, D |
| Binokular | Leica MZ16, Leica, Wetzlar, D |
| Blutgasvollautomat | ECOSYS II, Eschweiler, Kiel, D |
| Chemolumineszenzkamera | LAS-3000mini, Fujifilm, Tokyo, Japan |
| DNA-Photometer | GeneQuant pro, Biochrom Ltd, Cambridge, UK |
| Elektroporationsgerät | Gene Pulser™, BioRad, München, D |
| FACS-Gerät | FACScan oder FACScalibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Fuji FLA-5000 Phosphoimager | Fujifilm, Tokyo, Japan |
| Gewebehomogenisator | precellis 24, Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich |
| Inkubatoren (Zellkultur) | Heraeus, Hanau, D |
| (Bakterien) | Memmert, Schwabach, D |
| | Heraeus, Hanau, D |
| | Gallenkamp, Loughborough, UK |
| Messerbrecher | Leica EM KMR2, Leica, Wetzlar, D |
| metabolische Käfige | Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA |
| 96-well-Mikrotiterplattenleser | Sunrise, Tecan, Grailsheim, D |
| Mikropipetten | Gilson, Middleton, WI, USA und Eppendorf, Hamburg, D |
| Mikroskope | Axiovert 200M, Carl Zeiss, Jena, D |
| Fluoreszenzmikroskop | EM 900, Carl Zeiss, Jena, D |
| Elektronenmikroskop | Axiophot, Carl Zeiss, Jena, D |
| Lichtmikroskop | Cryo-Mikrotom, Leica SM2000R, Leica, Wetzlar, D und Leica EM UC6, Leica, Wetzlar, D |
| Mikrotom | Dräger-Vapor® 19.n, Dräger AG, Lübeck, D |
| Narkosemittel-Verdunster | Fiske Micro-Osmometer, Model 210, Fiske Associates, Norwood, MA, USA |
| Osmometer | GeneAmp PCR system 2400, PerkinElmer, Wellesley, MA, USA |
| PCR-Cycler | Fine Science Tools, Heidelberg, D |
| Präparationsbesteck | Mini-Protean 3-Elektrophoresis-System, BioRad, Hercules, USA |
| SDS-PAGE Kammer | Modell Twin L (45-2019i), PeqLab Biotechnology, Erlangen, D |
| <i>Semi-dry-Blot-Apparatur</i> | Transblot SD, BioRad, München, D |
| Spannungsquelle | Powerpack 200/300, BioRad, München, D |
| Sterilbank | danLAF VFR 1806, Claus Damm A/S, Humlebaek, DK |
| <i>Tank-Blot-Apparatur</i> | Trans-Blot Cell, BioRad, München, D |
| | Mini Trans-Blot Cell, BioRad, München, D |
| Thermoblock | Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg, D |
| Ultraschallbad | Branson Sonifier 450, G. Heinemann, Schwäbisch-Gmünd, D |
| UV-Crosslinker | BioLink 254nm, Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, Frankreich |

| | |
|------------------|---|
| UV-Tisch | Reprostar, Camag, Muttenz, Schweiz |
| Verstärkerfolien | Cronex, Dupont Co., Wilmington, DE, USA |
| XAR-Röntgenfilm | Kodak, Rochester, NY, USA |
| Zentrifugen | Tischzentrifuge: Centrifuge 5415C und D, Eppendorf, Hamburg, D oder Biofuge vito, Heraeus, Hanau, D Hämatokrit-Zentrifuge: EBA21, Hettich, Tuttlingen, D Universal 32, Typ 1605, Hettich, Tuttlingen, D Centrifuge J2-21, Beckmann Fullerton, CA, USA (Rotor JA17) Centrifuge GS-614R, Beckmann, Fullerton, CA, USA |

Reagenzien

| | |
|--|--|
| 30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid | Rotiphorese Gel 30, Roth, Karlsruhe, D |
| ADP | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| Agar-Agar | hochreine Qualität, Roth, Karlsruhe, D |
| Agarose | Ultra-Qualität, Roth, Karlsruhe, D |
| α -Ketoglutarat | Kaliumsalz, Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| ALLN | InSolution®, Merck, Darmstadt, D |
| 4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid | AEBSF, Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| Ammoniumchlorid | 99,5 %, p.a., Roth, Karlsruhe, D |
| Ampicillin | Melford Laboratories, Chelsworth, UK |
| APS | p.a., Roth, Karlsruhe, D |
| Araldit M | Fluka, Buchs, Schweiz |
| Araldit M Beschleuniger 960 | Fluka, Buchs, Schweiz |
| Äther | Diethylether, Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| Bafilomycin A1 | aus <i>Streptomyces griseus</i> , Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| Bleinitrat | Merck, Darmstadt, D |
| Borax | $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$, Merck, Darmstadt, D |
| BSA | Albumin Fraktion V, Protease-frei, $\geq 98 \%$, Roth, Karlsruhe, D |
| Bromphenolblau | Canalco, Bethesda, MD, USA |
| Calciumchlorid-Dihydrat | p.a., Merck, Darmstadt, D |
| Chlorform | Trichlormethan, 99 %, Riedel-de-Haën, Seelze, D |
| Chloroquine | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| CIAP | Fermentas, St. Leon-Rot, D |
| <i>Collagen-related Peptide</i> (CRP) | Steve. P. Watson, Department of Pharmacology, University of Oxford, UK |
| Coomassie | Brilliant Blau R250, Roth, Karlsruhe, D |
| Complete Proteaseinhibitor | Roche, Mannheim, D |
| DABCO | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| DAPI | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| ddH ₂ O | Millipore, Billerica, USA, Membrapure, Bodenheim, D |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat, $\geq 97 \%$, Roth, Karlsruhe, D |
| DePeX | Serva, Heidelberg, D |
| Desoxycytosin-(α - ³² P)triphosphat | Amersham, Little Chalfont, UK |
| Dextransulfat | Pharmacia, Freiburg, D |
| Di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat | $\geq 99,5 \%$, p.a., Roth, Karlsruhe, D |
| Dithiothreitol | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| DMEM High Glucose | PAA Laboratories, Linz, Österreich |

| | |
|-----------------------------------|--|
| DMEM -Methionin, -Cystein | Gibco/Invitrogen, Paisley, UK |
| DMSO | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| DNA-Auftragspuffer | 6x Loading Dye, Fermentas, St. Leon-Rot, D |
| DNA-1kb-Marker | DNA-Längenstandard X, Roche, Mannheim, D |
| DNA-Polymerasen Pfu | Fermentas, St. Leon-Rot, D |
| Taq | Fermentas, St. Leon-Rot, D |
| DNase | RNAse-Free DNase Set; Qiagen, Hilden, D |
| DNase I | Roche, Mannheim, D |
| dNTPs | Fermentas, St. Leon-Rot, D |
| DSS | Pierce, Rockford, IL, USA |
| Duodecenylnbernsteinsäureanhydrid | Merck, Darmstadt, D |
| EBSS | Gibco/Invitrogen, Paisley, UK |
| EDTA | Roth, Karlsruhe, D |
| Eisessig | 99 – 100 %, Riedel-de-Haën, Seelze, D |
| Endoglykosidase H | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D |
| Ethanol | 99,8 %, p.a., Roth, Karlsruhe, D |
| Ethanolamin | 98 %, Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| Ethidiumbromidlösung | 1 %-ig, Roth, Karlsruhe, D |
| FCS | PAA Laboratories GmbH, Pasching, D |
| Ficoll | p.a., Serva, Heidelberg, D |
| Formaldehyd | 37 %, Roth, Karlsruhe, D |
| Formamid | p.a., Fluka, Seelze, D |
| Fugene6 | Roche, Mannheim, D |
| Glukonat | Calciumsalz, Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| Glukose | > 97 %, Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| Glutaraldehyd | 25 %, Merck, Darmstadt, D |
| Glycerol/Glycerin | ≥ 86 %, Ph.Eur., reinst, Roth, Karlsruhe, D |
| Glycin | ≥ 99 %, p.a., Roth, Karlsruhe, D |
| Heparin | Liquemin® N25000, Natriumsalz, Roche, Mannheim, D |
| Hefeextrakt | pulverisiert für die Bakteriologie, Roth, Karlsruhe, D |
| HEPES | p.a., Roth, Karlsruhe, D |
| Isoamylalkohol | zur Synthese, Merck, Darmstadt, D |
| Isofluran | 1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyl-difluoromethylether, Forene®, Abbott GmbH, Wiesbaden, D |
| Isopropanol | p.a., Roth, Karlsruhe, D |
| Kaliumchlorid | ≥ 99,5 %, p.a., Roth, Karlsruhe, D |
| Kaliumdihydrogenphosphat | ≥ 99 %, p.a., Roth, Karlsruhe, D |
| Kaliumhydrogencarbonat | Merck, Darmstadt, D |
| Kanamycin | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| Kollagen | Kollagenreagent Horm; Nycomed, Linz, Österreich |
| Kollagenase Typ II | PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, D |
| Lachsspermien-DNA | 10 mg/ml, Invitrogen, Paisley, UK |
| Leupeptin | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| L-Glutamin | 100x, 200 mM, Gibco, Paisley, UK |
| Lipofectamin2000 | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| <i>Lysotracker Red</i> | DND-99, Invitrogen, Paisley, UK |
| Magermilchpulver | Roth, Karlsruhe, D |
| Magnesiumchlorid-Hexahydrat | p.a., Merck, Darmstadt, D |
| 2-Mercaptoethanol | p.a., Roth, Karlsruhe, D |
| Methanol | Roth, Karlsruhe, D |
| MG132 | InSolution®, Merck, Darmstadt, D |
| MOPS | Pufferan ≥ 99 %, Roth, Karlsruhe, D |

| | |
|--|--|
| Mowiol | 4-88 Reagent, Calbiochem, LaJolla, CA, USA |
| Natriumacetat-Trihydrat | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| Natriumazid | > 99,8 %, Roth, Karlsruhe, D |
| Natriumchlorid | Roth, Karlsruhe, D |
| Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat | Roth, Karlsruhe, D |
| Natriumhydrogencarbonat | p.a., Merck, Darmstadt, D |
| Natriumhydroxid | ≥ 98,5 %, Riedel-de-Haën, Seelze, D |
| N-Glykosidase F (PNGase F) | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| p-Nitrocatecholsulfat | ≥ 98 % (TLC), Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| p-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glukopyranosid | ≥ 98 % (TLC), Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| p-Nitrophenyl-β-D-glukopyranosid | ≥ 98 % (TLC), Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| NP-40 | Calbiochem, LaJolla, CA, USA |
| Oligo(dT)15-Primer | Promega, Madison, WI, USA |
| Osmiumtetroxid | Roth, Karlsruhe, D |
| Paraformaldehyd | purum, ≥ 95 %, Fluka, Buchs, Schweiz |
| Penicillin/Streptomycin | 100x, PAA-Laboratories, Linz, Österreich |
| Pepstatin A | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| Phenol | ≥ 99,5 %, p.a., kristallisiert, lose, Roth, Karlsruhe, D |
| Phenylmethylsulfonylfluorid | PMSF, Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| Polyvinylpyrrolidin | p.a., Serva, Heidelberg, D |
| Ponceau S-Lösung | 0,1 %-ig in 5 % Essigsäure, Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| Procain | p-Amino-benzoesäure-2-diethylaminoethylester-hydrochlorid, Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| Propylenoxid | 1, 2-Epoxy-Propan, Roth, Karlsruhe, D |
| Protease Typ XIV | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| Protein-A-Sepharose | Immobilized Protein A, Pierce, Rockford, IL, USA |
| Protein-G-Sepharose | Immobilized Protein A, Pierce, Rockford, IL, USA |
| Proteinmarker | Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus, Fermentas, St. Leon-Rot, D |
| Pursept A | Merz Pharma, Frankfurt a.M., D |
| Pyronin | Fluka, Buchs, Schweiz |
| Quantum-286-Medium | für Epithelzellen, PAA Laboratories, Linz, Österreich |
| Restriktionsenzyme | Fermentas, St. Leon-Rot, D |
| Salzsäure | 37 %, reinst, Roth, Karlsruhe, D |
| Saponin | rein, Roth, Karlsruhe, D |
| Satavaptan | Sanofi-Aventis, Frankfurt, D |
| SDS | Roth, Karlsruhe, D |
| ³⁵ S-Methionin/Cystein | [³⁵ S]Met-label, Hartman Analytic GmbH, Braunschweig, D |
| Sucrose | D(+)-Saccharose, ≥ 99,5 %, p.a., Roth, Karlsruhe, D |
| T4-DNA-Ligase | Fermentas, St. Leon-Rot, D |
| Temed | 99 % für SDS-PAGE, p.a., Roth, Karlsruhe, D |
| Thio Med (Thioglycolat) | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D |
| Thrombin | Roche, Mannheim, D |
| Toluidinblau | Merck, Darmstadt, D |
| Trichloressigsäure (TCA) | Fluka, Buchs, Schweiz |
| Tri-Natriumcitrat-Dihydrat | Roth, Karlsruhe, D und Merck, Darmstadt, D |
| Tris | Roth, Karlsruhe, D |
| Triton X-100 | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| Trypanblau | 0,4 %, Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA |
| Trypsin/EDTA | 1x, PAA-Laboratories, Linz, Österreich |

| | |
|---------------------------|--|
| Trypsin-Inhibitor | Fluka, Buchs, Schweiz |
| Trypton/Pepton aus Casein | pankreatisch verdaut, Roth, Karlsruhe, D |
| Tween-20 | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| U46619 | Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA |
| Uranylacetat | Merck, Darmstadt, D |
| Vasopressin | AVP = Arginin-Vasopressin, Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| Ziegenserum | DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, D |
| Zitronensäure | wasserfrei, Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| Zwei-Komponentenkleber | Technovit 4071, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim im Taunus, D |

Kits

| | |
|---------------------------------------|--|
| Agarosegelextraktion | High Pure PCR Product Purification Kit, Roche, Mannheim, D |
| Gewebe-DNA-Extraktion | Invisorb Spin Tissue Kit, Invitex, Berlin, D |
| Immunopräzipitation | ProFound c-Myc Tag IP/Co-IP-Kit, Pierce, Rockford, IL, USA |
| <i>Northern/Southern-Blot</i> -Sonden | Megaprime Kit, Amersham, Little Chalfont, UK Prime-It II Random Primer Labelling Kit, Stratagene, LaJolla, CA, USA Probe Quant G-50 Micro Columns, Amersham, Little Chalfont, UK |
| <i>Midiprep-Kit</i> für Plasmide | Pure Yield Plasmid Midiprep System, Promega, Mannheim, D |
| <i>Miniprep-Kit</i> für Plasmide | E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I, peqlab, Erlangen, D |
| Proteingehaltbestimmung | BCA™ Protein Assay Kit, Pierce, Rockford, IL, USA |
| RNA-Isolation | RNAeasy Kit, Qiagen, Hilden, D |
| RT-PCR | Omniscript Reverse Transcriptase System, Qiagen, Hilden, D Oligo(dT)15-Primer, Promega, Madison, WI, USA |
| <i>Western-Blot-Detektionskit</i> | ECLadvanced WB detection System, Amersham, Little Chalfont, UK |

Labormaterialien

| | |
|--------------------------------|---|
| Deckgläschen | rund, Durchmesser d = 13 cm, Assistent, Sondheim, D |
| Dialyseschlauch | Dialysis Membrane Type 8, Ausschlussgröße: 12-16 kD, Porengröße: 25 Å, Biomol, Hamburg, D |
| Hämatokrit-Kapillaren | Mikro-Hämatokrit-Kapillaren, Natriumheparin, Brand, Wertheim, D |
| <i>Imaging-Platte</i> | Fuji BAS-MP 2025P, Fujifilm, Tokyo, Japan |
| Katheter (für Nierenperfusion) | Polyethylenschlauch, 1,0 mm Außen-, 0,5 mm Innendurchmesser, Eydam, Kiel, D |
| Kunststoffverbrauchsmaterial | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| Kupfernetze (für EM) | beschichtet, Stork Veco, Eerbeek, NL |
| Neubauer-Zählkammer | Assistent, Sondheim, D |
| Nitrocellulosemembran | Whatman Protran Nitrocellulose Transfer Membran, Whatman GmbH, Dassel, D |

| | |
|------------------------------|--|
| Nylonmembran | Hybond-N+, Amersham, Little Chalfont, UK |
| Objektträger | Menzel GmbH, Braunschweig, D |
| Parafilm „M“ | American National Can TM , Chicago, IL, USA |
| ProbeQuant G-50 Micro Colums | Amersham, Little Chalfont, UK |
| PVDF-Membran | Roth, Karlsruhe, D |
| Röntgenfilm | XAR-Röntgenfilm, Kodak, Rochester, NY, USA |
| Sterilfilter | Filtropur S 02, Sarstedt, Nümbrecht, D |
| Verstärkerfolie | Cronex, Dupont Co., Wilmington, DE, USA |
| Western-Blot-Filterpapiere | Schleicher & Schuell, Dassel, D |

Rezepte

ACD-Puffer (*Acid-Citrate-Dextrose*)

| | |
|--------|----------------------------|
| 85 mM | Tri-Natriumcitrat-Dihydrat |
| 65 mM | Zitronensäure |
| 110 mM | Glukose |
| pH 4,5 | |

98b-Lösung (Nierentubuli)

| | |
|--------|--|
| 140 mM | NaCl |
| 0,4 mM | KH ₂ PO ₄ |
| 1,6 mM | K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O |
| 1,0 mM | MgSO ₄ x 7 H ₂ O |
| 10 mM | Natriumacetat x 3 H ₂ O |
| 1,0 mM | α-Ketoglutarat |
| 1,3 mM | Calium-Gluconat x 1 H ₂ O |
| pH 7,4 | |

Bleicitrat-Lösung (Elektronenmikroskopie)

| | |
|--------|--|
| 1,33 g | Pb(NO ₃) ₂ |
| 1,76 g | Na ₃ (C ₆ H ₅ O ₇) x 2 H ₂ O |
| pH 12 | |

in 30 ml ddH₂O aufnehmen, kräftig schütteln, 30 min bei RT stehen lassen, regelmäßig schütteln + 8 ml 1 N NaOH, auf 50 ml mit ddH₂O auffüllen

Blockierlösung

| | |
|-------|------------------------|
| 0,1 M | Phosphatpuffer, pH 7,4 |
| 0,5 % | Triton X-100 |
| 0,2 % | BSA |
| 4,0 % | Ziegenserum |

Citratpuffer

| | |
|--------|------------------|
| 0,2 M | Natriumcitrat |
| 0,04 % | NaN ₃ |
| 0,2 % | BSA |
| pH 4,6 | |

Coomassie-Entfärbelösung

| | |
|------|--------------------|
| 10 % | Eisessig |
| 10 % | Isopropanol |
| 80 % | ddH ₂ O |

Coomassie-Färbelösung

| | |
|--------|--------------------|
| 0,18 % | Coomassie R250 |
| 50 % | Methanol |
| 6,9 % | Eisessig |
| 43 % | ddH ₂ O |

DABCO-Stammlösung (Aufbewahrung bei -20° C)
200 mg/ml Diazobicyclooctan in PBS

Denaturierungslösung

| | |
|-------|------|
| 1,5 M | NaCl |
| 0,5 M | NaOH |

50x Denhardts

| | |
|-----|---------------------|
| 1 % | Ficoll |
| 1 % | Polyvinylpyrrolidin |
| 1 % | BSA |

DEPC-Wasser (RNase frei)

0,1 % DEPC in ddH₂O
12 Std bei RT inkubieren
autoklavieren

EBC-Puffer

| | |
|--------|-------------------|
| 120 mM | NaCl |
| 50 mM | Tris/HCl |
| 1 % | NP-40 |
| 1 x | Proteaseinhibitor |

pH 7,4

Einbettungsmittel

| | |
|----------|----------|
| 17 % | Mowiol |
| 33 % | Glycerol |
| 50 mg/ml | DABCO |
| (1µg/ml | DAPI) |

in PBS

10x Elektrodenpuffer

| | |
|---------|-----------------------------------|
| 144,13g | Glycin |
| 30,29 g | Tris |
| 100 ml | 10 %-iges SDS in H ₂ O |

ad 1000ml ddH₂O (keinen pH-Wert einstellen)

Endo H-Puffer

100 mM Natriumcitrat
0,1 % 2-Mercaptoethanol
1 % SDS
1 x Proteaseinhibitor
pH 5,5

Enzymlösung (Nierentubuli)

1 mg/ml Kollagenase Typ II
1 mg/ml Protease Typ XIV
in Inkubationslösung

Erythrozyten-Lysispuffer

155 mM NH_4Cl
15 mM KHCO_3
1 mM EDTA
pH 7,3

FACS-Puffer

2,0 % FCS
0,1 % NaN_3
0,2 mM EDTA
in PBS, pH 7,4

1,2 %-iges FA-Agarosegel

1,2 g Agarose
10 ml 10x FA-Gelpuffer
90 ml DEPC-Wasser
aufkochen und abkühlen lassen
1,8 ml 37 %-iges Formaldehyd hinzugeben
8 μl 1 %-ige Ethidiumbromidlösung hinzugeben

1x FA-Gellaufpuffer

100 ml 10x FA-Gellaufpuffer
20 ml 37 % Formaldehyd
880 ml DEPC-Wasser

10x FA-Gelpuffer

200 mM MOPS
50 mM Natriumacetat
10 mM EDTA
pH 7,0

Hybridierungspuffer

72 ml Formamid
36 ml 20x SSC
1,5 ml 1 M Tris/HCl, pH 7,5
1,5 g SDS
3 ml 50x Denhardts
15 g Dextransulfat
ad 150 ml ddH₂O

Immunpräzipitations (IP)-Puffer

25 mM Tris-HCl
50 mM NaCl
0,5 % Natrium-Deoxycholat
0,5 % Triton X-100
pH 8,0

Inkubationslösung (Nierentubuli)

5 mM Glycin
48 mg/ml Trypsin-Inhibitor
0,25 mg/ml DNase I
in 98b-Lösung

LB-Medium (bei 4° C lagern)

10 g Trypton/Pepton aus Casein
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
in 950 ml ddH₂O dest. lösen, pH 7,0 einstellen
ad 1000 ml ddH₂O

LB-Agarplatten (bei 4° C lagern)

10 g Trypton/Pepton aus Casein
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
in 950 ml ddH₂O dest. lösen, pH 7,0 einstellen
15 g Agar-Agar
ad 1000 ml ddH₂O
nach dem Autoklavieren auf 65° C abkühlen lassen und in 10 cm-Schalen gießen

Lysispuffer

0,1 - 0,5 % Triton X-100
1x Complete Proteaseinhibitor
in PBS

Mowiol-Lösung (1 ml Aliquots bei -20° C lagern)

10 g Mowiol in 40 ml PBS lösen, 24 Std bei RT rühren
20 ml 10 %-iges Glycerol hinzugeben, 24 Std bei RT rühren
pH-Wert 6 - 7 mit pH-Papier überprüfen
15 min bei 12.000 rpm zentrifugieren

Mowiol/DABCO/(DAPI)

1 ml Mowiol Lösung
0,1 ml DABCO-Stammlösung
± 1 µl 1 mg/ml DAPI in PBS

NET-Puffer (Natriumchlorid-EDTA-Tris-Puffer)

100 mM NaCl
25 mM EDTA
2 mM Tris
pH 7,5

Neutralisierungslösung

1,5 M NaCl
0,5 M Tris/HCl
1 mM EDTA
pH 7,2

4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS (15 ml Aliquots bei -20°C aufbewahren)
4 g PFA (mindergiftig) unter dem Abzug abwiegen
in 100 ml PBS im Abzug unter Rühren auf 80°C erhitzen (hitzestabile Flasche)
auf RT abkühlen, pH-Wert von etwa 7,4 mit pH-Papier überprüfen

10x PBS-Stammlösung

80 g NaCl
11,5 g Na_2HPO_4 (wasserfrei)
2 g KCl
2 g KH_2PO_4
ad 1000 ml ddH₂O (pH 7,4)

PNGase F-Puffer 1

50 mM Na_3PO_4
1 % SDS
1 % 2-Mercaptoethanol
1x Complete Proteaseinhibitor
pH 7,8

PNGase F-Puffer 2

50 mM Na_3PO_4
1 % NP-40
1x Complete Proteaseinhibitor
pH 7,5

0,1 M Phosphatpuffer pH7,4

77,4 ml 1 M Na_2HPO_4
22,6 ml 1 M NaH_2PO_4
ad 1000 ml ddH₂O

Sammelgel (4,5 % Acrylamid, für ein 1,5 mm-Gel des Mini Protean Systems)

2,5 ml Sammelgelpuffer
1,6 ml 30 %-iges Acrylamid mit 0,8 % Bisacrylamid (37,6 : 1)
5,8 ml ddH₂O
60 μl 10 %-iges APS
30 μl 100 %-iges Temed

Sammelgelpuffer (bei RT aufbewahren)

30,28 g Tris/HCL
2 g SDS
ad 500 ml ddH₂O, pH 6,8

5x SDS-PAGE Probenauftragspuffer (bei RT aufbewahren, Niederschläge durch Erhitzen entfernen)

2,5 ml Tris/HCl pH 6,8

1 g SDS

5 ml 100 %-iges Glycerol

2,5 ml ddH₂O

0,05 g Bromphenolblau

SDS in Tris und ddH₂O lösen, Bromphenolblau lösen, zum Schluss Glycerol zugeben
(für reduzierenden Puffer: + 0,77 g Dithiothreitol)

Semi-Dry-Transferpuffer (bei 4° C aufbewahren)

3,03 g Tris

14,4 g Glycin

100 ml MeOH

ad 1000 ml ddH₂O, keinen pH-Wert einstellen**Sortierlösung (Nierentubuli)**

0,5 mg/ml Albumin

in Inkubationslösung

20x SSC

3 M NaCl

0,3 M Trinatriumcitrat

pH 7,0

Stopplösung

0,4 M Glycin/NaOH

pH 10,4

Stripping-Puffer20 ml 10 %-iges SDS in ddH₂O

6,25 ml 1 M Tris/HCl, pH 6,8

0,83 ml 2-Mercaptoethanol

73 ml ddH₂O**Sucroselösung**

0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4

30 % Sucrose

50x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)

242 g Tris

57,1 ml Eisessig

100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0

ad 1000ml ddH₂O**Tank-Blot-Puffer**

20 mM Tris

1,6 M Glycin

20 % Methanol

pH 8,3

Toluidinblau/Pyronin-Färbelösung

2 Teile 1 % Toluidinblau in 2 % Borax + 1 Teil 1 % Pyronin in destilliertem Wasser, pH 9,5 - 11,0

Trenngel (12,5 % Acrylamid, für ein 1,5 mm-Gel des Mini Protean Systems; für Gele mit einem anderen Prozentanteil Acrylamid wurden die Acrylamid-ddH₂O-Anteile entsprechend variiert)

2,5 ml Trenngelpuffer
 4,1 ml 30 %-iges Acrylamid mit 0,8 % Bisacrylamid (37,6 : 1)
 3,3 ml ddH₂O
 60 µl 10 %-iges APS
 30 µl 100 %-iges Temed

Trenngelpuffer (bei RT aufbewahren)

90,85 g Tris/HCl
 2 g SDS
 ad 500 ml ddH₂O, pH8,8

10x TBS-Stammlösung (bei RT aufbewahren)

48,72 g Tris
 40 ml 0,5 M EDTA
 163,6 g NaCl
 add 2000 ml ddH₂O, pH 7,5

TBST (bei RT aufbewahren)

1000 µl Tween-20 ad 1000 ml 1x TBS

Tyrode's Puffer

137 mM NaCl
 2,7 mM KCl
 12 mM NaHCO₃
 0,43 mM NaH₂PO₄
 0,1 % Glukose
 5 mM HEPES
 0,35 % BSA
 1 mM CaCl₂
 1 mM MgCl₂
 pH 7,3

Waschpuffer

0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4
 0,25 % Triton X-100

Software

| | |
|------------------------------------|---|
| Adope Photoshop | Adope Systems Inc., San Jose, CA, USA |
| Axiovision | Carl Zeiss, Jena, D |
| CellQuest | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Dragon Promotor Finder Version 1.5 | Bajic et al., 2002 |
| DNASTar | Lasergene, Madison, WI, USA |
| Excel | Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA |
| ImageReader LAS-3000 | Fujifilm, Tokyo, Japan |
| Metamorph | Visitron, München, D |
| Multi Gauge V. 3.0 | Fujifilm, Tokyo, Japan |
| Promotorinspektor | Genomatix Software GmbH, München, D; Werner, 1999 |

10 Lebenslauf

Name: Jenny Schröder
Geburtsdatum: 9. August 1981
Geburtsort: Wilhelmshaven
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1985-1987: St.-Willehard-Kindergarten (Vorschule) in Wilhelmshaven
1987-1991: Grundschule Kirchreihe in Wilhelmshaven
1991-1993: Orientierungsstufe Heppens in Wilhelmshaven
1993-2000: Gymnasium am Mühlenweg in Wilhelmshaven, Abschluss: Abitur (1,0)

Studium:

Oktober 2000-
Juni 2005: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Studium der Biochemie und Molekularbiologie
Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Paul Saftig,
Biochemisches Institut, Universität Kiel: „Die Charakterisierung des frühen
autophagosomalen Kompartimentes in Säugetierzellen“
Abschluss: Diplom („mit Auszeichnung“)

Promotion:

seit Oktober 2005: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Arbeitsgruppe von Professor Dr. Paul Saftig, Biochemisches Institut,
Universität Kiel
Thema: „Funktionelle Analyse der lysosomalen integralen
Membranproteine LIMP-1 und LIMP-2“

Stipendien, Wettbewerbe, Praktika:

- 2000: **XI. Internationale Biologie-Olympiade**; 16. Platz auf Bundesebene
- 2000: zweimonatiges Praktikum an der **Rockefeller Universität in New York** im „Laboratory of Neurobiology and Behavior“ von Professor Dr. Donald W. Pfaff
- 2001: **Jugend forscht**; Landessiegerin Schleswig-Holstein
- 2003-2005: Stipendiatin der **Studienstiftung des Deutschen Volkes**
- 2004: sechswöchiges Praktikum im “Secretory Pathway Laboratory” von Dr. Sharon Tooze, **Cancer Research UK**, London, GB
- seit 2006: Stipendiatin des **Böhringer Ingelheim Fonds**

Kongresse:

- April 2005: Gordon Research Conference “Autophagy in Stress, Development and Disease”; Poster: “Analysis of the Intracellular Distribution of Mammalian Atg5.”
- September 2007: 16th ESGLD Workshop (European Study Group on Lysosomal Diseases); Poster: “A Lysosomal Tetraspanin: LIMP-1/CD63 - Analysis of LIMP-1-deficiency.”
- März 2008: 31. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie; Poster: „LIMP-2 is a Receptor for Lysosomal Mannose-6-Phosphate-Independent Targeting of β -Glucocerebrosidase.“
- Juni 2008: FASEB Summer Research Conference “Signal Transduction Through Tetraspanins and Other Multi-Protein Cell Surface Complexes”; Poster: “A Lysosomal Tetraspanin: LIMP-1/CD63 - Analysis of LIMP-1-deficiency.”

Veröffentlichungen:

D Reczek*, M Schwake*, **J Schröder***, H Hughes, J Blanz, XY Jin, W Brondyk, S Van Patten, T Edmunds, P Saftig (2007) LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-Glucocerebrosidase. **Cell** 131, 770-783. *gleichwertiger Beitrag

M Knipper, C Claussen, L Ruttiger, U Zimmermann, R Lüllmann-Rauch, EL Eskelinen, **J Schröder**, M Schwake, P Saftig (2006) Deafness in LIMP2-deficient mice due to early loss of the potassium channel KCNQ1/KCNE1 in marginal cells of the stria vascularis. **Journal of Physiology** 576, 73-86.

11 Danksagung

Ich bedanke mich von ganzem Herzen bei allen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

- Ich bedanke mich bei Professor Dr. Paul Saftig dafür, dass ich diese Arbeit in seinem Labor anfertigen konnte, dass er sich stets Zeit für wertvolle Diskussionen nahm und dass er mir die Möglichkeit gab, an Kooperationen und Kongressen in der ganzen Welt teilzunehmen.
- Ich bedanke mich beim Böhlinger Ingelheim Fonds, sowohl für die finanzielle, aber vor allem auch die ideelle Förderung meiner Promotion.
- Ich bedanke mich bei Professor Dr. Markus Bleich, Dr. Eeva-Liisa Eskelinen, Dr. Nina Himmerkus, Professor Dr. Renate Lüllmann-Rauch, Professor Dr. Bernhard Nieswandt, Dr. Zane Orinska und Irina Pleines für fruchtbare Diskussionen und ihre Hilfe bei der Durchführung verschiedener Experimente.
- Ich bedanke mich bei Dagmar Niemeier, Katharina Stiebeling, Marlies Rusch, Inez Götting, Katrin Westphal und ganz besonders bei Sebastian Held für ihre technische Unterstützung.
- Ich bedanke mich bei Dr. David Reczek, Dr. Judith Blanz und PD Dr. Michael Schwake für die gute Zusammenarbeit bei der „LIMP-2-Geschichte“.
- Ich bedanke mich bei allen Kollegen/Freunden für die wunderbare Zeit, die ich mit ihnen sowohl im Labor als auch außerhalb verbringen konnte.
- Ich bedanke mich bei meiner Familie, insbesondere bei meinem zu früh verstorbenen Vater Georg, für ihre immerwährende Unterstützung und bei Sven, der während meines gesamten Studiums und meiner Promotion immer für mich da gewesen ist und mir bei allen Problemen hilfreich zur Seite gestanden hat.

12 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich,

- dass ich diese Abhandlung selbständig und nur unter Verwendung der hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt habe,
- dass diese Abhandlung noch nicht an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde,
- dass Teilergebnisse der vorliegenden Abhandlung zur Veröffentlichung eingereicht wurden,
- dass es keine Promotionsversuche in der gleichen Fakultät oder vergleichbaren Fachbereichen gab,
- dass ich für die mündliche Prüfung die Form der Disputation wähle.

Kiel, den 20. Mai 2008

Jenny Schröder