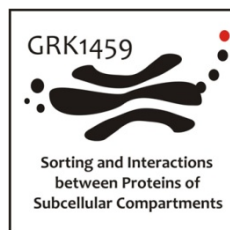


Untersuchungen zur pH-Wert-Abhängigkeit des lysosomalen integralen Membranproteins Typ 2 als Transportrezeptor



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

vorgelegt von
Christina Zachos

Kiel, März 2012

Referent/in: Herr Professor Dr. Paul Saftig

Koreferent/in: Herr Professor Dr. Thomas Röder

Tag der mündlichen Prüfung: 26.04.12

Zum Druck genehmigt: 26.04.12

gez. Professor Dr. Lutz Kipp, Der Dekan

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | 1 |
| Abkürzungsverzeichnis | 6 |
| 1 Einleitung | 11 |
| 1.1 Der sekretorische Weg | 11 |
| 1.1.1 Der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor abhängige Transport..... | 12 |
| 1.1.2 Mannose-6-Phosphat-Rezeptor unabhängige Transportwege | 14 |
| 1.2 Die Rolle des pH-Wertes im sekretorischen Weg | 15 |
| 1.2.1 Die vesikuläre H ⁺ -ATPase | 16 |
| 1.2.1.1 Der (Pro)Renin Rezeptor: Eine akzessorische Untereinheit der V-ATPase mit vielseitigen Funktionen..... | 17 |
| 1.2.2 Mechanismus pH-Wert-abhängiger Proteininteraktionen..... | 22 |
| 1.3 Das Lysosom | 23 |
| 1.3.1 Lysosomale Speichererkrankungen | 24 |
| 1.3.1.1 Morbus Gaucher | 25 |
| 1.3.2 Lysosomale Membranproteine..... | 26 |
| 1.3.2.1 Das lysosomale integrale Membranprotein Typ 2 (LIMP-2)..... | 28 |
| 2 Fragestellung | 34 |
| 3 Material und Methoden | 35 |
| 3.1 Material | 35 |
| 3.1.1 Geräte..... | 35 |
| 3.1.2 Labormaterialien | 36 |
| 3.1.3 Chemikalien, Enzyme, Reagenzien..... | 37 |
| 3.1.4 Verwendete Kits..... | 38 |
| 3.1.5 Oligonukleotide..... | 39 |
| 3.1.6 Vektoren..... | 39 |
| 3.1.7 Plasmide | 43 |
| 3.1.8 Antikörper | 44 |
| 3.1.9 Zelllinien | 46 |
| 3.1.10 Puffer, Lösungen und Nährmedien..... | 47 |
| 3.1.11 Verwendete Computer Software..... | 50 |
| 3.2 Molekularbiologische Methoden | 51 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.2.1 | Polymerase-Kettenreaktion | 51 |
| 3.2.1.1 | Klonierungs-PCR | 51 |
| 3.2.1.2 | Fusions-PCR | 52 |
| 3.2.1.3 | Nested-PCR..... | 54 |
| 3.2.1.4 | <i>Mycoplasmen</i> -PCR | 54 |
| 3.2.2 | Agarosegelelektrophorese | 55 |
| 3.2.3 | Klonierungstechniken..... | 55 |
| 3.2.3.1 | Restriktionsverdau | 55 |
| 3.2.3.2 | Dephosphorylierung..... | 56 |
| 3.2.3.3 | Ligation..... | 56 |
| 3.2.3.4 | Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> | 57 |
| 3.2.3.5 | Transformation elektrokompetenter <i>E. coli</i> mittels Elektroporation..... | 57 |
| 3.2.3.6 | Plasmidamplifikation und –aufreinigung | 58 |
| 3.2.3.7 | Klonierung spezieller LIMP-2-Konstrukte | 58 |
| 3.2.4 | DNA-Konzentrationsbestimmung | 59 |
| 3.2.5 | Sequenzierung..... | 59 |
| 3.3 | Zellbiologische Methoden..... | 60 |
| 3.3.1 | Kultivierung von Zellen..... | 60 |
| 3.3.2 | Kryokonservierung ausgewählter Zelllinien..... | 61 |
| 3.3.3 | Reaktivierung kryokonservierter Zellen..... | 61 |
| 3.3.4 | Ernte Wnt-3a-angereicherter Zellkulturmedien und Wnt-3a-Stimulation..... | 61 |
| 3.3.5 | Transfektion | 62 |
| 3.3.5.1 | Transiente Transfektion | 62 |
| 3.3.5.2 | Retrovirale Transduktion | 62 |
| 3.3.6 | pH-Wert-Veränderungen in lebenden Zellen | 63 |
| 3.3.7 | Inhibition des <i>ERAD (ER associated degradation)</i> -Prozesses durch MG-132..... | 63 |
| 3.4 | Mikroskopische Methoden | 64 |
| 3.4.1 | Zellfixierung und Immunfluoreszenzfärbung intrazellulärer Proteine | 64 |
| 3.4.2 | Das konfokale Laser-Scanning Mikroskop Fluoview 1000 | 64 |
| 3.4.3 | <i>Lysotracker-Red</i> Färbung..... | 65 |
| 3.5 | Proteinbiochemische Methoden | 66 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.5.1 | Biotinylierung von Proteinen an Zelloberflächen | 66 |
| 3.5.2 | Präzipitation biotinylierter Proteine durch Streptavidin | 66 |
| 3.5.3 | Herstellung eines Zelllysats..... | 67 |
| 3.5.4 | Membranpräparation | 67 |
| 3.5.5 | Proteinkonzentrationsbestimmung | 68 |
| 3.5.6 | Deglykosylierung mit N-Glykosidase F und Endoglykosidase H..... | 68 |
| 3.5.7 | Koimmunopräzipitation | 69 |
| 3.5.8 | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) | 69 |
| 3.5.9 | Westernblot | 70 |
| 3.5.9.1 | Strippen von Westernblots | 70 |
| 3.5.9.2 | Densitometrische Analyse von Bandenintensitäten im Westernblot | 71 |
| 3.5.10 | Enzymaktivitätsassay | 71 |
| 3.5.11 | Luciferaseassay | 72 |
| 3.6 | Statistische Analysen | 73 |
| 4 | Ergebnisse | 74 |
| 4.1 | Charakterisierung der pH-Wert-abhängigen Interaktion von LIMP-2 und der β-Glukocerebrosidase | 74 |
| 4.1.1 | Analyse der LIMP-2-/ β -Glukocerebrosidase-Interaktion nach Erhöhung des intralysosomalen pH-Wertes..... | 74 |
| 4.1.1.1 | Koimmunpräzipitation von β -Glukocerebrosidase durch LIMP-2 in Ammoniumchlorid oder Bafilomycin behandelten HeLa-Zellen..... | 76 |
| 4.1.1.2 | Kolokalisationsstudien von LIMP-2 und der β -Glukocerebrosidase in Ammoniumchlorid oder Bafilomycin behandelten HeLa-Zellen..... | 77 |
| 4.1.2 | Untersuchung einer pH-Wert-unabhängigen LIMP-2-Mutante | 79 |
| 4.1.3 | Analyse des klinisch relevanten LIMP-2-Histidin-363-Rests als mögliche pH-sensitive Aminosäure in der LIMP-2-/ β -Glukocerebrosidase-Interaktion..... | 81 |
| 4.1.3.1 | Koimmunpräzipitationsstudien zwischen den LIMP-2-H363-Mutanten und der β -Glukocerebrosidase..... | 81 |
| 4.1.3.2 | Bestimmung der intrazellulären Lokalisation der LIMP-2-H363-Mutanten | 82 |
| 4.1.3.3 | Detaillierte Untersuchung des Einflusses der LIMP-2-H363K-myc-Mutante auf die endogene β -Glukocerebrosidase | 84 |
| 4.1.3.4 | Reduktion der LIMP-2-H363K-myc-/ β -GC-Bindungsintensität durch Mutation der LIMP-2- <i>coiled-coil</i> -Domäne..... | 85 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 4.1.4 | Bestimmung der pH-sensitiven Domäne des LIMP-2-Proteins..... | 87 |
| 4.1.5 | In der LIMP-2-Domäne zur Bindung von β -Glukocerebrosidase befinden sich drei Histidinreste | 89 |
| 4.1.6 | Untersuchung einer in ihrer Bindedomäne putativ pH-insensitiven LIMP-2-Mutante. | 89 |
| 4.1.7 | Analyse des unter Säugetieren hoch konservierten LIMP-2-H171-Rests | 91 |
| 4.1.7.1 | Koimmunpräzipitationsstudien zwischen den LIMP-2-H171-Mutanten und der β -Glukocerebrosidase..... | 92 |
| 4.1.7.2 | Der lysosomale Transport einer klinischen β -Glukocerebrosidase-Mutante durch LIMP-2-H171A und LIMP-2-H171K..... | 93 |
| 4.1.7.3 | Der lysosomale Transport der β -Glukocerebrosidase durch LIMP-2-H171A- und LIMP-2-H171K in LIMP-2-defizienten Zellen | 94 |
| 4.1.7.4 | Enzymaktivität der β -Glukocerebrosidase in LIMP-2-defizienten Zellen nach Expression der LIMP-2-H171-Mutanten | 95 |
| 4.1.7.5 | ER-Retention der β -Glukocerebrosidase nach Expression der LIMP-2-H171-Mutanten in LIMP-2-defizienten Zellen | 99 |
| 4.1.8 | Untersuchung der LIMP-2-Histidinreste 150 und 189 auf ihre pH-sensitive Funktion in der LIMP-2-/ β -Glukocerebrosidase-Interaktion | 101 |
| 4.2 | LIMP-2 und der (Pro)Renin Rezeptor im kanonischen Wnt-/ β-Catenin-Signalweg | 103 |
| 4.2.1 | Die Lokalisation des (Pro)Renin Rezeptors in Wildtyp und LIMP-2-defizienten Zellen. | 104 |
| 4.2.2 | Bestimmung der Oberflächenexpression des (Pro)Renin Rezeptors in Wildtyp und LIMP-2-defizienten Zellen | 105 |
| 4.2.3 | LIMP-2 wird an der Oberfläche von HeLa-Zellen exprimiert | 106 |
| 4.2.4 | Untersuchung des LIMP-2-Einflusses auf den Wnt-/ β -Catenin-Signalweg..... | 107 |
| 4.2.4.1 | LIMP-2-defiziente Zellen akkumulieren nach Wnt-Stimulation vermehrt zytosolisches β -Catenin | 107 |
| 4.2.4.2 | LIMP-2-defiziente Zellen reagieren mit gesteigerter Genexpression auf eine Stimulation mit Wnt | 109 |
| 5 | Diskussion | 111 |
| 5.1 | Die pH-Wert-abhängige Interaktion von LIMP-2 und der β-Glukocerebrosidase.111 | 111 |
| 5.1.1 | Die Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes hat einen verstärkenden Effekt auf die Interaktion von LIMP-2 und der β -Glukocerebrosidase | 111 |
| 5.1.2 | Histidin als entscheidender pH-Wert-regulierender Rest | 112 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 5.1.3 | Der LIMP-2-Histidinrest 363..... | 113 |
| 5.1.3.1 | Die pH-sensitive LIMP-2-/ β -Glukocerebrosidase-Interaktion wird nicht durch den klinisch relevanten LIMP-2-H363-Rest reguliert..... | 113 |
| 5.1.3.2 | Die ER-residente LIMP-2-H363K-myc-Mutante verstärkt die proteasomale Degradation der β -Glukocerebrosidase | 114 |
| 5.1.3.3 | Der Histidinrest 363 ist vermutlich entscheidend für die LIMP-2-Struktur | 114 |
| 5.1.4 | Die pH-sensitive Bindungsdomäne im LIMP-2-Protein liegt zwischen Tryptophan 146 und Tyrosin 222..... | 115 |
| 5.1.5 | Die pH-sensitive Bindungsdomäne im LIMP-2-Protein enthält die strukturell wichtigen Histidinreste H150, H171 und H189..... | 116 |
| 5.1.6 | Der LIMP-2-Histidinrest 171..... | 117 |
| 5.1.6.1 | Die Mutation von Histidin 171 zu Alanin oder Lysin führt zu einer verstärkten Assoziation bzw. Dissoziation der β -Glukocerebrosidase..... | 117 |
| 5.1.6.2 | Beide LIMP-2-H171-Mutanten transportieren β -Glukocerebrosidase in die Lysosomen..... | 119 |
| 5.1.6.3 | Beide LIMP-2-H171-Mutanten stellen die Aktivität der β -Glukocerebrosidase in LIMP-2-defizienten Zellen nur geringfügig wieder her | 120 |
| 5.1.6.4 | Nach Expression der LIMP-2-H171-Mutanten in LIMP-2-defizienten Zellen erreicht die β -Glukocerebrosidase nicht vollständig die Lysosomen..... | 122 |
| 5.2 | LIMP-2, Wnt und der (Pro)Renin Rezeptor..... | 125 |
| 5.2.1 | Das Fehlen von LIMP-2 erhöht das Vorkommen des (Pro)Renin Rezeptors an der Plasmamembran | 126 |
| 5.2.1.1 | LIMP-2 als Rezeptor an der Plasmamembran..... | 126 |
| 5.2.2 | Der Verlust von LIMP-2 steigert die Sensitivität gegenüber Wnt-Stimulation..... | 127 |
| 5.2.3 | LIMP-2-defiziente Zellen exprimieren vermehrt Wnt-Signal abhängige Gene..... | 128 |
| 5.2.4 | Mögliche Konzepte zur regulierenden Funktion von LIMP-2 im Wnt-Signalweg.... | 128 |
| 6 | Zusammenfassung | 132 |
| 7 | Summary | 133 |
| 8 | Literaturverzeichnis | 134 |
| 9 | Lebenslauf | 155 |
| 10 | Danksagung..... | 157 |
| 11 | Eidesstattliche Erklärung..... | 158 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|--|
| ACE | <i>Angiotensin converting enzyme</i> |
| AMRF | <i>Action Myoclonus Renal Failure Syndrom</i> |
| ANG I | Angiotensin I |
| ANG II | Angiotensin II |
| APC | Adenomatous polyposis coli |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| β -GC | β -Glukocerebrosidase |
| bp | Basenpaar |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| BGH p.A. | poly-Adenylierungssignal des bovinen Rinderwachstumshormons (<i>bovine growth hormone</i>) |
| bzw. | beziehungsweise |
| C- | carboxy |
| ca. | circa |
| CtsD | Cathepsin D |
| cDNA | <i>complementary DNA</i> |
| CMV | Cytomegalie-Virus |
| D | Deutschland |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid |
| DABCO | Diazobicyclooctan |
| ddH ₂ O | deionisiertes Wasser |
| dE | Differenz der gemessenen Extinktionswerte |
| d. h. | das heißt |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure) |
| dNTPs | Desoxynukleotidtriphosphate |
| DSHB | <i>Developmental Studies Hybridoma Bank</i> |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| DTT | Dithiothreitol |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| eGFP | <i>enhanced Green Fluorescent Protein</i> |
| Endo H | Endoglykosidase H |
| ER | Endoplasmatisches Reticulum |
| ERAD | <i>ER-Associated Degradation</i> |
| ERGIC | <i>ER-Golgi intermediate compartment</i> |
| ERGIC-53 | <i>ER-Golgi intermediate compartment 53 kDa protein</i> |
| ERK 1/2 | <i>Extracellular signal-regulated kinases 1 und 2</i> |
| ERT | <i>Enzyme Replacement Therapie</i> |
| EV 71 | Enterovirus 71 |
| FastAP | <i>fast alkaline phosphatase</i> |
| FCS | <i>Fetal Calf Serum</i> (fötales Kälberserum) |
| FD | Farad (physikalisches Maß der Kapazität) |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FOP | <i>Far-from-optimal Tcf-binding</i> |
| GGAs | <i>Golgi-localized, γ-ear containing, ARF-binding proteins</i> |
| GlcNAc | Glukose-N-Acetyl (-Rest) |
| GSK3 | Glykogen Synthase Kinase 3 |
| H | <i>human</i> |
| HRP | <i>Horse-Radish-Peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase) |
| HSV-TK | <i>Herpes simplex Virus Thymidin Kinase</i> |
| Ig | Immunglobulin |
| IP | Immunopräzipitation |
| kb | Kilobasenpaar |
| kDa | Kilodalton (Masseneinheit von Proteinen) |
| KDEL | Lysin-Aspartat-Glutamat-Leucin (ER-Retentionsmotiv) |
| KO | <i>knockout</i> |
| kV | Kilovolt |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------|---|
| l | Liter |
| L2T2 | LIMP-2-Tier-2 (Antikörper) |
| LAMP | <i>Lysosome-Associated Membrane Protein</i> (lysosomal assoziiertes Membranprotein) |
| LB | Luria Broth |
| LGP85 | <i>Lysosomal GlycoProtein of 85 kDa</i> |
| LIMP | <i>Lysosomal Integral Membrane Protein</i> (lysosomales integrales Membranprotein) |
| LRP6 | <i>Low-density lipoprotein receptor-related protein 6</i> |
| LTR | <i>Long term repeat</i> |
| m | murin |
| M | molar, Mol/Liter |
| MF | Membranfraktion |
| µm | Mikrometer |
| mM | millimolar |
| µM | mikromolar |
| mA | Milliampere (Stromeinheit) |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinase |
| MCS | <i>Multiple Cloning Site</i> |
| MEF | Murine embryonale Fibroblasten |
| mg | Milligramm |
| µg | Mirkogramm |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| µl | Mikroliter |
| M6P | Mannose-6-Phosphat (-Rest) |
| M6PR | Mannose-6-Phosphatrezeptor |
| mRNA | <i>messenger RNA</i> |
| NF | Nukleäre Fraktion |
| ng | Nanogramm |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|---|
| nm | Nanometer |
| Ω | Ohm (physikalische Größe des Widerstands) |
| p.a. | <i>per analysis</i> |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> (phosphatgepufferte Kochsalzlösung) |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion) |
| PenStrep | 100U/ml Penicillin und 0,1mg/ml Streptomycin |
| PFA | Paraformaldehyd |
| <i>pfu</i> | <i>Pyrococcus furiosus</i> |
| pH | <i>pondus Hydrogenii</i> („Wasserstoffgewicht“) entspricht dem negativen dekadischen Logarithmus der H ⁺ -Konzentration |
| PNGase F | N-Glykosidase F |
| PRR | (Pro)Renin Rezeptor |
| RAS | Renin Angiotensin System |
| RNA | <i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure) |
| rpm | <i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute) |
| RT | <i>Room Temperature</i> (Zimmertemperatur) |
| SDS | Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat) |
| sek | Sekunde |
| SF | Lösliche Fraktion |
| siRNA | <i>small interfering RNA</i> |
| SRT | Substrat-Reduktions-Therapie |
| Std | Stunde |
| SV | Simian Virus |
| <i>taq</i> | <i>Thermophilus aquaticus</i> |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA (-Puffer) |
| TBS(T) | Tris Buffered Saline (Tris-gepufferte Kochsalzlösung) (+ 0,1% Tween-20) |
| TCA | Trichloroacetic acid (Trichloressigsäure) |
| TCF/LEF | <i>Transcription factor/ lymphoid enhancer-binding factor</i> |
| Temed | N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|---|
| TfR | Transferrin Rezeptor |
| TGN | <i>trans</i> -Golgi-Netzwerk |
| TL | Totallysat |
| TOP | <i>optimal Tcf-binding site</i> |
| u. a. | unter anderem |
| UK | <i>United Kingdom</i> (Großbritannien) |
| USA | <i>United States of America</i> |
| ∞ | unendlich |
| U | <i>Unit</i> (Einheit der enzymatischen Aktivität) |
| UV | ultraviolett |
| V | Volt (Spannungseinheit) |
| V-ATPase | vesikuläre H ⁺ -ATPase |
| WB | Westernblot |
| WT | Wildtyp |
| x | -fach |
| z. B. | zum Beispiel |

1 Einleitung

Die vor etwa 3,4 Mrd. Jahren entstandene und bis heute weiterentwickelte Zelle ist die kleinste uns bekannte Einheit des Lebens (Altermann & Kazmierczak, 2003). Während sich die zellkernlosen Prokaryoten nie über das Einzellstadium hinaus entwickelt haben, waren die Eukaryoten durch sukzessive Spezialisierung in der Lage, vielzellige Organismen zu bilden, die die heutige Vielfalt wesentlich gestalten. Unabhängig von Spezialisierung und Entwicklung ist jedoch allen eukaryotischen Zellen ein einheitlicher Grundbauplan gemein: Alle umgibt eine abgrenzende Plasmamembran, die verschiedene, meist ebenfalls membranumschlossene Räume umschließt. Diese sogenannten Kompartimente bilden den sekretorischen Apparat einerseits und die für Energiehaushalt sowie Sauerstoffentgiftung benötigten Mitochondrien und Peroxisomen andererseits (Alberts et al, 2007).

1.1 Der sekretorische Weg

Die aus dem Kern entlassene mRNA wird entweder direkt an den Ribosomen des Zytoplasmas oder, sofern für den sekretorischen Weg bestimmt, an den Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums (ER) translatiert. Sekretorische Proteine sind mit einem Signalpeptid ausgestattet, das von einem zytoplasmatischen Signalerkennungskomplex, dem *signal recognition particle* (SRP), erkannt wird (Blobel & Sabatini, 1971). Dieser, aus einer doppelsträngigen 7S RNA und 6-7 weiteren Proteinen bestehende Komplex, bindet bereits das naszierende Peptid und leitet es zu dem SRP-Rezeptor in der Membran des ERs weiter (Pool, 2005; Walter & Blobel, 1981; Walter et al, 1981).

Der SRP-Rezeptor bindet mit seinem stark geladenen zytoplasmatischen Bereich in erster Linie den Nukleinsäureanteil des Signalerkennungskomplexes (Lauffer et al, 1985). Das weiterhin im Entstehungsprozess befindliche Protein wird dann zu einem ER-Translokationskanal geleitet und fortan in das Lumen des ERs translatiert (Rapoport, 1986). In der Regel wird das Signalpeptid nach Beendigung der Translation durch eine Signalpeptidase entfernt, und lösliche Proteine werden ins ER-Lumen entlassen. Handelt es sich jedoch um ein Membranprotein, so kann das Signalpeptid als Transmembrandomäne erhalten bleiben. Je nach Orientierung seiner Termini und der Anzahl an Transmembrandomänen ergibt sich eine Einteilung in Typ 1-3 Transmembranproteine. Ist nur eine Transmembrandomäne vorhanden und der C-Terminus im Zytosol, so spricht man von Typ 1 und bei entgegengesetzter Topolo-

gie von Typ 2 Transmembranproteinen. Typ 3 Transmembranproteine durchspannen die Membran hingegen mehrfach (Alberts et al, 2007; Chou & Elrod, 1999).

Ob in der Membran oder löslich, alle sekretorischen Proteine werden im ER, sofern glykosyliert, zunächst mit mannosereichen Standardzuckerresten versehen und dann mittels COP-II Vesikeln zum *cis*-Golgiapparat (*cis*-Golgi) transportiert. Irrtümlich transportierte ER-Proteine, die ein KDEL (Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin) –Motiv aufweisen, werden im *cis*-Golgi vom KDEL-Rezeptor erkannt, in COP-I Vesikel verpackt und zurück zum ER transportiert (Aridor et al, 1995; Munro & Pelham, 1987; Rothman et al, 1978; Schweizer et al, 1990). Fehlgefaltete Proteine hingegen verlassen in der Regel nicht das ER, da sie von Chaperonen der *ERAD* (*ER Associated Protein Degradation*) -Maschinerie erkannt und dem Proteasom zugeführt werden (Hammond & Helenius, 1995; Meusser et al, 2005).

Lösliche Proteine, die sowohl glykosyliert als auch richtig gefaltet sind, übernehmen entweder direkt im Golgiapparat Aufgaben oder passieren dessen einzelne Zisternen, um zu ihrem Bestimmungsort sortiert zu werden. An ihren asparaginverlinkten Zuckerresten finden bereits im frühen Golgiapparat Modifikationen zu komplexeren Zuckerstrukturen statt. Es können jedoch auch ganz neue O-Glykosylierungen an Serin- sowie Threoninresten geknüpft werden (Schachter, 1974).

Nicht speziell für die Lysosomen markierte Proteine werden im *trans*-Golgiapparat in sekretorische Vesikel verpackt und je nach Zelle entweder konstitutiv oder signalabhängig ins umgebende Medium sezerniert oder, wenn es sich um ein Membranprotein handelt, an die Plasmamembran transportiert (Kraehenbuhl et al, 1977). Handelt es sich bei den Proteinen um lysosomale Hydrolasen, so werden sie in der Regel Mannose-6-Phosphat-abhängig zu den Lysosomen transportiert (Dahms et al, 1989).

1.1.1 Der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor abhängige Transport

Bei dem Mannose-6-Phosphat-abhängigen Transport muss eine lysosomale Hydrolase an ihren terminalen Mannoseresten phosphoryliert werden. Dies geschieht im *cis*-Golgi durch das Enzym N-Acetylglukosamin (GlcNAc)-Phosphotransferase, welches drei räumlich voneinander getrennte Lysinreste im zu markierenden Protein erkennt und mit Phosphat gekoppelte N-Acetylglukosamine auf endständige Mannosereste überträgt (Reitman & Kornfeld, 1981; Tikkanen et al, 1997). Anschließend wird das N-Acetylglukosamin durch das Enzym N-Acetylglukosamin-1-phosphodiester-alpha-N-Acetylglukosaminidase mittels Hydrolyse ent-

fernt (Kornfeld et al, 1999; Varki & Kornfeld, 1980). Die nun freiliegenden Mannose-6-Phosphat-Gruppen der lysosomalen Enzyme werden im *trans*-Golgiapparat durch Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (M6PR) erkannt, was die Grundvoraussetzung für eine lysosomale Zielsteuerung darstellt (Sly, 1985).

M6PRs sind Typ 1 Transmembranproteine, deren zytosolischer Teil ein Dileucinmotiv vom [DXXLL] Typ aufweist, das seinerseits von den Komponenten des Clathrinhüllkomplexes erkannt wird (Brulke & Bonifacino, 2009; Campbell et al, 1983). Im Fall der M6PRs besteht ein solcher Hüllkomplex aus GGAs (*Golgi-localising, Gamma-adaptin ear domain homology, ARF-binding proteins*), dem Adaptorprotein AP1 und Clathrin (Le Borgne et al, 1996; Puertollano et al, 2001). Nach der dynaminabhängigen Abschnürung des Clathrinvesikels (Schmid et al, 1998) verschmilzt dieser unter Verlust der Hülle mit den Endosomen.

In späten Endosomen, bei einem pH Wert unterhalb von 6,0, dissoziieren die Hydrolasen vom M6P-Rezeptor, und ihre Phosphatreste werden durch lysosomale saure Phosphatasen entfernt (Alberts et al, 2007; Gonzalez-Noriega et al, 1980; Kornfeld & Mellman, 1989; Makrypidi et al, 2011). Während der Rezeptor zurück zum *trans*-Golgiapparat transportiert wird (Brown et al, 1984; Brown et al, 1986), gelangen die Hydrolasen durch spätendosomale/-lysosomale Verschmelzung an ihren Zielort (Futter et al, 1996); Abbildung 1.1).

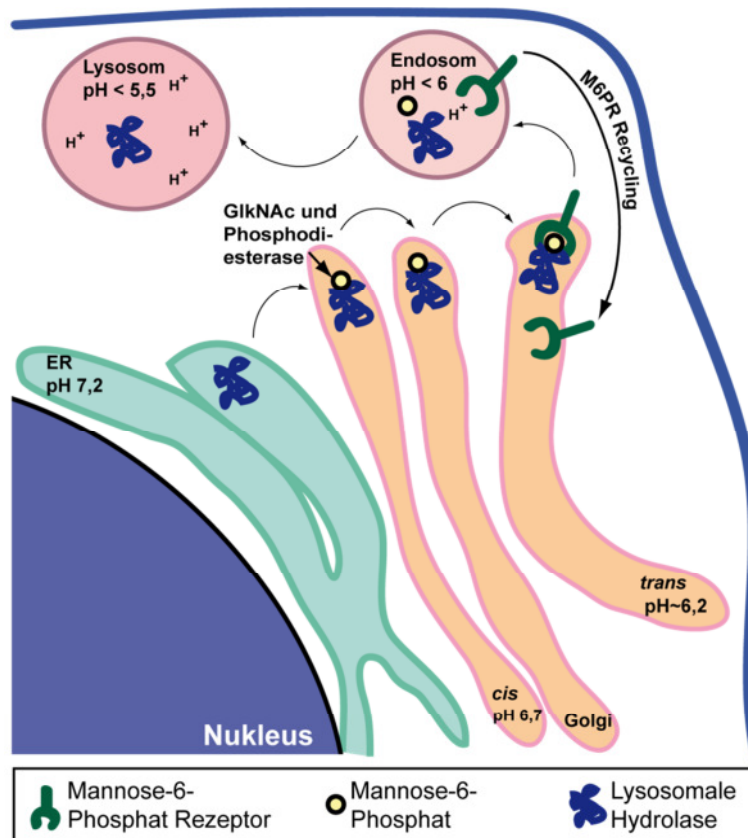


Abbildung 1.1: Der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor abhängige Transport lysosomaler Hydrolasen. Im *cis*-Golgi findet die Übertragung von endständigen Mannose-6-Phosphat Zuckern auf die Hydrolyase durch das Enzym Glukose-N-Acetyl-Phosphotransferase statt (Tikkanen et al, 1997). Im *trans*-Golgi bindet die Hydrolyase an den, den M6P-Rest erkennenden, Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (Sly, 1985). In den Endosomen erfolgt auf Grund des niedrigeren pH-Wertes die Dissoziation von Hydrolyase und Rezeptor. Außerdem wird der Mannoserest wieder dephosphoryliert. Der M6P-Rezeptor wird zum *trans*-Golgi zurücktransportiert, um hier wiederverwendet zu werden (Brown et al, 1986). GlkNAc = Glukose-N-Acetyl Phosphotransferase.

1.1.2 Mannose-6-Phosphat-Rezeptor unabhängige Transportwege

Untersuchungen an Patienten und deren Zellen mit Mukopolidosis Typ II (I-Zell Krankheit) ergaben, dass ein Defekt in der (GlkNAc)-Phosphotransferase für die Fehlsortierung der meisten lysosomalen Hydrolasen verantwortlich gemacht werden kann (Varki et al, 1982). Jedoch werden nicht alle lysosomalen Proteine Mannose-6-Phosphat-abhängig transportiert (Dittmer et al, 1999).

Neben der LIMP-2-abhängig transportierten Hydrolyase β -Glukocerebrosidase (Reczek et al, 2007) werden die lysosomalen Proteine Prosaposin (Lefrancois et al, 2003), Sphingomyelinase (Ni & Morales, 2006) und Cathepsin H Sortilin-abhängig transportiert. Cathepsin D ist eine weitere lysosomale Protease, die zumindest organspezifisch M6PR-unabhängig trans-

portiert wird und als Interaktionspartner von Sortilin identifiziert werden konnte (Canuel et al, 2008; Rijnboutt et al, 1991).

Bei Sortilin handelt es sich, wie beim M6P-Rezeptor, um ein Typ 1 Transmembranprotein des *trans*-Golgiapparates, das über ein Dileucinmotiv des Typs [DXXLL] von den Komponenten des Clathrinhüllkomplexes erkannt wird (Ni & Morales, 2006; Petersen et al, 1997). Der Sortilinligand Prosaposin ist ein Sphingolipidaktivatorprotein, das einerseits als Ganzes sekretiert werden kann oder unter anderem durch Cathepsin D in vier autonom agierende Proteine, die Saposine A-D, gespalten wird (Hiraiwa et al, 1997; Hiraiwa et al, 1993; O'Brien & Kishimoto, 1991). Die Saposine unterstützen lysosomale Hydrolasen wie β -Galaktocerebrosidase (Saposin A), β -Glukocerebrosidase (Saposin A und C), Arylsulfatase A (Saposin B), die α -Galaktosidase (Saposin B) sowie die Sphingomyelinase (Saposin D) in ihrer Aktivität. Zum Beispiel helfen sie den Enzymen, indem sie Substratlipide aus der Membran lösen oder stabilisierende Funktionen übernehmen (Morimoto et al, 1988; Morimoto et al, 1989; Sandhoff et al, 1992; Sun et al, 2003). Im Fall von β -Glukocerebrosidase und Saposin C findet eine direkte Interaktion beider Proteine statt, die eine über 30-fache Steigerung der Enzymaktivität zur Folge haben kann (Berent & Radin, 1981; Morimoto et al, 1990). Die Bedeutung dieser allosterischen Aktivierung wird besonders deutlich, wenn Saposin C durch Mutationen nicht mehr funktionsfähig ist und als Folge davon Morbus Gaucher ähnliche Erkrankungen entstehen (Schnabel et al, 1991; Tylki-Szymanska et al, 2007).

Lysosomale Membranproteine brauchen in der Regel weder Mannose-6-Phosphat-Markierungen noch einen Transporter, um an ihren Zielort zu gelangen. Wie die Transporter M6PR, Sortilin und LIMP-2 sind lysosomale Membranproteine mit Dileucinmotiven des DXXLL bzw. [DE]XXXL[LI] Typs oder aber tyrosinbasierten Motiven des YXX \emptyset Typs ausgestattet (Braulke & Bonifacino, 2009).

1.2 Die Rolle des pH-Wertes im sekretorischen Weg

Im Zuge des sekretorischen Weges verändert sich der pH-Wert von etwa 7,2 im ER über pH 6,7 im *cis*-Golgi und knapp oberhalb von pH 6,0 im *trans*-Golgiapparat, bis hin zu einem endosomalen pH-Wert unterhalb von 6,0. In den Lysosomen herrschen, mit weniger als pH 5,5, noch saurere Bedingungen (Anderson & Pathak, 1985; Kim et al, 1998; Murphy et al, 1984; Ohkuma & Poole, 1978; Paroutis et al, 2004).

Diese Unterschiede im pH-Wert gewährleisten unter anderem den Selbstschutz der Zelle, sich nicht selbst zu verdauen, denn lysosomale Enzyme erreichen in der Regel erst ab einem pH-Wert unterhalb von 5,5 ihr Aktivitätsmaximum. Außerhalb später Endosomen und Lysosomen kommt es somit nicht zu ungewollten Abbauprozessen (Bond & Butler, 1987). Neben der Enzymaktivität kann auch die Dissoziation der Hydrolasen von ihren Transportrezeptoren durch den pH-Wert reguliert werden (Gonzalez-Noriega et al, 1980; Reczek et al, 2007; Yuan & Morales, 2010). Für Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren konnte außerdem gezeigt werden, dass die Abgabe gebundener Hydrolasen bei niedrigem pH-Wert die Wiederverwertung der Rezeptoren ermöglicht. Denn nur freie Rezeptoren gelangen zurück zum *trans*-Golgi, wo sie neusynthetisierte Hydrolasen binden können (Brown et al, 1986; Gonzalez-Noriega et al, 1980).

1.2.1 Die vesikuläre H⁺-ATPase

Die stetige Ansäuerung der Vesikel des sekretorischen Weges erfolgt durch die vesikuläre H⁺-ATPase (V-ATPase). Diese pumpt unter ATP-Verbrauch H⁺-Ionen durch die Membran in das Lumen von Lysosomen oder ganz aus der Zelle hinaus (Brown et al, 1987; Mego et al, 1972). Als Protonenpumpe fungiert sie weiterhin in Clathrin-umhüllten Vesikeln, synaptischen und sekretorischen Vesikeln, in Vesikeln des Golgiapparates und in den Endosomen (Stevens & Forgac, 1997). Je nach Organell enthält die protonentranslozierende α -Untereinheit der vesikulären H⁺-ATPase unterschiedliche Isoformen, die sich in der Protonenbindung und deren Transport unterscheiden. So wird unter anderem der Säuregrad reguliert (Kawasaki-Nishi et al, 2001). In spezialisierten Epithelien, wie den Sammelrohrzellen der Niere, ist die vesikuläre H⁺-ATPase auch in nicht-Clathrin-umhüllten Vesikeln zu finden, die sich zum Transport von Membrankomponenten von der Plasmamembran abschnüren oder mit ihr verschmelzen (Brown et al, 1987; Brown & Orci, 1986). Außerdem erfüllt sie als Plasmamembrankomponente dieser Sammelrohrzellen oder auch in der Plasmamembran von Osteoklasten Aufgaben wie Harnansäuerung oder Knochenresorption (Al-Awqati, 1996; Schlesinger et al, 1997).

Zusammengesetzt wird die vesikuläre H⁺-ATPase aus den zwei Einheiten: V1 und V_o (o steht für Oligomycin, da sich ATPasen durch Oligomycin inhibieren lassen (Somlo et al, 1974)). V1 und V_o setzen sich wiederum aus bis zu 14 Proteinuntereinheiten zusammen. Die zytosolische V1-Domäne ist eine 500-600 kDa große, katalytische Einheit, die für die ATP-

Hydrolyse verantwortlich ist (Arai et al, 1988; Bowman et al, 2000; Stevens & Forgac, 1997). Die kleinere 250 kDa große transmembrane Vo-Domäne dient hingegen zum kontinuierlichen Transport der Protonen durch die Membran (Abbildung 1.2). Pro ATP-Molekül werden 2 H⁺-Ionen entgegen ihres Konzentrationsgefälles durch die Membran in die Lysosomen transportiert (Schneider, 1981; Tomashek & Brusilow, 2000).

Gezielt inhibieren lässt sich der Protonentransport unter anderem mit Bafilomycin-A1 oder Concanamycin (Bowman et al, 1988; Huss et al, 2002; Huss et al, 2005). Die bekannten Untereinheiten des ATPase-Komplexes konnten 1998 noch um eine akzessorische Untereinheit ergänzt werden (Ludwig et al, 1998). Bei dem zunächst als M8-9 benannten Protein handelt es sich um ein 8-9 kDa großes C-terminales Fragment des (Pro)Renin Rezeptors (Advani et al, 2009; L'Huillier et al, 2006).

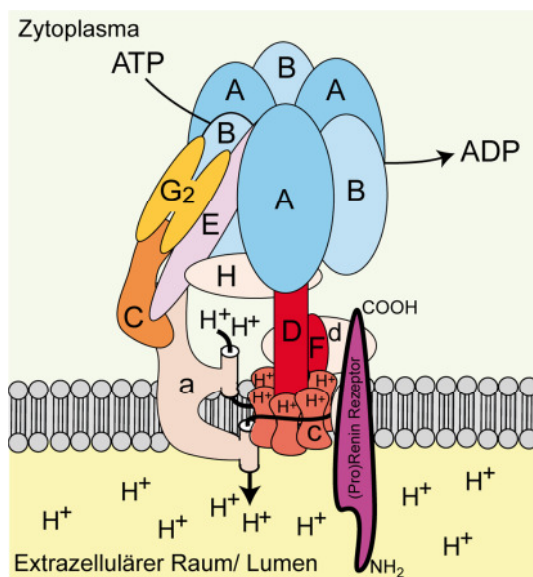


Abbildung 1.2: Modell der vesikulären H⁺-ATPase und seiner akzessorischen Untereinheit, dem (Pro)Renin Rezeptor. Die Untereinheiten der V1-Domäne sind in Großbuchstaben, die der Vo-Untereinheiten in Kleinbuchstaben gekennzeichnet. Pro ATP-Hydrolyse werden innerhalb der a-Untereinheit 2 H⁺-Ionen durch Protonierung eines Argininrests, mit Hilfe eines Rotationsmechanismus der c-Untereinheit, entgegen ihres Gradienten durch die Membran transportiert. Der (Pro)Renin Rezeptor, ein Typ 1 Transmembranprotein, erfüllt eine stabilisierende Funktion. (Modifiziert nach Beyenbach et al. 2005 und Kinouchi et al. 2010).

1.2.1.1 Der (Pro)Renin Rezeptor: Eine akzessorische Untereinheit der V-ATPase mit vielseitigen Funktionen

Der (Pro)Renin Rezeptor (PRR) ist ein Typ 1 Transmembranprotein von 37 kDa Größe. Neben seiner Funktion als akzessorische Untereinheit der vesikuläre H⁺-ATPase übernimmt er an der Plasmamembran auch die Bindung von (Pro)Renin (Nguyen & Danser, 2008; Nguyen et al, 2002). Hohe mRNA Spiegel sind in Herz, Hirn und Plazenta zu finden, aber auch in Niere und Leber wird der (Pro)Renin Rezeptor, wenn auch geringfügiger, transkribiert (Nguyen &

Danser, 2008; Nguyen et al, 1996). In Immunfluoreszenz-, *in situ* Hybridisierungs- und immunhistochemischen Untersuchungen, ist der exprimierte Rezeptor bisher nur in Nierenzellen und im Gehirn nachgewiesen worden (Nguyen, 2006; Nguyen et al, 2002; Shan et al, 2008). Jedoch konnte die Generierung einer konditional (Pro)Renin Rezeptor-defizienten Maus beweisen, dass er auch in Herzmuskelzellen eine essentielle Funktion als Stabilisator der V-ATPase übernimmt (Kinouchi et al, 2010).

Der (Pro)Renin Rezeptor Ligand Renin wird ausschließlich von den juxtaglomerulären Zellen der Niere sekretiert und zirkuliert nur geringfügig im Blut (Fröhlich & Re, 2006). Dagegen ist der Serumanteil von Prorenin um den Faktor zehn höher (Danser et al, 1998; Derkx et al, 1983; Derkx et al, 1976; Krop & Danser, 2008). Die Ursache ist unter anderem darin begründet, dass Prorenin nicht nur von Nierenzellen, sondern auch von Zellen der Nebenniere und der Reproduktionsorgane sekretiert werden kann (Ho & Vinson, 1998; Rubattu et al, 1991; Szilagy et al, 1995).

Renin-Angiotensin-System

Durch die (Pro)Reninbindung an den (Pro)Renin Rezeptor wird eine Konformationsänderung des (Pro)Renins veranlasst, die zur Freilegung der katalytischen Einheit des Renins führt (Suzuki et al, 2003). So kann Renin auch außerhalb der Niere seine Rolle als Angiotensinogen spaltendes Enzym einnehmen (Nguyen et al, 2002). Die durch Renin veranlasste Angiotensinogenspaltung zu Angiotensin-I ist der Initialschritt des Renin-Angiotensin-Systems (Schaffenburg et al, 1960); Abbildung 1.3). Angiotensin-I wird seinerseits durch das *angiotensin converting enzyme* (ACE) zu Angiotensin-II prozessiert. Die Bindung von Angiotensin-II an den Angiotensin-II-Typ1-Rezeptor ist ausschlaggebend für Blutdrucksteigerung und Erhöhung des intraglomerulären Drucks (Fröhlich & Re, 2006). Hypertonie, Nierenerkrankungen und Diabetes können durch dauerhafte (Pro)Renin- oder (Pro)Renin Rezeptor-Überexpression folgen (Ichihara et al, 2004; Ichihara et al, 2006a; Ichihara et al, 2006b; Wilson & Luetscher, 1990).

Mitogen aktiviertes Proteinkinasesystem (ERK1/2)

Unabhängig vom Renin-Angiotensin-System, aber abhängig von (Pro)Renin, seinem Rezeptor, und der vesikulären H⁺-ATPase ist scheinbar die Phosphorylierung der extrazellulär regulierten Kinasen 1 und 2 (ERK 1 und 2) des mitogen aktivierten Proteinkinase- (MAPK)-Systems. Ein System, das in renalen Mesangiumzellen, vaskulären Muskelzellen der Niere,

Interessanterweise ergaben Untersuchungen an *Madin-Darby canine kidney* (MDCK) Zellen, dass sowohl der Einsatz von siRNA gegen den (Pro)Renin Rezeptor als auch eine gezielte Inhibition der V-ATPase mittels Bafilomycin-A1 die ERK1/2-Phosphorylierung zumindest reduzieren konnte (Advani et al, 2009). Da jedoch alle (Pro)Renin Rezeptor-/ ERK1/2-Ergebnisse nur unter unnatürlich hohen Prorenin-Applikationen im Tiermodell gewonnen werden konnten, ist die physiologische Relevanz dieses (Pro)Renin Rezeptor aktivierten MAP Kinase Signalweges noch strittig (Sihn et al, 2010).

Vesikuläre Azidifizierung und Wnt-Signalweg

Für eine essentielle Funktion des (Pro)Renin Rezeptors als akzessorische Untereinheit der vakuolären H⁺-ATPase spricht seine 70-90 %ige Sequenzhomologie unter Vertebraten. Auch die M8-9-Sequenzen von Wirbellosen, wie *Drosophila* und *C. elegans*, zeigen immerhin eine 20-27 %ige Ähnlichkeit zu ihren Homologen in Zebrafisch, Maus und Mensch (L'Huillier et al, 2006; Ludwig et al, 1998). Ohne die akzessorische (Pro)Renin Rezeptoreinheit wird die Expression der Vo-Untereinheiten der V-ATPase unterdrückt, und es findet auf Dauer keine Vesikelazidifizierung mehr statt. In konditional V-ATPase-defizienten Mäusen, in denen der (Pro)Renin Rezeptor in Kardiomyozyten oder Podozyten ausgeschaltet wurde, führt dieser sukzessive Verlust innerhalb weniger Wochen zum Tod (Kinouchi et al, 2010; Oshima et al, 2011).

Im Menschen gibt es bisher nur eine beschriebene Mutation des X-chromosomal vererbten (Pro)Renin Rezeptors. Es handelt sich dabei um eine *Splicesite* Mutante mit fehlendem Exon 4, die bei Männern nicht durch die Expression des nicht mutierten (Pro)Renin Rezeptors ausgeglichen werden kann. Mentale Retardierung und Epilepsie sind die Folge (Ramser et al, 2005).

Neben den in den folgenden Abschnitten beschriebenen Transport-, Interaktions- und Abbauprozessen hängen auch Signaltransduktionsprozesse wie der Notch- und der Wnt-Signalweg von der pH-Wert-Regulation durch die vesikuläre H⁺-ATPase ab (Cruciat et al, 2010; Yan et al, 2009). Im Fall des Wnt-Signalwegs bildet die V-ATPase mit dem (Pro)Renin Rezeptor eine Verbindung zum Wnt-Signal bindenden LRP6/Frizzled Rezeptorkomplex an der Plasmamembran (Cruciat et al, 2010); Abbildung 1.4).

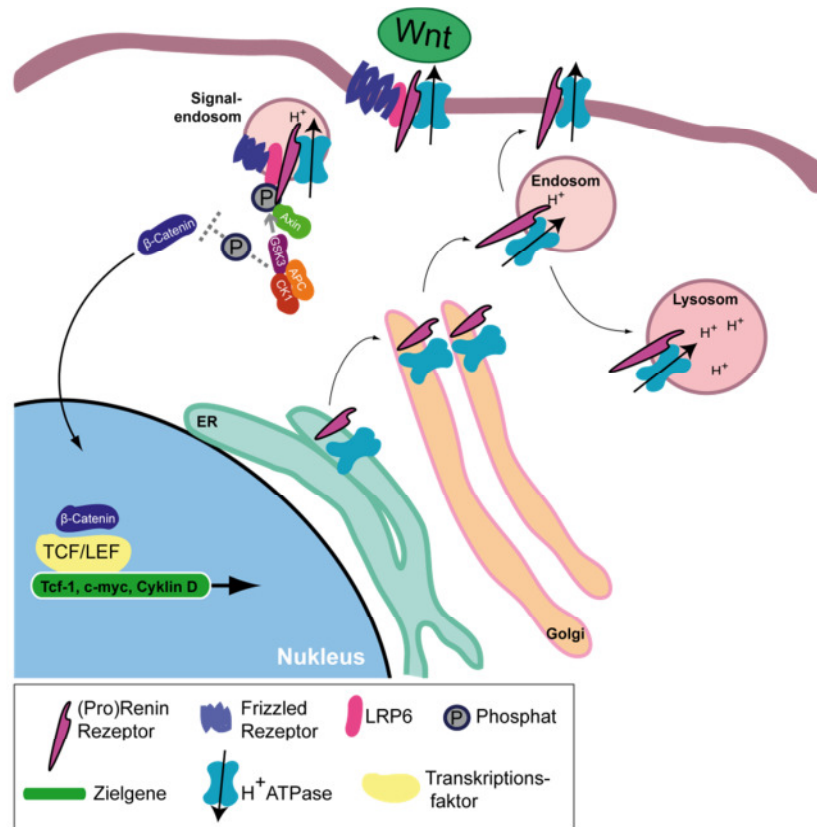


Abbildung 1.4: Der (Pro)Renin Rezeptor im Wnt/ β-Catenin-Signalweg. Als Rezeptor für Wnt-Signalproteine vereinigen sich die V-ATPase, der (Pro)Renin Rezeptor, LRP6 (*Low-density lipoprotein receptor-related protein 6*) und der Frizzled Rezeptor als Komplex in der Plasmamembran. Auf Wnt-Bindung folgt die Einschnürung von Rezeptorkomplex enthaltenden Signalendosomen. Das Signalendosom zieht Axin und intrazelluläre Kinasen wie GSK-3 aus dem Zytosol ab, damit LRP6 phosphoryliert werden kann. So wird die fortlaufende β-Catenin-Phosphorylierung durch den APC-Komplex unterbunden. Das nicht mehr zum Abbau markierte und damit stabilisierte β-Catenin wandert in den Zellkern und wirkt, gebunden an den Transkriptionsfaktor TCF/LEF, als Positivregulator in der Expression von Zellproliferationsgenen (Modifiziert nach Sinh et al.2010).

Ein an den Rezeptorkomplex bindendes Wnt-Protein induziert zunächst die Rekrutierung des Vernetzungsproteins Dishevelled zum Frizzled-Rezeptor (Bilic et al, 2007; Chen et al, 2003; Cong et al, 2004). Daraufhin bilden sich LRP6/Frizzled-Aggregate, die in Caveolin ummantelten Signalendosomen endozytiert werden (Yamamoto et al, 2006). Das aggregierte LRP6 rekrutiert Axin und Glykogensynthase Kinase 3 (GSK-3), die sich normalerweise in einem zytosolischen β-Catenin-Degradationskomplex (APC-Komplex) befinden (Nakamura et al, 1998). Zusammen mit der ebenfalls rekrutierten Casein Kinase 1 (CK-1 γ) phosphoryliert GSK-3 das aggregierte LRP6 und nicht mehr β-Catenin (Zeng et al, 2005). Stabilisiertes β-Catenin kann daraufhin Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF- (*T-cell factor /lymphoid enhancer factor*) Familie binden und in den Zellkern translozieren. Hier wird die Transkrip-

tion von Entwicklungs- und Zellproliferationsgenen wie Transkriptionsfaktor 1 (Tcf-1), c-myc oder Cyclin D1 angeschaltet (Huber et al, 1996; Molenaar et al, 1996; Shtutman et al, 1999). Sowohl die Inhibition der vesikulären H^+ -ATPase mit Bafilomycin-A1 als auch die Herunterregulation des (Pro)Renin Rezeptors mit siRNA führen auf Grund der fehlenden Azidifizierung der Signalendosomen zu einem frühen Abbruch der Wnt-Signaltransduktion (Cruciat et al, 2010).

1.2.2 Mechanismus pH-Wert-abhängiger Proteininteraktionen

Während eine Inhibition der vesikulären H^+ -ATPase einen Abbruch des Wnt-Signalweges zur Folge hat und dadurch Entwicklungsprozesse im frühen Embryo gestört werden können (Cruciat et al, 2010), führen pH-Wertveränderungen auf Proteinebene meist zu Konformationsänderungen oder Ladungsverschiebungen. Im Fall des Mannose-6-Phosphat-abhängigen Enzymtransports wurde schon früh eine pH-regulierte Konformationsänderung für die Rezeptor-Liganden-Dissoziation vermutet (Mellman et al, 1986). Eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte diese Vermutung jedoch nicht bestätigen: So zeigen bei pH 4,8, 6,5 und 7,4 gebildete Kokristalle aus Mannose-6-Phosphat-Rezeptor und dem stark rezeptoraffinen, terminal phosphorylierten Trisaccharid (P-Man(α 1,2)Man(α 1,2)Man-O-(CH₂)₈COOMe) keine strukturellen Unterschiede. Allerdings verursachen ein Glutaminsäure- und ein Histidinrest in der Mannose-6-Phosphat-Bidungsregion des M6P-Rezeptors die Ligandendissoziation, da die pH-Wert-abhängigen Ladungseigenschaften beider Aminosäuren ihre Interaktionspartner je nach umgebendem pH-Wert anziehen oder abstoßen (Olson et al, 2008).

Histidin ist eine basische Aminosäure, die als Rest in einem Protein einen pKs-Wert von 6,0 aufweist. Das hat zur Folge, dass der Imidazolring des Histidins unter neutralen Bedingungen ungeladen und unter sauren Bedingungen unterhalb von pH 6,0 geladen vorliegt (Abbildung 1.5). Diese Eigenschaften machen Histidin als einen pH-sensitiven Rest in Proteininteraktionen innerhalb des sekretorischen Weges sehr wahrscheinlich.

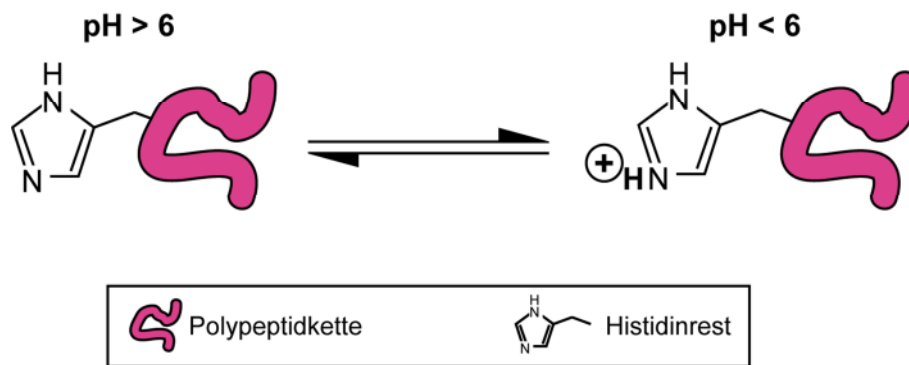


Abbildung 1.5: pH-Wert-abhängige Eigenschaften des Histidinrests. Eingebunden in eine Peptidbindung hat Histidin einen pKs-Wert von 6,0. Oberhalb eines pH-Wertes von 6,0 (linke Bildseite), zum Beispiel in ER und im Golgi, liegt das Gleichgewicht auf Seiten des nicht protonierten Imidazolrings. Fällt der pH-Wert unter 6,0 (rechte Bildseite), zum Beispiel in Endosomen und Lysosomen, verschiebt sich das Gleichgewicht und die protonierte Form des Imidazolrings dominiert.

Histidine konnten so zum Beispiel schon als regulatorische Aminosäurereste in der Multimerisierung des von Willebrand Faktor Plasma Proteins identifiziert werden (Dang et al, 2011), und auch in der Prolaktin(Zytokin)/ Prolaktin-Rezeptor (Zytokin-Rezeptor)-Interaktion spielen ihre pH-sensitiven Eigenschaften eine wichtige Rolle (Kulkarni et al, 2010).

Um zu zeigen, welcher Histidinrest innerhalb der Proteine für eine pH-sensitive Interaktion verantwortlich ist, machten sich die Experimentatoren die Ladungseigenschaften von Aminosäuren zunutze. Histidin wurde entweder durch einen nicht geladenen Alaninrest oder durch einen in der Zelle permanent geladenen Lysinrest ersetzt. So wurden ladungsbedingte Assoziationen bzw. Dissoziationen von Proteinen studiert und die pH-sensitiven Histidine identifiziert (Dang et al, 2011; Kulkarni et al, 2010).

1.3 Das Lysosom

Das Lysosom steht am Ende des endozytotischen Weges und sorgt neben Abbau und Wiederverwertung von Zellbestandteilen auch für die Pathogenabwehr nach Phagozytoseereignissen. Dem Abbau unterzogen werden neben unzähligen Makromolekülen des sekretorischen Weges auch autophagozytierte Organellen und phagozytierte Partikel. Einzelbausteine, wie zum Beispiel Aminosäuren, Nukleotide, Fettsäuren und Zucker, stehen anschließend wieder für neue Synthesewege zur Verfügung (Cohn & Benson, 1965; Duve, 1959; Glaumann et al, 1981).

Die Regulation des sauren pH-Wertes innerhalb der Lysosomen von etwa pH 5,5-4,5 übernimmt im Wesentlichen die vesikuläre H^+ -ATPase (Abschnitt 1.2.1). Neben der V-ATPase spielt vermutlich auch der Chlorid-/ Protonenaustauscher CLC-7 eine Rolle, denn positive

Ladungen innerhalb der Lysosomen müssen durch Negative ausgeglichen werden, um den osmotischen und elektrischen Gradienten im Gleichgewicht zu halten. In diesem Zusammenhang sorgt CLC-7 für den Einstrom von 2 Chloridionen in das Lysosom gegen 1 H⁺-Ion, das wieder heraus transportiert wird (Graves et al, 2008). Defekte im CLC-7-Gen (*CLCN7*) wurden als Verursacher der Marmorknochenkrankheit Osteopetrose identifiziert, die durch eine gestörte Knochenresorption gekennzeichnet ist (Kornak et al, 2001). Neuere Studien deuten jedoch darauf hin, dass für den Ausgleich positiver Ladungen innerhalb der Lysosomen nicht ausschließlich CLC-7 verantwortlich sein kann. Wird nämlich der Chlorid-/ Protonen-Austauscher durch eine Mutation in einen, nur Chloridionen transportierenden, Kanal umgewandelt, sinkt der lysosomale pH-Wert nicht und ein komplettes Fehlen des CLC-7-Proteins verändert den pH-Wert ebenfalls nur geringfügig (Weinert et al, 2010).

Fest steht jedoch, dass ein niedriger lysosomaler pH-Wert essentiell ist, denn die Funktion als verdauendes Kompartiment kann nur unter Mitwirkung der über 50 sauren Hydrolasen erfüllt werden (Duve, 1959). Mutationen in den lysosomalen Hydrolasen oder Umstände, die zu deren Funktionsausfall beitragen, können zu ernststen lysosomalen Speichererkrankungen führen.

1.3.1 Lysosomale Speichererkrankungen

Als lysosomale Speichererkrankungen wird eine Gruppe von über 40 verschiedenen Stoffwechselerkrankungen bezeichnet, die durch genetische Defekte lysosomaler Hydrolasen oder lysosomaler Membranproteine verursacht werden. In der Bevölkerung treten lysosomale Speichererkrankungen mit einer durchschnittlichen Häufigkeit von etwa 1:7700 Geburten auf (Meikle et al, 1999).

Als Folge fehlender oder reduzierter Enzymaktivität sowie gestörtem Abtransport von Stoffwechselprodukten sammeln sich die jeweiligen Substrate in den Lysosomen an (Futerman & van Meer, 2004). Besonders gut beschrieben wurden bisher die Sphingolipidosen. Die hier verantwortlichen Fehlfunktionen befinden sich meist in zuckerabbauenden Hydrolasen, die Zuckerreste von Glukosphingolipiden (Glykosylceramiden) entfernen, damit diese durch Ceramidasen abgebaut werden können (Sandhoff et al, 1992; Sawkar et al, 2006).

1.3.1.1 Morbus Gaucher

Die am weitesten verbreitete Sphingolipidose ist Morbus Gaucher. Die Erkrankung ist nach dem Dermatologen Phillipe Gaucher (1854-1918) benannt, der als Erster die als Gaucherzellen bekannten Makrophagen in Milz, Leber und Knochenmark beschrieb (Birch, 1973). Morbus Gaucher tritt mit einer Häufigkeit von 1:50.000-200.000 Geburten auf, wobei die Inzidenz unter Ashkenazi Juden mit 1:1000 Geburten eine Ausnahme darstellt (Beutler, 1988). Krankheitsursache stellen in der Regel Mutationen im Gen der β -Glukocerebrosidase dar, welche zu einer Fehlfaltung des Proteins und dessen Retention im ER führen (Beutler et al, 1994; Ron & Horowitz, 2005). Liegt hingegen eine Mutation im Sphingolipidaktivatorprotein Prosaposin vor (Abschnitt 1.1.2), die zu einem Defekt im Saposin C führt, kommt es zu einer sogenannten *Gaucher-like disease*. Denn ohne ihren allosterischen Aktivator Saposin C ist die β -Glukocerebrosidase nicht mehr in der Lage Glukosylceramide abzubauen (Fabbro & Grabowski, 1991; Rafi et al, 1993).

Der Glukosylceramidabbau beginnt mit der Abspaltung endständiger Glukose durch die β -Glukocerebrosidase (Abbildung 1.6). Findet diese Spaltung nicht mehr statt, staut sich β -Glukocerebrosid in den Zellen an und bringt Abbau- und Neusyntheseprozesse zum Erliegen. Als Folge entsteht Morbus Gaucher (Brady et al, 1965).

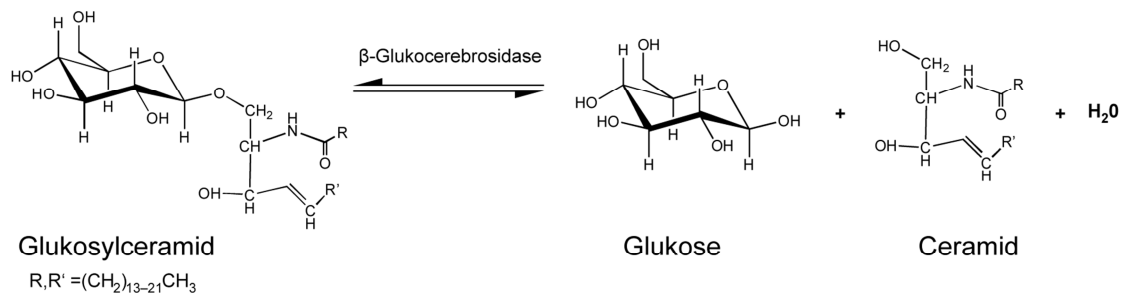


Abbildung 1.6: β -Glukocerebrosidase katalysiert die Hydrolyse des Glukosylceramids in seine Einzelbausteine Glukose und Ceramid.

Unterteilen lässt sich die Erkrankung in 3 Typen, die jedoch keine Genotyp-/ Phänotypkorrelation aufweisen. Typ 1 bezeichnet die nicht-neuropathische Ausprägung. Hier findet die Akkumulation des Speichermaterials vermehrt in Milz, Leber und Knochenmark statt und zeigt sich durch eine Vergrößerung der Organe, der Missbildung von Knochen und Blutbildveränderungen (Meivar-Levy et al, 1994). Die neuropathischen Formen (Typ 2 und 3) treten

nur in 5-10% der Morbus Gaucher-Neugeburten auf. Bei diesen Formen finden sich zusätzlich zu den Symptomen der an Typ 1 erkrankten Patienten auch Ablagerungen des Speicher-materials im zentralen Nervensystem. Myoklonische Epilepsie und mentale Retardierung können die Folgen sein. Im Fall des akut neuropathischen Typ 2 Gaucher ist sogar mit einem frühen Tod vor Erreichen des zweiten Lebensjahrs zu rechnen (Kolter & Sandhoff, 2006; Leech et al, 1985; Park et al, 2003). Es wird davon ausgegangen, dass der Schweregrad der Morbus Gaucher Erkrankung besonders dadurch geprägt ist, wie viel der Mutante über den ERAD-Prozess degradiert wird, denn ein geringes Enzymaufkommen führt auch zu verringerter Aktivität (Ron & Horowitz, 2005). Die Tatsache, dass mutierte β -Glukocerebrosidase innerhalb des ERAD-Abbauprozesses durch die, mit Parkinson assoziierte, E3-Ligase Parkin ubiquitiniert wird, konnte eine Erklärung dafür geben, warum Morbus Gaucher auch als Risikofaktor für die Ausbildung der Parkinsonkrankheit gilt (Neudorfer et al, 1996; Ron et al, 2010). Hier sind in der Regel ältere Patienten betroffen, die ursprünglich die nicht-neuropathische Krankheitsausprägung aufweisen (Neudorfer et al, 1996).

Obwohl lysosomale Speichererkrankungen häufig durch die Fehlfunktion von lysosomalen Hydrolasen ausgelöst werden, können einige der Erkrankungen auch durch defekte lysosomale Membranproteine entstehen. Die Proteine der lysosomalen Membran übernehmen unter anderem den Abtransport der aus dem hydrolytischen Abbau entstandenen Einzelbausteine.

1.3.2 Lysosomale Membranproteine

Die lysosomale Membran schützt in erster Linie das umgebende Zytoplasma vor dem Übertritt saurer Hydrolasen, denn trotz des Aktivitätsmaximums in saurem Milieu besitzen manche lysosomale Enzyme in pH-neutraler Umgebung immer noch Restaktivitäten (Butor et al, 1995). Diese würden unweigerlich zur Degradation wichtiger Zellbestandteile führen. Ein Übertritt soll in Einzelfällen jedoch stattfinden können, wenn im Zuge des programmierten Zelltods Cathepsine oder saure Phosphatasen signalgesteuert aus dem Lysosom entlassen werden (Dietrich et al, 2004; Halaby et al, 1994). Dieser Mechanismus ist jedoch noch nicht vollständig geklärt und erfordert weitere Untersuchungen.

Im Normalfall bildet die lysosomale Membran jedoch eine Barriere, in die eine Vielzahl integraler Proteine eingebaut sind, die die unterschiedlichsten Aufgaben erfüllen (Abbildung 1.7). Sie sind unter anderem für Membranstabilisierung, Transport und Aktivierung lysoso-

1 Einleitung

maler Hydrolasen, Fusion mit späten Endosomen, Vermittlung von Autophagozytoseprozessen sowie Azidifizierung des lysosomalen Lumens und Abtransport der aus dem Abbau resultierenden Einzelmoleküle verantwortlich (Bowman & Bowman, 1986; Eskelinen et al, 2002; Forgac, 1998; Kuronita et al, 2002; Luzio et al, 2007).

Von der Gesamtheit der Membranproteine sind die lysosomal assoziierten Membranproteine, LAMP-1 und 2 sowie das lysosomale integrale Membranprotein LIMP-2 (LGP85, SCARB-2) die am stärksten glykosylierten. Jedoch sind auch die meisten anderen Membranproteine mit N-Glykosylierungen ausgestattet. Nur wenige Membranproteine, darunter die LAMP-Proteine, enthalten auch O-Glykosylierungen (Carlsson et al, 1993; Eskelinen et al, 2003). Der hohe Zuckeranteil sorgt für einen ausreichenden Schutz gegenüber der sauren Umgebung (Fukuda, 1991; Kundra & Kornfeld, 1999; Saftig & Klumperman, 2009).

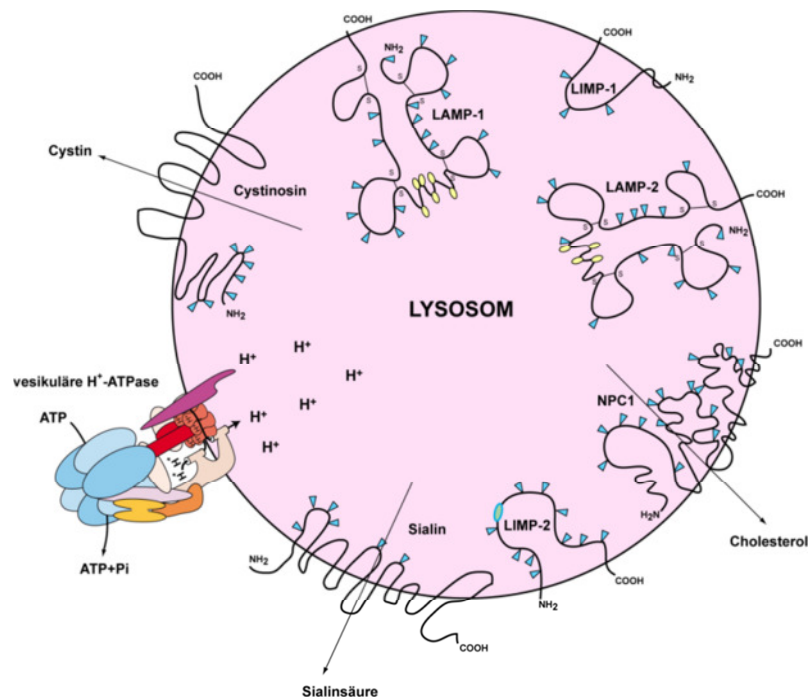


Abbildung 1.7: Das Lysosom und einige wichtige Membranproteine. Die LAMP- und LIMP-Proteine machen etwa 50% der lysosomalen Membran aus und übernehmen unter anderem stabilisierende Funktionen. Die vesikuläre H⁺-ATPase sorgt für die Aufrechterhaltung des niedrigen pH-Wertes von etwa 5,5-4,5. Transporter, wie Niemann-Pick-Typ 1 (NPC-1), Cystinosin und Sialin, sorgen für den Abtransport von Abbauprodukten in das Zytosol. Blaue Dreiecke: N-Glykosylierung; gelbe Ovale: O-Glykosylierung; S-Brücken: Cysteinbindungen. Abbildung modifiziert nach (Beyenbach & Wieczorek, 2006; Eskelinen et al, 2003; Ioannou, 2000; Nguyen & Danser, 2008).

Viele Erkenntnisse über Notwendigkeit und Funktion der LAMP- und LIMP-Proteine konnten über sogenannte *knockout*-Mäuse gewonnen werden. Einzeln oder doppelt ausgeschaltete

Gene der jeweiligen Membranproteine haben gezeigt, dass das Fehlen der abundanten Proteine LAMP-1 und LIMP-1 weniger Konsequenzen hat als eine LAMP-2- oder LIMP-2-Defizienz (Andrejewski et al, 1999; Gamp et al, 2003; Schröder et al, 2009; Tanaka et al, 2000). LAMP-2, unterteilt in drei Isoformen A, B und C, erfüllt wichtige Aufgaben bei Autophagozytoseprozessen. So konnte die Isoform LAMP-2B, die in Patienten mit der sogenannten Dannon Krankheit mutiert ist, mit der Makroautophagozytose in Verbindung gebracht werden, wohingegen LAMP-2A als Rezeptor während der Chaperon vermittelten Autophagie diskutiert wird (Bandyopadhyay & Cuervo, 2007; Tanaka et al, 2000).

1.3.2.1 Das lysosomale integrale Membranprotein Typ 2 (LIMP-2)

LIMP-2 ist ein 2-fach die Membran durchspannendes Typ 3 Transmembranprotein, das zu der CD36 Proteinfamilie gehört. CD36 selber ist ein Plasmamembranprotein, das auch unter dem Namen *Platelet Glycoprotein 4* oder *Leukocyte differentiation antigen CD36* bekannt ist. An der Zelloberfläche von Blutplättchen bindet CD36 unter anderem das Plasmaglykoprotein Thrombospondin-I und das Kollagen der extrazellulären Matrix von Endothelzellen und ist so in Thrombozytenaggregation und Zelladhäsionsprozesse involviert (Asch et al, 1992; Silverstein et al, 1989; Tandon et al, 1989). LIMP-2 hingegen ist nur wenig an der Plasmamembran zu finden, kann hier jedoch als Rezeptor für das Enterovirus 71 dienen und damit einen wichtigen Mediator im Entstehungsprozess der *Hand-Foot-Mouth Disease* (nicht identisch mit *Foot-and-mouth-disease*: Maul und Klauenseuche) darstellen (Chen et al, 2012; Yamayoshi et al, 2009). Die für die Thrombospondin-I-Bindung notwendige Sequenz des CD36-Proteins besitzt LIMP-2 ebenso; eine Funktionalität der dadurch möglichen LIMP-2-/Thrombospondin-I-Interaktion ist jedoch bisher nicht bekannt (Crombie & Silverstein, 1998). Sowohl C-Terminus als auch N-Terminus des LIMP-2-Proteins befinden sich auf der zytosolischen Seite, während sich eine mehrfach glykosylierte Schleife im lysosomalen Lumen befindet (Vega et al, 1991a); Abbildung 1.8 A). Im lumenalen Teil des LIMP-2-Proteins konnte weiterhin eine, unter Säugetieren stark konservierte, *coiled-coil*-Domäne identifiziert werden (Reczek et al, 2007); Abbildung 1.8 B). *Coiled-coil*-Domänen sind α -helikale Strukturen in Proteinen, die häufig bei Protein-Protein-Interaktionen eine Rolle spielen (Lupas & Gruber, 2005; Yu, 2002).

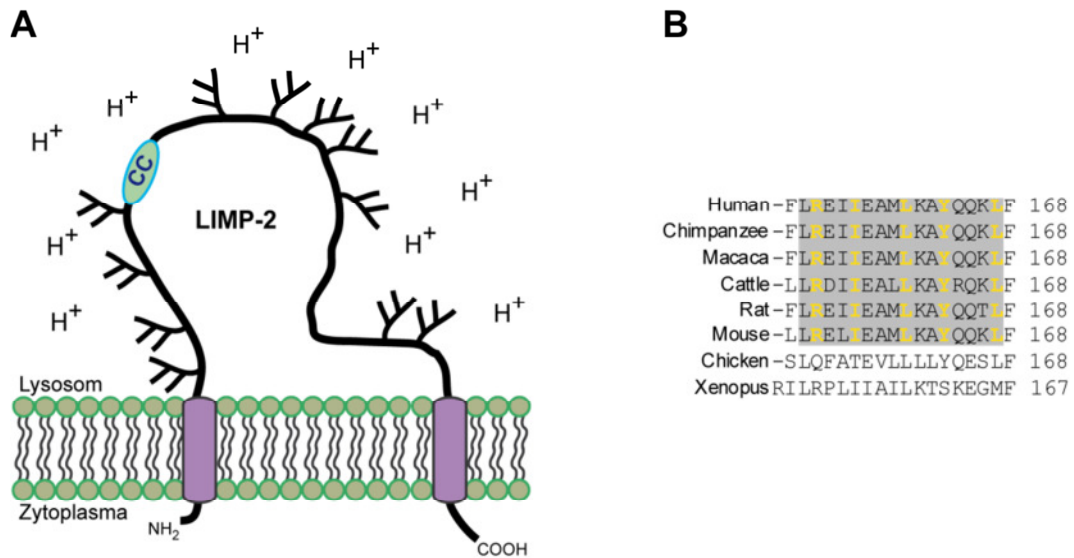


Abbildung 1.8: Das lysosomale integrale Membranprotein Typ 2 (LIMP-2) und seine *coiled-coil* Domäne. A) LIMP-2 integriert in die lysosomale Membran. Als dreizackige Bäume angedeutet sind die 11 möglichen Glykosylierungsstellen des Proteins. An Position 152-167 befindet sich eine vermutete *coiled-coil*-Domäne (CC), die unter Säugern hoch konserviert ist. B) Sequenzvergleich des LIMP-2-Proteins unter Vertebraten im Bereich der hoch konservierten *coiled-coil*-Domäne.

Am zytosolischen C-Terminus von LIMP-2 befindet sich ein Dileucinmotiv des [DE]XXXL[LI] Typs, das am *trans*-Golginetzwerk vom Adapter Protein 3 (AP3) gebunden wird. Ein clathrin-vermittelter Transport zu den Lysosomen wird hiermit gewährleistet (Dell'Angelica et al, 1998; Höning et al, 1998; Sandoval et al, 1994; Vega et al, 1991b).

Die mögliche Funktion von LIMP-2 wurde anhand der LIMP-2-defizienten Maus erstmals beschrieben (Gamp et al, 2003). Histologische Untersuchungen zeigen einen charakteristischen Phänotyp mit Schädigungen der afferenten Nerven (periphere Neuropathie) sowie einer ein- oder beidseitigen Blockade der Ureter-Nierenbecken-Verbindungen. Das kann zu einer massiven Vergrößerung der Niere durch Urinansammlung (Hydronephrose) führen, die auch als Stauungs- oder Wasserkelchniere bezeichnet wird. Außerdem sind die Mäuse spätestens im Alter von vier Wochen taub, was wahrscheinlich auf den frühen Verlust des Kaliumkanals KCNQ1 und dessen Untereinheit KCNE1 in den Marginalzellen der *Stria vascularis* des Innenohrs zurückzuführen ist (Gamp et al, 2003; Knipper et al, 2006). Des Weiteren wurde für LIMP-2 eine stabilisierende Funktion der lysosomalen Membran postuliert. So konnten Überexpressionstudien von LIMP-2 und LAMP-Proteinen eine LIMP-2-spezifische Schwellung der Lysosomen zeigen, die wahrscheinlich auf die Verschmelzung des endosomalen/ lysosomalen Kompartiments zurückzuführen ist (Kuronita et al, 2002;

Kuronita et al, 2005). Unter den LIMP- und LAMP-Proteinen der lysosomalen Membran ist bisher nur LIMP-2 auch als Transportrezeptor bekannt. So bindet LIMP-2 die M6PR-unabhängig transportierte lysosomale Hydrolase β -Glukocerebrosidase bereits im ER und nimmt sie mit in die Lysosomen (Reczek et al, 2007); Abschnitt 1.3.2.1.1 und Abbildung 1.9). Seit einem genomweiten *Screen* im Jahr 2008 mit Proben von *action myoclonus renal failure* (AMRF) Syndrom Patienten (Abschnitt 1.3.2.1.2), einer seltenen autosomal-rezessiven Erkrankung, ist es auch möglich, die Auswirkungen von LIMP-2-Mutationen am Menschen zu charakterisieren (Berkovic et al, 2008). Die Transportfunktion und der Krankheitsbezug von LIMP-2 sollen im Folgenden etwas näher beschrieben werden.

1.3.2.1.1 Der LIMP-2-gesteuerte Transport von β -Glukocerebrosidase

β -Glukocerebrosidase ist eine lysosomale Hydrolase, der kein Mannose-6-Phosphatrest übertragen wird. In den Zellen von Patienten mit der I-Zell-Erkrankung wird sie daher auch nicht aus der Zelle sekretiert, sondern ist innerhalb der Lysosomen detektierbar (Aerts et al, 1988; van Dongen et al, 1985). Um Interaktionspartner und damit mögliche Transportrezeptoren der β -Glukocerebrosidase zu finden, wurde ein murines Leberlysat über eine mit rekombinanter β -Glukocerebrosidase gekoppelten Affinitätssäule geschickt und gebundenes Protein einer massenspektroskopischen Untersuchung unterzogen.

Dabei konnte LIMP-2 als Interaktionspartner der β -Glukocerebrosidase identifiziert werden (Reczek et al, 2007). Anschließend wurde β -Glukocerebrosidase in LIMP-2-defizienten Mäusen und deren Zellen ausgiebig charakterisiert. Dabei wurde festgestellt, dass ein Fehlen von LIMP-2 eine Retention der β -Glukocerebrosidase im ER oder ihre vermehrte Sekretion zur Folge hat und dieser Fehltransport mit einer massiven Reduktion der enzymatischen β -Glukocerebrosidase-Aktivität einhergeht. Weiterhin konnten *in vitro* Bindungsstudien der luminalen LIMP-2-Domäne an einer mit rekombinanter β -Glukocerebrosidase gekoppelten Affinitätssäule zeigen, dass die Interaktion beider Proteine umso stärker ist, je höher der pH-Wert wird. Zusammengenommen führten die Ergebnisse zu einem Modell des LIMP-2-gesteuerten Transports von β -Glukocerebrosidase innerhalb des sekretorischen Weges. Hierbei wird die Hydrolase schon im ER unter pH-neutralen Bedingungen an seinen Rezeptor gebunden und im spätendosomal/ lysosomalen System aus der Bindung entlassen (Abbildung 1.9), um der Hydrolyse von Glykosylceramiden nachzugehen (Brady et al, 1965; Griffiths, 2007; Reczek et al, 2007); Abbildung 1.6).

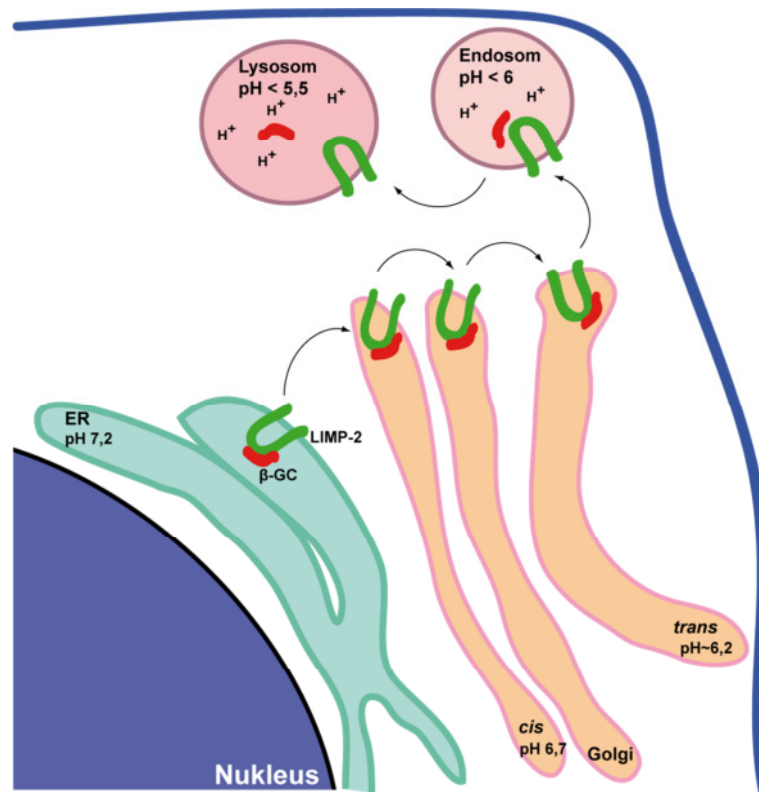


Abbildung 1.9: LIMP-2-abhängiger Transport der lysosomalen β-Glukocerebrosidase. ER: LIMP-2 bindet die β-Glukocerebrosidase (β-GC). Golgi: Transport des LIMP-2/ β-Glukocerebrosidase-Komplexes. Endosom/ Lysosom: Der fallende pH-Wert führt zur Dissoziation der β-Glukocerebrosidase von LIMP-2. Modifiziert nach Reczek et al. 2007

1.3.2.1.2 Das Action Myoclonus Renal Failure Syndrome

Das *action myoclonus renal failure* (AMRF) Syndrom (AMRF, OMIM 254900) ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die auf Mutationen im LIMP-2-Gen zurückzuführen ist. Das Syndrom ist gekennzeichnet durch progressive myoklonische Epilepsie (PME) und fokale, segmentale Glomerulosklerose (FSGS) mit Proteinurie (Andermann et al, 1986; Badhwar et al, 2004). Eine progressive myoklonische Epilepsie zeichnet sich durch das unregelmäßige Auftreten von Muskelspasmen aus. Im progressiven Verlauf der Erkrankung können sogenannte tonisch-klonische Anfälle hinzukommen. Dabei folgt einer wenige Sekunden anhaltenden Muskelversteifung eine klonische Phase, die mit intensiven Spasmen im gesamten Körper einhergeht (Berkovic et al, 1986). Die fokale, segmentale Glomerulosklerose stellt eine Vernarbung (Sklerose) innerhalb der Nierenkörperchen (Glomerulie) dar. Durch die progressive Zerstörung der Kapillargefäße kommt es zum Übertritt von Bluteiweißen in den Urin, die als direkter Indikator für den Zerstörungsgrad der Niere dienen

können. Am Ende der Erkrankung steht der völlige Kollaps der Nierenkörper. Die ersten AMRF-Symptome treten etwa zwischen dem 15. und 20. Lebensjahr auf, und der Tod folgt meist wenige Jahre später zwischen dem 25. und 40. Lebensjahr (Badhwar et al, 2004).

Das AMRF-Syndrom wird zwar bisher nicht als lysosomale Speichererkrankung klassifiziert, jedoch wurde bei AMRF-Patienten Speichermaterial innerhalb des zentralen Nervensystems entdeckt. Dieses konnte auch im Gehirn LIMP-2-defizienter Mäuse nachgewiesen werden (Berkovic et al, 2008). Bisher wurden Ablagerungen jedoch nur in Leber und Lunge der Maus eindeutig als Glukosylceramide identifiziert. Ein eingeschränkter Transport der β -Glukocerebrosidase wird dafür verantwortlich gemacht (Reczek et al, 2007). Ob es sich bei der starken Ansammlung von Speichermaterial im Gehirn von AMRF-Patienten um Glykosphingolipide handelt, ist bisher unklar.

Die Mutationen im LIMP-2-Gen führen in den meisten Fällen zur Bildung trunkierter Proteine, jedoch konnten auch *splice site* Mutationen und eine Punktmutation identifiziert werden (Balreira et al, 2008; Chaves et al, 2011; Dardis et al, 2009; Desmond et al, 2011; Dibbens et al, 2009; Hopfner et al, 2011); Tabelle 1.1). Alle bisher beschriebenen LIMP-2-AMRF-Mutanten können das ER nicht verlassen und erreichen somit nicht die Lysosomen (Berkovic et al, 2008; Blanz et al, 2010).

Tabelle 1.1

| Genmutation | Typ | Protein | PME | FSGS | Referenz |
|----------------|--------------------|------------|-----|------|------------------------|
| c.296delA | <i>frame shift</i> | N99IfsX34 | ✓ | ✓ | (Berkovic et al, 2008) |
| c.435_436insAG | <i>frame shift</i> | W146SfsX16 | ✓ | ✓ | |
| c.862C>T | <i>stop codon</i> | Q288X | ✓ | ✓ | |
| c.1239+1G_T | <i>splice site</i> | | ✓ | ✓ | |
| c.533G>A | <i>stop codon</i> | W178X | ✓ | ✓ | (Balreira et al, 2008) |
| c.1087C>A | Punktmutation | H363N | ✓ | ✓ | (Dardis et al, 2009) |
| c.111delC | <i>frame shift</i> | S36MfsX17 | ✓ | ✓ | (Hopfner et al, 2011) |
| c.666delCCTTA | <i>frame shift</i> | Y222XfsX | ✓ | | (Dibbens et al, 2009) |
| c.704_1G_C | <i>splice site</i> | | ✓ | | |
| c.1116-2A_C | <i>splice site</i> | | ✓ | | |
| c.1258delG | <i>frame shift</i> | E420RfsX5 | ✓ | | |

PME = **P**rogressive **m**yo**k**lonische **E**pilepsie

FSGS = **F**okale **s**egmentale **G**lomerulo**s**klerose

In Fibroblasten von AMRF-Patienten konnte eine reduzierte lysosomale Aktivität sowie eine vermehrte Sekretion der β -Glukocerebrosidase festgestellt werden. In Leukozyten ist ein Aktivitätsverlust der β -Glukocerebrosidase jedoch nicht feststellbar (Balreira et al, 2008; Dardis et al, 2009). Interaktionsstudien zwischen β -Glukocerebrosidase und den meisten bekannten LIMP-2-Trunkationsmutanten sowie der H363N-Punktmutante zeigten, dass die Bindungsstärke je nach Länge der AMRF-Mutante stark nachlässt und dass ein komplettes Fehlen der für die β -Glukocerebrosidase-Bindung verantwortlichen putativen LIMP-2-*coiled-coil*-Domäne eine Interaktion fast ganz verhindert (Blanz et al, 2010). Bisher ist nicht bekannt, wie die Interaktion beider Proteine von Seiten der β -Glukocerebrosidase beeinflusst wird. Dass die LIMP-2/ β -Glukocerebrosidase-Bindung vom pH-Wert abhängig ist, wird jedoch stark vermutet (Reczek et al, 2007). Den genauen Mechanismus gilt es allerdings noch zu klären.

2 Fragestellung

In vorhergehenden Arbeiten konnte LIMP-2, ein Protein, dessen mutierte Form das autosomal-rezessiv vererbte *action myoclonus renal failure* Syndrom verursacht, als Transportrezeptor der lysosomalen Hydrolase β -Glukocerebrosidase identifiziert werden. *In vitro* Interaktionsstudien zwischen der lumenalen Domäne von LIMP-2 und der β -Glukocerebrosidase konnten zeigen, dass die Bindung stärker ist, je höher der umgebende pH-Wert liegt.

Im ersten Teil dieser Arbeit soll die pH-Wert-Abhängigkeit der LIMP-2/ β -Glukocerebrosidase-Interaktion näher untersucht werden. Zunächst soll die Bindung im zellulären System mit und ohne pH-Wert beeinflussende Agenzien charakterisiert werden. Im Anschluss daran sollen Mutationen von putativ pH-regulierenden Histidinresten des LIMP-2-Proteins aufklären, wo genau sich die pH-sensitive Aminosäure befindet, die eine Assoziation und Dissoziation der β -Glukocerebrosidase veranlasst. Die im Entstehungsprozess dieser Arbeit neu beschriebene AMRF-Mutante LIMP-2-Y222X soll in dieser Hinsicht dazu genutzt werden, den in die β -Glukocerebrosidase-Bindung involvierten Bereich weiter einzugrenzen und die Suche nach dem putativen pH-sensitiven Histidin zu erleichtern.

Eine, dieser Arbeit vorausgegangene, Hefe-2-Hybrid-Interaktionsstudie mit LIMP-2 gegen eine murine Gehirn-cDNA-Bibliothek konnte den (Pro)Renin Rezeptor als einen weiteren putativen Interaktionspartner von LIMP-2 identifizieren. Da der (Pro)Renin Rezeptor unter anderem als Komponente des Wnt-/ β -Catenin-Signalwegs agiert und zusammen mit der vesikulären H^+ -ATPase für eine regulierte Azidifizierung der Signalendosomen sorgt, soll in dieser Arbeit damit begonnen werden, zu untersuchen, ob das Vorhandensein von LIMP-2 ebenfalls einen Einfluss auf den Wnt-Signalweg ausübt.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

| | |
|--|--|
| Agarosegeldokumentationsanlage, Gel Jet Imager | Intas, Göttingen, D |
| Agarosegelelektrophoresekammer, Modell H5 | Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, US |
| Analysenwaage | Kern & Sohn, Dürrwangen, D |
| Autoklav, Tecnomara | Integra Bioscience, Fernwald, D |
| Chemilumineszenzkamera LAS-4000, | Fujifilm, Carrollton, US |
| DNA-Photometer, GeneQuant pro | Biochrom Ltd, Cambridge UK |
| Elektroporationsgerät Gene Pulser™, | BioRad, München, D |
| Fluoreszenzmikroskop, Axiovert 200M | Zeiss, Jena, D |
| Homogenisator, Precellys 24 | Peqlab, Erlangen, D |
| Horizontalschüttler, RM 5 | Assistent, Sondheim, D |
| Inkubator Zell- und Gewebekulturen HERAcell 150 | Heraeus, Hanau, D |
| Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop, FluoView 1000 | Olympus, Hamburg, D |
| Lichtmikroskop, T1-SNCP | Nikon Corporation Instrument Company, Japan |
| Luminometer, GLOMAX | Promega Mannheim, D |
| Mikropipetten | Gilson, Middleton, US Eppendorf, Hamburg, D |
| Mikrowellenherd | Panasonic Deutschland, Hamburg, D |
| 96-Loch-Mikrotiterplattenleser, Gen5 | Biotek Instruments, Bad Friedrichshall, D |
| Multipipette | Eppendorf, Hamburg, D |
| PCR-Cycler, GeneAmp PCR System 2400 | Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA |
| pH-Elektrode | Krick, Langenselbold, D |
| Pipetboy | Integra Bioscience, Fernwald, D |
| Rollator | Assistent, Sondheim, D |
| SDS-PAGE-Elektrophoresekammer | Mini-Protean 3-Elektrophorese-System, BioRad, München, D |
| Semi-Dry-Blot-Apparatur | BioRad, München, D |
| Spannungsquelle | PowerPac 200/300, BioRad, München, D |
| Sterilbank | Laminar Flow Bioflow, Clan LAF, Meckenheim, D |
| Tank-Blot-Apparatur | BioRad, München, D |
| Thermoblock Thermomixer | 5436, Eppendorf, Hamburg, D |
| Tischzentrifuge | 5415C, Eppendorf, Hamburg, D |
| Ultraschallbad, Branson Sonifier 450 | G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, D |
| Ultrazentrifuge, Optima TLX, TLA 55 Rotor | Beckman, Fullerton, USA |

| | |
|----------------------------|------------------------|
| Vortex-Gerät | Heidolph, Schwabach, D |
| Wärmeschrank | Memmert, Schwabach, D |
| Waage | Ohaus, Parsippany, USA |
| Wasserbad | GFL, Burgwedel, D |
| Ultrazentrifuge, J2-HS | Beckman, Fullerton, CA |
| Zentrifuge, Multifuge 3SR+ | Heraeus, Hanau, D |
| Zentrifuge, Universal 32 | Hettich, Tuttlingen, D |

3.1.2 Labormaterialien

| | |
|---|---|
| Bechergläser | Roth, Karlsruhe, D |
| Deckgläser | Assistent, Sondheim, D |
| Einmalkanülen, Microlace (20, 23, 27G) | Becton Dickinson, Heidelberg, D |
| Einmalpipetten 5-50 ml | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| Einmalspritzen | Becton Dickinson, Heidelberg, D |
| Elektroporationsküvetten | Peqlab, Erlangen, D |
| Erlenmeyerkolben | Roth, Karlsruhe, D |
| Gewebe-Kulturschalen | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| Handschuhe, Latex, Nitril | Roth, Karlsruhe, D |
| 6-Loch-Mikrotiterplatten | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| 24-Loch-Mikrotiterplatten | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| 96-Loch-Mikrotiterplatten | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| Messzylinder | Roth, Karlsruhe, D |
| Nitrocellulosemembran | Roth, Karlsruhe, D |
| Objektträger | Menzel-Gläser GmbH & Co. KG, Braunschweig, D |
| Parafilm | American National Can, Greenwich, UK |
| Pasteurpipetten | Assistent, Sondheim, D |
| Pipettenspitzen | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| Reaktionsgefäße | Eppendorf, Hamburg, D |
| Reaktionsgefäße für Ultrazentrifugation | Beckman, Fullerton, US |
| Sterile Plastikröhrchen | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| Sterilfilter Filtropurs 0,2 | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| Vernichtungsbeutel | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| Whatman-Papier | Roth, Karlsruhe, D |
| Zellschaber | Sarstedt, Nümbrecht, D |

3.1.3 Chemikalien, Enzyme, Reagenzien

| | |
|---|--|
| 30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid, Rotiphorese Gel 30 | Roth, Karlsruhe, D |
| Agarose | Lonza, Köln, D |
| Ampicillin | Melford Laboratories, Chelsworth, UK |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS p.a.) | Roth, Karlsruhe, D |
| Bafilomycin A1 | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| Bromphenolblau | Canalco, Bethesda, MD, US |
| BSA | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| Calciumchlorid-Dihydrat | Merck, Darmstadt, D |
| Complete Protease-Inhibitor | Roche, Mannheim, D |
| DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan) | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| DTT (Dithiothreitol) | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| DMEM <i>High Glucose</i> | PAA, Laboratories, Linz, A |
| DMSO (Dimethyl-Sulfoxid) | Serva, Heidelberg, D |
| DNA-Leiter, 100bp, 1 kb | Roche, Mannheim, D |
| DNA-Polymerasen | Fermentas, St. Leon-Rot, D |
| dNTPs | Fermentas, St. Leon-Rot, D |
| Dynabeads® Protein A | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Dynabeads® Protein G | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| EDTA | Roth, Karlsruhe, D |
| Endoglycosidase H | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D |
| Ethanol 99,8% p.a. | Roth, Karlsruhe, D |
| Ethidiumbromidlösung (1 %) | Roth, Karlsruhe, D |
| EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin | Thermo Fisher Scientific, Rockford, US |
| FCS | PAA, Laboratories, Linz, A |
| Fugene® HD Transfektions Reagenz | Roche AG, Basel, Schweiz |
| Genetecin G418 | PAA, Laboratories, Linz, A |
| Glukose 97 % | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| Glycerin (99,9 %) | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| Glycin 99 % | Roth, Karlsruhe, 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 |
| Ladepuffer, 6 x für Agarosegele | Fermentas, St. Leon-Rot, D |
| Lipofectamin2000® | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| <i>Lysotracker Red</i> DND-99 | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Magermilchpulver | Roth, Karlsruhe, D |
| Magnesiumchlorid-Hexahydrat p.a. | Merck, Darmstadt, D |
| 2-Mercaptoethanol (p.a.) | Roth, Karlsruhe, D |
| Methanol | Roth, Karlsruhe, D |

3 Material und Methoden

| | |
|--|--|
| MG-132 | Merck, Darmstadt, D |
| Mowiol | Calbiochem, LaJolla CA, US |
| Natriumchlorid | Roth, Karlsruhe, D |
| Natriumhydrogenphosphat | Roth, Karlsruhe, D |
| Natriumhydroxid $\geq 98,5\%$ | Riedel-de-Haën, Seelze, D |
| N-Glykosidase F (PNGase F) | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D |
| 4-Nitrophenyl β -D-glucopyranoside | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| Paraformaldehyd purum, $\geq 95\%$ | Fluka, Buchs, Schweiz |
| Penicillin/Streptomycin | PAA-Laboratories, Linz, A |
| Pepstatin A 100X | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| <i>Polybren</i> (Hexadimethrinbromid) | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| Ponceau S-Lösung 0,1 %ig in 5 % Essigsäure | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| Proteinmarker <i>Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus</i> | Fermentas, St. Leon-Rot, D |
| Puromycin | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| Restriktionsenzyme | Fermentas, St. Leon-Rot, D |
| SDS (Natriumlaurylsulfat) | Roth, Karlsruhe, D |
| Streptavidin Sepharose <i>Beads</i> | Thermo Fisher Scientific, Rockford, US |
| TEMED (p.a.) | Roth, Karlsruhe, D |
| Tetrazyklin | Merck, Darmstadt, D |
| Tris | Roth, Karlsruhe, D |
| Triton X-100 | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| Turbofect® Transfektions Reagenz | Fermentas, St. Leon-Rot, D |
| Tween-20 | Sigma Aldrich, Steinheim, D |

3.1.4 Verwendete Kits

| | |
|---|--|
| <i>BCA Protein Assay Kit</i> | Thermo Fisher Scientific, Rockford, US |
| <i>Dual Luciferase® Reporter Assay Kit</i> | Promega, Mannheim, D |
| DNA-Extraktion | Analytik Jena, Jena, D |
| <i>ECL Advanced Western Blot Detection System</i> | Amersham, Little Chalfont, UK |
| <i>High Pure PCR Product Purification Kit</i> | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D |
| <i>PureYield Plasmid Midiprep System</i> | Promega, Mannheim, D |
| <i>Plasmid Miniprep Kit</i> | Fermentas, St. Leon-Rot, D |

3.1.5 Oligonukleotide

Tabelle 3.1: Klonierungsprimer

| Oligonukleotid | Sequenz (5'-3') |
|--------------------|---------------------------------|
| pFrog-h | GAGAACCCACTGCTTACTGG |
| pF3r | GAGACTCCATTCCGGGTGTTCT |
| LIMP-2-H150A-hin | TCCCAGGTGGCCTTCCTCA |
| LIMP-2-H150A-rück | TGAGGAAGGCCACCTGGGA |
| LIMP-2-H150K-hin | GTCCCAGGTGAAATTCCTCAG |
| LIMP-2-H150K-rück | CTGAGGAATTTACCTGGGAC |
| LIMP-2-H171A-for | TTTGTGACTGCCACAGTTGAC |
| LIMP-2-H171A-rev | GTCAACTGTGGCAGTCACAAA |
| LIMP-2-H171K-for | CTTTGTGACTAAAACAGTTGAC |
| LIMP-2-H171K-rev | GTCAACTGTTTTAGTCACAAAG |
| LIMP-2-H189A-hin | TCCCTTATCGCTGTTTTCAGG |
| LIMP-2-H189A-rück | CCTGAAAACAGCGATAAGGGA |
| LIMP-2-H189K-hin | TCCCTTATCAAAGTTTTCAGG |
| LIMP-2-H189K-rück | CCTGAAAACCTTTGATAAGGGA |
| LIMP-2-H189-for | TCCCTTATCCATGTTTTCAGG |
| LIMP-2-H189-rev | CCTGAAAACGTAGATAAGGGA |
| LIMP-2-H171A-hin | TTGTGATTGCCACCGTGCAC |
| LIMP-2-H171A-rück | GTGCACGGTGGCAATCACAA |
| LIMP-2-H171K-hin | GTTTGTGATTA AAAACCGTGCAC |
| LIMP-2-H171K-rück | GTGCACGGTTTTAATCACAAAC |
| hLIMP-2-A171H-hin | TTTGTGACTCACACAGTTGAC |
| hLIMP-2-A171H-rück | GTCAACTGTGTGAGTCACAAA |
| hLIMP-2-A257H-hin | GATTCTTTTACCCACTAATAA |
| hLIMP-2-A257H-rück | TTATTAGTGGGTGAAAAGAATC |
| NotI-LIMP-2-h | CCGCGGCCGCATGGGCAGATGCTGCTTCTAC |
| EcoRI-LIMP-2-r | CGGAATTCTTAGGTTTCGTATGAGGGGTGC |
| LIMP-2-Y222X-BHI-r | GAGGATCCATTGCTCTCCAGTCAGAA |
| LIMP-2-L160P-h | GCCATGCCGAAAGCCTATCAG |
| MYCF1 | ACACCATGGGAGCTGGTAAT |
| MYCR1 | CTTCWTCGACTTYCAGACCCAAGGCAT |
| MYCF2 | GTTCTTTGAAAACCTGAAT |
| MYCR2 | GCATCCACCAWAWACTCT |

W, Y sind sog. *Wobble*-Basen, also gemischte Basen

W = A+T; Y = C+T

3.1.6 Vektoren

pEGFP-N1 pEGFP-N1 ist ein 4,7 kb großer Expressionsvektor, der eine rot verschobene (versetzte) Variante des Wildtyp-GFP kodiert, dessen maximierte Anregung

bei 488 nm (Emissionsmaximum = 507nm) eine hellere Fluoreszenz erzeugt. Der Vektor besitzt eine Kozak Sequenz, wodurch eine Intensivierung der Translationseffizienz in eukaryontischen Zellen erreicht wird. Außerdem ist eine Kanamycinresistenz vorhanden.

pcDNA3.1 Der pcDNA3.1-Expressionsvektor (Abbildung 3.1), der Firma Invitrogen (Karlsruhe, D) hat eine Größe von 5,4 kb, wird in den Varianten (+) und (-) angeboten und eignet sich für die Transfektion von Säugerzellen. Die Varianten (+) und (-) unterscheiden sich in den Restriktionsschnittstellen der multiplen Klonierungsstelle. Der Vektor hat drei Promotoren, die eine hohe Expressionsrate des rekombinanten Proteins von Interesse gewährleistet (CMV-Promotor), eine *in vitro* Transkription für die mRNA-Synthese erlauben (T7-Promotor) und eine effiziente Expression der vorhandenen Neomycin-resistenzsequenz sichern (SV40-Promotor), falls eine Selektion von transfizierten Zellen erforderlich sein sollte. BGH pA und SV40 pA dienen einer effizienten Termination der Transkription und anschließender Polyadenylierung der mRNA. Ein pUC-Ursprung und ein Ampicillinresistenzgen gewährleisten eine Effiziente Replikation und Vektorselektion in *E.coli*.

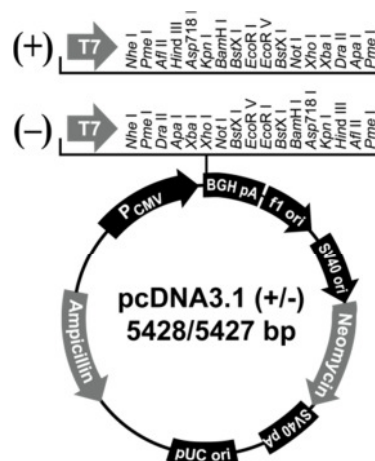


Abbildung 3.1 Vektorkarte pcDNA3.1 (+) und (-). Die HindIII und EcoRI-Schnittstellen kommen nur in der multiplen Klonierungsstelle des Vektors vor und können daher für cDNA-Insertionen genutzt werden (Invitrogen, Karlsruhe, D).

pFrog Der pFrog-Expressionsvektor hat eine Größe von 5,7 kb und ist eine Abwandlung des pcDNA3.1 (+)-Vektors. Er ist von Dr. W. Günther in der Arbeits-

gruppe von Prof. Dr. Dr. T. J. Jentsch (damals ZMNH, Hamburg, D) hergestellt worden. pFrog wird ebenfalls zur cRNA-Synthese verwendet und besitzt die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen des β -Globins aus *Xenopus laevis*.

pLNCX2

Der pLNCX2-Vektor (Abbildung 3.2) der Firma Clontech (Mountain View, CA) basiert auf dem Moloney-Maus-Leukämie Virus und dient zur retroviralen Transduktion von Säugerzellen (siehe Abschnitt 3.3.5.2). Virale Promotor- und Enhancersequenzen sind in den die Multiple Klonierungsstelle flankierenden LTR (*long terminal repeat*)-Regionen enthalten. Die LTR-Region gewährleistet außerdem die Transposition der inserierten DNA in das Wirtsgenom. Der Vektor enthält keine Virusstrukturgene (*gag*, *pol* und *env*), die für eine eigenständige Virusreplikation und -formation notwendig wären. Zur Herstellung eines vollständigen Virus ist die Transfektion des Vektors in eine Verpackungszelllinie erforderlich (z.B. Phönix). Der Vektor enthält ein Neomycinresistenzgen, das eukaryotische Zellen vor der Zerstörung durch hohe Konzentrationen an Geneticin (G418) schützt und somit als Selektionsmarker für die stabile Transfektion von Säugerzellen genutzt werden kann. Eine Ampicillinresistenz dient zur spezifischen Vektorvervielfältigung in *E.coli* Zellen.

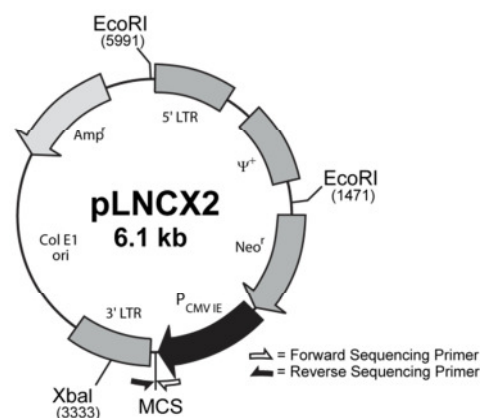


Abbildung 3.2: pLNCX2 Vektor der Firma Clontech (Mountain View, CA). Dient der retroviralen Transduktion von Säugerzellen.

pMOWS

Der pMOWS-Vektor ist eine Abwandlung des retroviralen pMX-Vektors, der ebenfalls auf dem Moloney-Maus-Leukämie Virus basiert (Ketteler et al,

2002) und wie der pLNCX2-Vektor dem retroviralen Gentransfer dient. pMOWS enthält eine Puromycinresistenz als Selektionsmarker für die stabile Transfektion in Säugerzellen und eine Ampicillinresistenz zur spezifischen Vektorvervielfältigung in *E.coli* Zellen.

pGL4

Der pGL4-Vektor der Firma Promega (Mannheim, D) wurde entwickelt, um Zellsignalwege durch die Expression Biolumineszenz-entwickelnder Reportergene zu studieren. In diesem Fall handelt es sich um die Expression des Luciferasegens des Leuchtkäfers *Photynus pyralis* oder der Seefeder *Renilla reniformis*. Als Reporter wird in der Regel die Luciferase des Leuchtkäfers (*firefly luciferase*) verwendet, wohingegen die Luciferase der Seefeder als interne Expressionskontrolle genutzt wird (Palomares et al, 1989; Sherf, 1996). In dieser Arbeit ist dem zu exprimierenden Renilla Luciferase Gen ein CMV-Promoter und dem Reportergen ein HSV-TK-Promoter vorangeschaltet. Eine konstitutive Expression, im Fall des zur Kontrolle genutzten Seefeder-Luciferasegens, wird durch das Fehlen sogenannter *responsive elements* gewährleistet. Im Fall des Reportergens (*firefly luciferase*) werden die *responsive elements* experimentspezifisch gewählt (Details siehe Abschnitt 3.5.11). Der Vektor enthält eine Ampicillinresistenz und kann mit unterschiedlichen Selektionsmarkern (Hygromycin, Neomycin, Puromycin) erworben werden.

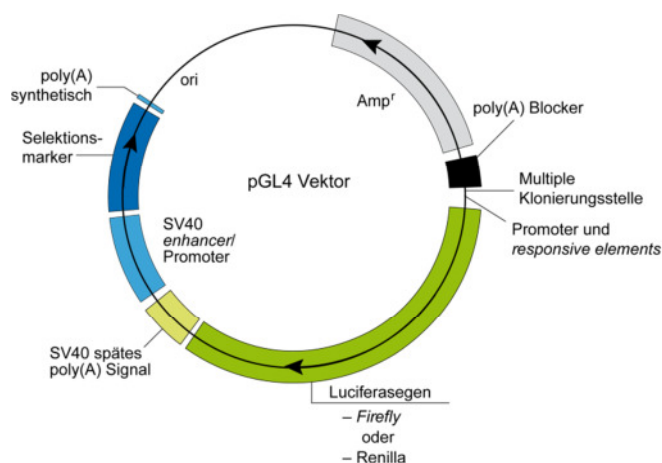


Abbildung 3.3: Darstellung des pGL4 Vektors der Firma Promega (Mannheim, D), der in dieser Arbeit zur Expression der Reportergen-Konstrukte Renilla- und Firefly-Luciferase genutzt wurde.

3.1.7 Plasmide

Tabelle 3.2: Plasmide

| Name | Resistenz | Herkunft |
|--|------------|-----------------------|
| pEGFP-N1 | Kanamycin | AG Schwake, Kiel |
| pLNCX2-EGFP-N1 | Ampicillin | AG Schwake |
| pFrog3 | Ampicillin | AG Schwake, Kiel |
| 56_pFrog-LIMP-2-myc | Ampicillin | AG Schwake, Kiel |
| 61_pFrog-LIMP-2-myc-ER | Ampicillin | AG Schwake, Kiel |
| 78_pFrog-hGC | Ampicillin | AG Schwake, Kiel |
| 111_pFrog-mGC | Ampicillin | AG Schwake, Kiel |
| 267_pcDNA3.1-hCathepsin D | Ampicillin | AG Braulke, Hamburg |
| 285_pFrog-hLIMP2-myc | Ampicillin | AG Schwake, Kiel |
| 293_pFrog-LIMP-2-Y222X-myc | Ampicillin | AG Schwake, Kiel |
| 294_pFrog-LIMP-2-H363K-myc | Ampicillin | Eigene Herstellung |
| 305_pFrog-LIMP-2-H363A-myc | Ampicillin | AG Schwake, Kiel |
| 318_pFrog-LIMP-2-H171A-myc | Ampicillin | Eigene Herstellung |
| 319_pFrog-LIMP-2-H171K-myc | Ampicillin | Eigene Herstellung |
| 321_pFrog-LIMP-2-H150K-myc | Ampicillin | Eigene Herstellung |
| 322_pFrog-LIMP-2-H150A-myc | Ampicillin | Eigene Herstellung |
| 337_pFrog-RenRez-HA | Ampicillin | AG Schwake |
| 347_pFrog-hLIMP-2-HisFreeAla-myc | Ampicillin | AG Schwake |
| 354_pFrog-hLIMP-2-HisFreePhe-myc | Ampicillin | AG Schwake |
| 359_pFrog-LIMP-2-H189A-myc | Ampicillin | Eigene Herstellung |
| 360_pFrog-LIMP-2-H189K-myc | Ampicillin | Eigene Herstellung |
| 370_pFrog-hLIMP-2-3XHisFreeAla-myc | Ampicillin | AG Schwake |
| 377_pFrog-hLIMP-2-3XHisFreeAla-A171H-myc | Ampicillin | AG Schwake |
| 382_pLNCX2-LIMP-2 | Ampicillin | AG Schwake |
| 395_pFrog-hLIMP2-H363K + L160P myc | Ampicillin | Eigene Herstellung |
| 397_pFrog-LIMP-2-HA | Ampicillin | Eigene Herstellung |
| 399_pFrog-LIMP-2-H171A-myc | Ampicillin | Eigene Herstellung |
| 400_pFrog-LIMP-2-H171K-myc | Ampicillin | Eigene Herstellung |
| pGL4-TOPflash | Ampicillin | Promega (Madison, US) |
| pGL4-FOPflash | Ampicillin | Promega (Madison, US) |
| pGL4-Renilla | Ampicillin | Promega (Madison, US) |

3.1.8 Antikörper

Tabelle 3.3: Primäre Antikörper

| Bezeichnung | erzeugt in | gerichtet gegen (Protein, Spezies) | WB- Verd. | IF-Verd. | Referenz/Quelle |
|-----------------------------|------------|--|--------------|----------|--|
| α -Actin | Kaninchen | Aktin Mensch, Maus | 1:2000 | | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| α - β -Catenin | Maus | β -Catenin Mensch, Maus | 1:1000 | | Karina Reiss, Kiel, D |
| α -CtsD | Kaninchen | Cathepsin D Mensch | | 1:500 | (Hentze et al, 1984) |
| α -ERGIC p53 | Maus | ERGIC p53 Mensch, Maus | | 1:250 | Enzo Lifescience, Lörrach, D |
| α -GC1341 | Kaninchen | β -Glukocerebro- sidase, Maus | | 1:25 | Dave Reczek Genzyme, Cambridge, US |
| α -GC4171 | Kaninchen | β -Glukocerebro- sidase, Maus | 1:500 | | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| α -GC8E4 | Maus | β -Glukocerebro- sidase, Mensch | 1:500 | 1:1000 | Hans Aerts, Academic Medical Center Amsterdam, NL |
| α -GAPDH | Kaninchen | Glycerin-Aldehyd- 3-Phosphat- Dehydrogenase, Säuger | 1:500 | | |
| α -GM 130 | Maus | Golgi- Membranprotein 130 kDa Mensch, Maus | | 1:50 | BD Bioscience, Heidelberg, D |
| α -HA (3F10) | Ratte | Haemagglutinin (Influenza) | 1:1000 | 1:1000 | Roche, Mannheim |
| α -KDEL | Maus | ER- Retentionssignal Säuger, Vögel | | 1:400 | Biomol, Hamburg, D |
| α -LAMP-2-H4B4 | Maus | LAMP-2 Mensch | | 1:50 | DSHB, Iowa, US |
| α -LIMP-1 #19 | Kaninchen | LIMP-1 Maus | | 1:200 | Haag, Nolte, Hamburg, D |
| α -L2T2 | Kaninchen | LIMP-2 Mensch, Maus | 1:1000 | 1:1000 | Pineda, Berlin, D |
| α -myc-9B11 | Maus | c-myc (Transkrip- tionsfaktor) | 1:500 | 1:500 | Cell Signaling, Boston, US |
| α -myc-GTX | Ziege | c-myc (Transkrip- tionsfaktor) | | 1:500 | Genetex, Cambridge, UK |

| Bezeichnung | erzeugt in | gerichtet gegen (Protein, Spezies) | WB-Verd. | IF-Verd. | Referenz/Quelle |
|---------------------|------------|------------------------------------|----------|----------|--|
| α -PDI-Sc | Kaninchen | Protein-Disulfid-Isomerase, Säuger | | 1:50 | Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, US |
| α -PRR-X | Kaninchen | (Pro)Renin Rezeptor Maus | 1:100 | | Pineda, Berlin, D |
| α -TfR | Maus | Transferrin Rezeptor, Säuger | 1:500 | | |
| α -Ubiquitin | Maus | Ubiquitinierte Proteine | | 1:500 | Sigma Aldrich, Steinheim, D |

Tabelle 3.4: Sekundäre Antikörper

| Name | erzeugt in | gerichtet gegen | WB-Verd. | IF-Verd. | Referenz/Quelle |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|----------|----------|--------------------------|
| α -Kaninchen-HRP | Schaf | Kaninchen IgG | 1:10000 | | Dianova GmbH, Hamburg, D |
| α -Maus-HRP | Schaf | Maus IgG | 1:10000 | | Dianova GmbH, Hamburg, D |
| α -Ratte-HRP | Kaninchen | Ratte IgG | 1:10000 | | Dianova GmbH, Hamburg, D |
| α -Kaninchen Alexa Fluor 488 | Affe oder Ziege | Kaninchen IgG | | 1:500 | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| α -Kaninchen Alexa Fluor 594 | Affe oder Ziege | Kaninchen IgG | | 1:500 | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| α -Maus Alexa Fluor 488 | Affe oder Ziege | Maus IgG | | 1:500 | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| α -Maus Alexa Fluor 594 | Affe oder Ziege | Maus IgG | | 1:500 | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| α -Ratte Alexa Fluor 488 | Affe oder Ziege | Ratte IgG | | 1:500 | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| α -Ratte Alexa Fluor 594 | Affe oder Ziege | Ratte IgG | | 1:500 | Invitrogen, Karlsruhe, D |

3.1.9 Zelllinien

Tabelle 3.5: Zelllinien

| Zelllinie | Eigenschaft | Referenz |
|------------------------------------|---|---|
| COS-7 | Nierengewebszellen der grünen Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>), SV-40-immortalisiert | DMSZ, Braunschweig, D |
| HeLa | Humane Zervix-Karzinom Zellen, isoliert von Frau Henrietta Lacks 1951 | DMSZ, Braunschweig, D |
| Hek 293 | Humane Nierengewebszellen, Adenovirus-immortalisiert | ATCC, Wesel, D |
| Phönix-Eco | Hek 293T Zellen, die stabil retrovirale Hüllproteine exprimieren | DKFZ, Heidelberg, D, (Pear et al, 1993) |
| L-Cell | Murine Fibroblasten | Madelon Maurice, CMC Utrecht, NL |
| Wnt-3a | Murine Fibroblasten, stabil mit einem Wnt-3a Expressionsvektor transfiziert, Zeomycin-Selektionsmarker | Madelon Maurice, CMC Utrecht, NL |
| LIMP-2 ^{-/-} E5 | LIMP-2-defiziente murine embryonale Fibroblasten, spontan immortalisiert | Cathrin Clauss, AG Saftig, Kiel |
| 583-3 | Murine embryonale Fibroblasten, spontan immortalisiert | (Schröder, 2008) |
| LIMP-2 ^{-/-} 583-2 | LIMP-2-defiziente murine embryonale Fibroblasten, spontan immortalisiert | (Schröder, 2008) |
| LIMP-2 ^{-/-} 583-2 Rescue | LIMP-2-defiziente murine embryonale Fibroblasten, spontan immortalisiert. Stabil mit retroviralem LIMP-2-Expressionsvektor transfiziert | Eigene Herstellung (retroviral) |
| 583-3-PRR-HA | Murine embryonale Fibroblasten, spontan immortalisiert, stabil mit retroviralem (Pro)Renin Rezeptor-HA Expressionsvektor transfiziert | Miriam Wagner (retroviral), AG Saftig, Kiel |
| LIMP-2 ^{-/-} 583-2-PRR-HA | LIMP-2-defiziente murine embryonale Fibroblasten, spontan immortalisiert, stabil mit retroviralem (Pro)Renin Rezeptor-HA Expressionsvektor transfiziert | Miriam Wagner (retroviral), AG Saftig, Kiel |

3.1.10 Puffer, Lösungen und Nährmedien

Tabelle 3.6: Puffer, Lösungen und Nährmedien (alphabetisch)

| Name | Rezept |
|--|--|
| β-Glukocerebrosidase-Substrat | 10 mM 4-Nitrophenyl β-D-glucopyranoside 0,2 M Citratpuffer |
| Biotinlösung | 1μg EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin add 1 ml PBS-CM |
| Biotinylierungspuffer | 50 mM Tris 150 mM NaCl 1% Triton X-100 0,1 % SDS 1x <i>complete</i> Proteaseinhibitor |
| Blockierlösung, <i>Blotto</i> , für Westernblot | 1 x TBS-T 5 % Milchpulver |
| Blockierungslösung, für Ko-Immuno- präzipitation und Immunfluoreszenz | 1x PBS 1-3 % BSA |
| Citratpuffer | 0,2 M Natriumcitrat 0,04 % NaN ₃ 0,2 % BSA pH 4,6 |
| DABCO-Stammlösung | 1x PBS 200 mg/ml Diazobicyclooctan |
| EBC-Puffer | 120 mM NaCl 50 mM Tris/HCl 1 % NP-40 1x <i>complete</i> Proteaseinhibitor pH 7,4 |
| Einbettungsmittel | 1x PBS 17 % Mowiol 33 % Glycerol 50 mg/ml DABCO (1μg/ml DAPI) |
| Einfriermedium (Zellkultur) | 1 % Penicillin/ Streptomycin 20 % DMSO 30 % FCS in DMEM <i>high Glucose</i> |
| 10x Elektrodenpuffer | 144,13g Glycin 30,29 g Tris 100 ml 10 %-iges SDS in H ₂ O ad 1000ml ddH ₂ O |

3 Material und Methoden

| Name | Rezept |
|--|--|
| Endo H-Puffer | 100 mM Natriumcitrat 0,1 % 2-Mercaptoethanol 1 % SDS 1 x Proteaseinhibitor ddH2O pH 5,5 |
| LB-Medium | 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 | 10 g Trypton/Pepton aus Casein 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl in 950 ml ddH2O dest. lösen, pH 7,0 15 g Agar-Agar ad 1000 ml ddH2O nach dem Autoklavieren auf 65° C abkühlen lassen und in 10 cm-Schalen gießen |
| Lysispuffer | 1x PBS 1,0 % Triton X-100 1x <i>complete</i> Proteaseinhibitor pH 7,4 |
| Mowiol-Lösung (1 ml Aliquots bei -20° C lagern) | 40 ml PBS 10 g Mowiol 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 |
| 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS | 1x PBS 4% Paraformaldehyd |
| 10x PBS-Stammlösung | 80 g NaCl 11,5 g Na2HPO4 (wasserfrei) 2 g KCl 2 g KH2PO4 ad 1000 ml ddH2O pH 7,4 |
| PBS-CM | 1x PBS 0,1 mM CaCl ₂ 1 mM Mg Cl ₂ |

3 Material und Methoden

| Name | Rezept |
|---|---|
| PNGase F-Puffer | 50 mM Na ₃ PO ₄ 1 % SDS 1 % 2-Mercaptoethanol 1x Complete Proteaseinhibitor pH 7,8 |
| Quenschingspuffer | 50 mM Tris PBS-CM pH 8,0 |
| Sammelgel (für 4x 1,5 mm-Gel des Mini Protean Systems) | 1,35 ml Sammelgelpuffer 1,75 ml 30 %-iges Acrylamid mit 0,8 % Bisacrylamid (37,6 : 1) 6,75 ml ddH ₂ O 60 µl 10 %-iges APS 30 µl 100 %-iges Temed |
| Sammelgelpuffer | 30,28 g Tris/HCL 2 g SDS ad 500 ml ddH ₂ O pH 6,8 |
| 5x SDS-PAGE Probenauftragspuffer (für reduzierenden Puffer: 100-200 mM Dithiothreitol Endkonzentration einstellen) | 2,5 ml Tris/HCl pH 6,8 1 g SDS 2,5 ml ddH ₂ O 0,05 g Bromphenolblau 5 ml 100 %-iges Glycerol, am Ende dazu geben |
| Stopplösung | 0,4 M Glycin/NaOH pH 10,4 |
| <i>Stripping</i> -Puffer | 20 ml 10 %-iges SDS in ddH ₂ O 6,25 ml 1 M Tris/HCl, pH 6,8 0,83 ml 2-Mercaptoethanol 73 ml ddH ₂ O |
| 50x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) | 242 g Tris 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA ad 1000ml ddH ₂ O pH 8,0 |
| <i>Transfer</i> puffer, Westernblot | 20 mM Tris 1,6 M Glycin 20 % Methanol pH 8,3 |

| Name | Rezept |
|---|--|
| Trenngel (exemplarisch 12,5 % Acrylamid, für ein 1,5 mm-Gel des Mini Protean Systems) | 2,6 ml Trenngelpuffer 4,2 ml 30 %-iges Acrylamid mit 0,8 % Bisacrylamid (37,6 : 1) 3,1 ml ddH ₂ O 60 µl 10 %-iges APS 30 µl 100 %-iges Temed ml 1x TBS |
| Trenngelpuffer | 90,85 g Tris/HCl 2 g SDS ad 500 ml ddH ₂ O pH 8,8 |
| 10x TBS-Stammlösung | 48,72 g Tris 40 ml 0,5 M EDTA 163,6 g NaCl add 2000 ml pH 7,5 |
| TBS/T | 1000 µl Tween-20 pro 1000 ml ddH ₂ O |
| Zellkulturmedium (Standard) | 500 ml DMEM <i>high Glucose</i> 50 ml FCS 5 ml Penicillin/ Streptomycin |
| Zellkulturmedium (IMEM) | 90 ml Zellkulturmedium (Standard) 10 ml FCS 0,35 µl β-Mercaptoethanol (50 µM) |

3.1.11 Verwendete Computer Software

Tabelle 3.7: Computer Software

| Bezeichnung | Referenz / Quelle |
|------------------------|---|
| Adobe Photoshop | Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA |
| Adobe Illustrator | Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA |
| DNASTAR Lasergene 8 | Lasergene, Madison, WI, US |
| EndNoteX4 | Thomson Reuters, Carlsbad, CA |
| Excel | Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA |
| Fluo View 1000 ASW 3.0 | Olympus, Hamburg, D |
| Image J | http://rsbweb.nih.gov/ij/ |
| Powerpoint | Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA |
| Word | Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA |

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* PCR) dient der Amplifizierung genau definierter Bereiche einer DNA-Sequenz (Matrize). Für dieses Verfahren benötigt man Oligonukleotidprimer, die diese Matrize flankieren und als Ansatzstellen für die DNA-Polymerase dienen. Dabei setzt der sogenannte *hin*-Primer am *antisense*- und der *rück*-Primer am *sense*-Strang des zu amplifizierenden Stückes an. Die DNA-Polymerase katalysiert daraufhin die 5'-3'-Synthese des neuen Strangs. Für Klonierungs- und Fusions-PCRs wurde in dieser Arbeit die *Pfu*-Polymerase mit ihrer 3'-5'-Exonukleaseaktivität eingesetzt.

In der, einem *Thermocycler* nachempfundenen, PCR-Maschine wird die DNA in 25-40 Zyklen vermehrt. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten. Während der Denaturierung bei 94-95°C wird die doppelsträngige DNA zunächst in ihre Einzelstränge zerlegt. Im nächsten Schritt, dem *Annealing*, lagern sich die Primer bei ungefähr 55-59°C an die Matrize an. Um eine spezifische Primerbindung zu erreichen, wurde die *Annealing*-Temperatur 2-5°C unterhalb der Schmelztemperatur des Primers gewählt. Die Schmelztemperatur eines Primers lässt sich anhand der Nukleotide mit der Formel: $2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$ berechnen. Auf das *Annealing* folgt die Elongation der Stränge bei 72°C. Ab Zyklus drei geht die PCR in die Amplifizierungsphase der Matrize über, da die Primer die Flanken definiert haben.

3.2.1.1 Klonierungs-PCR

Bei der Klonierungs-PCR sollen Amplifikationsprodukte entstehen, die in einen Klonierungsvektor inseriert werden können. Deshalb wird die Matrize mit Primern amplifiziert, die neben der *Annealing*sequenz auch die Sequenz eines Restriktionsenzym enthalten. Herkömmliche Klonierungs-PCRs wurden in dieser Arbeit nach folgendem Standardrezept pipettiert (Tabelle 3.8), und es wurde das in Tabelle 3.9 gezeigte PCR-Programm verwendet.

Tabelle 3.8: 1x PCR-Ansatz

| Substanz | Volumen [μ l] |
|----------------------------------|--------------------|
| H ₂ O | 33,0 |
| 10x <i>PFU</i> -Polymerasepuffer | 5,0 |
| dNTPs | 4,0 |
| DMSO | 2,5 |
| <i>hin</i> -Primer (10 μ M) | 2,0 |
| <i>rück</i> -Primer (10 μ M) | 2,0 |
| Matrize (50 ng/ μ l) | 1,0 |
| <i>PFU</i> - Polymerase | 0,5 |

Tabelle 3.9: Standard-PCR Programm

| Temperatur [$^{\circ}$ C] | Zeit [min] | Zyklen |
|----------------------------|------------|--------|
| 95,0 | 5,0 | |
| 95,0 | 0,5 | 36-40 |
| 55,0-59,0 | 0,5 | |
| 72,0 | 1,5 | |
| 72,0 | 5,0 | |
| 10,0 | ∞ | |

3.2.1.2 Fusions-PCR

Bei der Fusions-PCR handelt es sich um eine zweiteilige Klonierungs-PCR, die der Insertion von Mutationen in die Zielsequenz dient. Der erste Teil (PCR-1) besteht aus zwei Ansätzen, wobei zwei PCR-Produkte entstehen, die sich gegenseitig überlappen. Dabei wird in beiden PCR-Ansätzen je einer der Primer mit der Mutation (B bzw. C) und dem überlappenden Sequenzanteil versehen. Im zweiten Teil erfolgt die eigentliche Fusion der beiden sich überlappenden Elemente. Hier werden die Produkte aus den 2 PCR-1-Ansätzen mit den flankierenden Primern (A und D) aus den beiden PCR-1-Ansätzen in einem gemeinsamen PCR-Ansatz (Fusion) amplifiziert. Die exemplarischen Fusions-PCR-Ansätze sind in den Tabellen 3.10-3.12 dargestellt; in Abbildung 3.4 ist der gesamte Ablauf bildlich verdeutlicht.

Tabelle 3.10: PCR-1 (Ansatz 1)

| Substanz | Volumen [μ l] |
|------------------------------------|--------------------|
| H ₂ O | 33,0 |
| 10x <i>pfu</i> -Polymerasepuffer | 5,0 |
| dNTPs | 4,0 |
| DMSO | 2,5 |
| <i>hin</i> -Primer A (10 μ M) | 2,0 |
| <i>rück</i> -Primer B (10 μ M) | 2,0 |
| Matrize (50 ng/ μ l) | 1,0 |
| <i>pfu</i> - Polymerase | 0,5 |

Tabelle 3.11: PCR-1 (Ansatz 2)

| Substanz | Volumen [μ l] |
|------------------------------------|--------------------|
| H ₂ O | 33,0 |
| 10x <i>pfu</i> -Polymerasepuffer | 5,0 |
| dNTPs | 4,0 |
| DMSO | 2,5 |
| <i>hin</i> -Primer C (10 μ M) | 2,0 |
| <i>rück</i> -Primer D (10 μ M) | 2,0 |
| Matrize (50 ng/ μ l) | 1,0 |
| <i>pfu</i> - Polymerase | 0,5 |

Tabelle 3.12: PCR-2 (Fusion)

| Substanz | Volumen [µl] |
|----------------------------------|--------------|
| H2O | 20,0 |
| 10x <i>pfu</i> -Polymerasepuffer | 5,0 |
| dNTPs | 4,0 |
| DMSO | 2,5 |
| PCR-1 Ansatz 1 Produkt | 7,0 |
| PCR-1 Ansatz 2 Produkt | 7,0 |
| <i>hin</i> -Primer A (10µM) | 2,0 |
| <i>rück</i> -Primer D (10µM) | 2,0 |
| <i>pfu</i> - Polymerase | 0,5 |

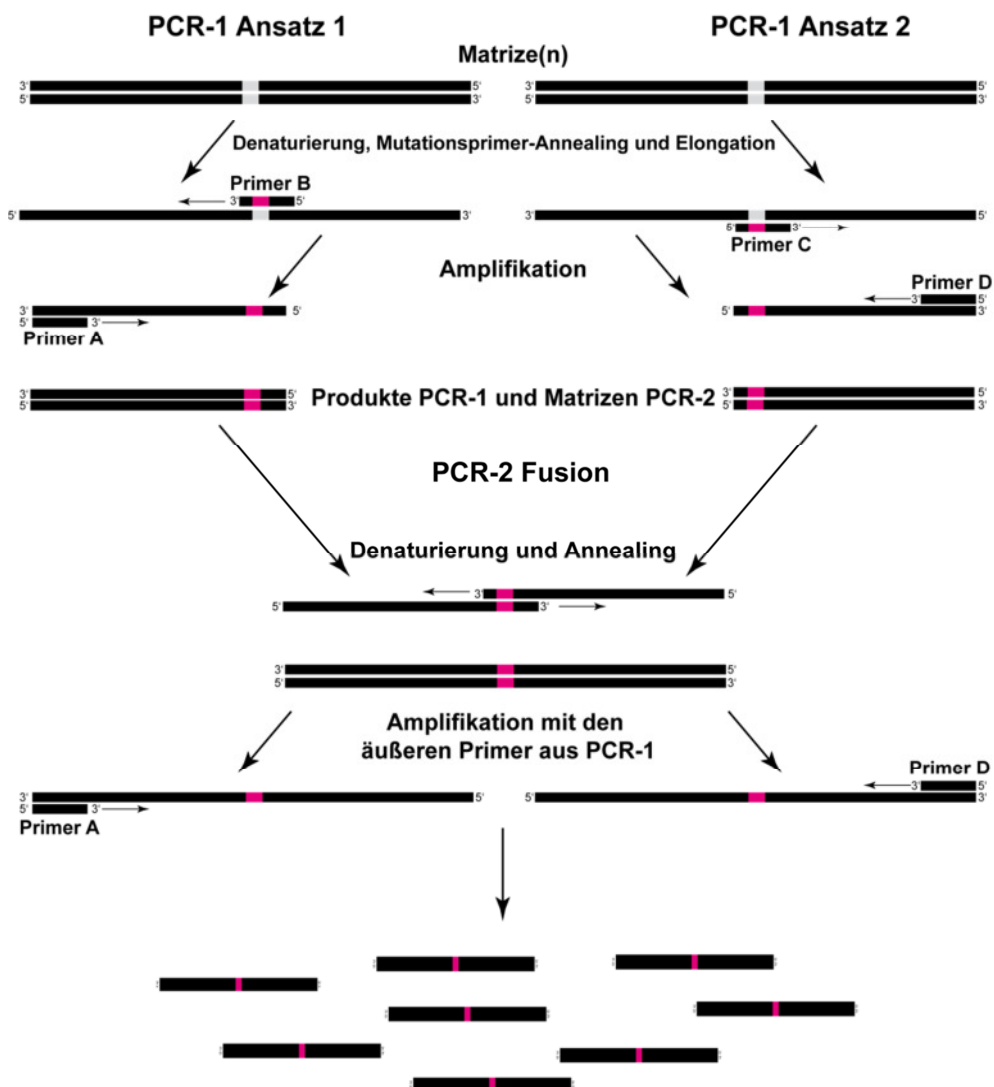


Abbildung 3.4: Fusions-PCR. Die zu mutierende Sequenz innerhalb der Matrize ist grau markiert. Die in die Primer B und C eingebaute Mutation ist in roter Farbe dargestellt (nähere Informationen sind im Text erklärt).

3.2.1.3 Nested-PCR

Bei der *Nested-PCR* handelt es sich um ein sehr empfindliches PCR-Verfahren, das unter anderem zum Test auf *Mycoplasmen* (Abschnitt 3.2.1.4) in der Säugerzellkultur Anwendung findet. In der ersten PCR-Reaktion wird durch das gegebene Primerpaar eine spezielle Sequenz aus der genomischen DNA vordefiniert. Um unspezifische Amplifikate zu eliminieren, wird in einer zweiten PCR-Reaktion die Matrize aus der ersten Reaktion verwendet. Innerhalb der, vom ersten Primerpaar flankierten, Sequenz bindet nun das zweite Primerpaar und verifiziert die Amplifikation.

3.2.1.4 *Mycoplasmen-PCR*

Mycoplasmen sind die kleinsten, noch zur selbständigen Vermehrung befähigten Lebewesen. Diese, zum Stamm der *Bacteria* gehörende, Gattung kann auf Grund ihrer geringen Größe von ca. 500 nm Zellwände passieren und Säugerzellkulturen infizieren (Rawadi & Dussurget, 1995). Da eine Infektion nicht anhand äußerlicher Veränderungen der Zellkultur festgemacht werden kann, wurde regelmäßig ein, auf der *Nested-PCR* (Abschnitt 3.2.1.3) basierender, *Mycoplasmen-Test* durchgeführt. Die verwendeten Primer (Tabelle 3.1) waren spezifisch für eine Vielzahl von *Mycoplasmen*-Stämmen (Uemori et al, 1992).

Für die Probenaufbereitung wurden 200µl des Mediums, der seit zwei Tagen wachsenden und zu untersuchenden Zellen, 5 min bei 95°C erhitzt. Dabei wurden die Zellen aufgeschlossen. Nach 1-minütiger Zentrifugation bei 4000 rpm wurde 1µl des Überstands als Matrize für PCR 1 (Tabelle 3.13 und 3.14) verwendet. Dabei wurden die Primer MYCF1 und MYCR1 (Tabelle 3.1) eingesetzt. Als Positivkontrolle diente ein PCR-Ansatz mit *Mycoplasmen*-infiziertem Medium und als Negativkontrolle ein PCR-Ansatz ohne Matrize. Im Anschluss wurden die Amplifikate aus PCR 1 als Matrize für PCR 2 (Tabelle 3.13 und 3.14) eingesetzt, wobei die Primer MYCF2 und MYCR2 (Tabelle 3.1) verwendet wurden. In einer folgenden Gelauf trennung (Abschnitt 3.2.2) wurde das Amplifikat aus PCR 2 gegen Positiv- und Negativkontrolle aufgetragen. Positiv getestete Zellen wurden entweder entsorgt oder mit dem *Mycoplasma Removal Agent* der Firma MP Biomedicals (Solon, US), nach Angaben des Herstellers, behandelt.

Tabelle 3.13: PCR-Ansatz 1 und 2

| Substanz | Volumen [μ l] |
|----------------------------------|--------------------|
| H ₂ O | 36,5 |
| 10x <i>Taq</i> -Polymerasepuffer | 5,0 |
| dNTPs | 4,0 |
| <i>hin</i> -Primer (10 μ M) | 2,0 |
| <i>rück</i> -Primer (10 μ M) | 2,0 |
| Matrize | 1,0 |
| MgCl ₂ | 1,0 |
| <i>Taq</i> - Polymerase | 0,5 |

Tabelle 3.14: *Mycoplasmen*-PCR

| Temperatur [°C] | Zeit [min] | Zyklen |
|-----------------|------------|--------|
| 94,0 | 3,0 | |
| 94,0 | 0,5 | |
| 55,0 | 2,0 | 25 |
| 72,0 | 1,0 | |
| 72,0 | 5,0 | |
| 10,0 | ∞ | |

3.2.2 Agarosegelelektrophorese

Um Nukleinsäuren bezüglich ihrer Größe aufzutrennen, wurden agarosehaltige Gele verwendet. Diese bestanden aus 1 x TAE-Puffer (Abschnitt 3.1.10), versetzt mit 1-2 % Agarose. Durch Erhitzen und anschließendes Erkalten entstand ein poredurchsetztes Gel, welches vor dem Erstarren noch mit einer Ethidiumbromid-Lösung versetzt wurde (Endkonzentration 1 μ g/ml). Ethidiumbromid ist ein DNA-interkalierendes Molekül (Pohl et al, 1972), welches durch UV-Licht angeregt wird und die aufgetragene DNA im Gel sichtbar macht. Vor Beladen des Gels wurden die Proben mit 6 x Ladepuffer (Fermentas) versehen und als Referenz ein DNA-Marker aufgetragen (1kb DNA-*Ladder*, Fermentas). Negativ geladene DNA wandert im Gel durch Anlegen einer Spannungsquelle von 100–140 V zum Pluspol und passiert, je nach Größe, mehr oder weniger schnell die Poren des Gels. Zum Weiterverarbeiten der DNA wurden die im Gel aufgetrennten Banden ausgeschnitten und mit dem *High Pure PCR Purification Kit* (Roche, Mannheim) nach Anweisungen des Herstellers aufgereinigt.

3.2.3 Klonierungstechniken

3.2.3.1 Restriktionsverdau

Viele Bakterien haben einen natürlichen Abwehrmechanismus gegenüber Bakteriophagen; sie besitzen sogenannte Restriktionsenzyme. Diese sind in der Lage, die DNA des Eindring-

lings zu zerschneiden. In der Molekularbiologie werden meistens die Restriktionsendonukleasen Typ II verwendet, da sie sehr spezifisch in kurzen und meist palindromischen Sequenzen schneiden. So können sie in Klonierungs-Experimenten zum sequenzspezifischen Verdau von DNA verwendet werden. Die Enzymnamen setzen sich aus dem Namen des Wirtsbakteriums und der chronologischen Reihenfolge ihrer Entdeckung zusammen (z.B.: erstes in *Escherichia coli* entdeckte Enzym = *EcoRI*).

Pro Verdauungsansatz wurden 40-43 µl PCR-Produkt oder 1-2 µg zu verdauende DNA in einem Endvolumen von 50 µl eingesetzt. Pufferart und Enzymmenge, sowie optimale Verdauungstemperatur und -dauer wurden den Angaben des Herstellers (Fermentas, St. Leon, D) entnommen. Als Endprodukte entstanden DNA-Fragmente mit glatten (*blunt*) oder überhängenden (*sticky*) Enden. Im Anschluss wurde die DNA im Gel aufgetrennt, ausgeschnitten und aufgereinigt.

3.2.3.2 Dephosphorylierung

Um nach dem Restriktionsverdau zirkulärer Plasmid-DNA deren spontane Religation zu vermeiden, wurde die Dephosphorylierung des freien 5'-Phosphatendes mittels FastAP (*fast alkaline phosphatase*, Fermentas, St. Leon, D) erreicht. 1 µg verdaute DNA wurde hierbei mit 1 µl FastAP für 15 min bei 37°C inkubiert.

3.2.3.3 Ligation

Zum Verknüpfen von DNA-Fragmenten, z.B. mit einem Plasmidvektor, wurden die freien 3'- mit den freien 5'-Enden nach definiertem Restriktionsverdau mit Hilfe einer T4-DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon, D) verbunden. Dieses Enzym wird aus dem entsprechenden Gen des Bakteriophagen T4 durch Klonierung in *E. coli* rekombinant gewonnen. Pro Ligationsansatz wurden zu 7 µl DNA-Fragment (bzw. H₂O im Kontrollansatz) 1 µl Vektor-DNA, 1 µl T4 DNA-Ligase und 1 µl Ligasepuffer verwendet. Der Ligasepuffer enthält unter anderem das für die energieverbrauchende DNA-Verknüpfung benötigte ATP. Die Ligation wurde durch Inkubationen über Nacht bei 17°C, 15 min bei 37°C oder mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur erreicht. Durch 10-minütige Inkubation bei 65°C wurde die Ligase inaktiviert.

3.2.3.4 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

Auf einer mit 50 µl Tetrazyklin (20µg/ml) bestrichenen LB-Platte wurden *E.coli XL-1-Blue* Zellen mit einer Impföse fraktioniert aufgetragen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurden 50 ml LB-Medium mit 50 µl Tetrazyklin versetzt und mit einem Klon von der Platte angeimpft. Die anschließende Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C im Schüttler. Mit 20 ml dieser Vorkultur wurden am nächsten Tag 1 Liter LB-Medium angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 wachsen gelassen. Anschließend wurde die Kultur auf 4 x 250 ml portioniert und für 15 min bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets auf Eis in je 10 ml eiskaltem bidestilliertem Wasser resuspendiert. Danach erfolgte eine Aufkonzentration von 4 auf 2 Portionen. Die folgenden Arbeitsschritte wurden weiterhin auf Eis durchgeführt. Die 2 Portionen wurden mit 250 ml eiskaltem bidestilliertem Wasser aufgefüllt und 15 min bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet ein weiteres Mal in 10 ml eiskaltem bidestillierten Wasser resuspendiert und mit 250 ml bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Im Anschluss wurde erneut nach den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets in je 10 ml 10 %iger durch einen Schauerfilter steril filtrierter Glycerinlösung aufgenommen und die Suspensionen in zwei 50 ml *Falcon*-Röhrchen überführt. Weitere jeweils 40 ml der Glycerinlösung wurden zur Spülung der Zentrifugenbehälter genutzt, um sie im Anschluss ebenfalls in die *Falcon*-Röhrchen zu überführen. Die Proben wurden in einer passenden Zentrifuge 20 min bei 0°C und 3200 rpm zentrifugiert, der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und die Pellets in je 2 ml der übrigen Glycerinlösung resuspendiert. Die Suspension wurde in Portionen von je 50 µl auf 1,5 ml Eppendorfgefäße verteilt und bei –80°C weggefroren.

3.2.3.5 Transformation elektrokompetenter *E. coli* mittels Elektroporation

Um Plasmidvektoren zu vervielfältigen, wurde der *E. coli* Klonierungsstamm *XL1blue* verwendet. 50 µl elektrokompetente, bei –80°C gelagerte Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit 1 µl Ligationsansatz versetzt (50-500 ng DNA). Danach wurden die Zellen in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und bei 25 µFD Kapazität, 2,5 kV Spannung sowie einem Widerstand von 200 Ω im *Genepulser* (BioRad, München) elektroporiert.

Die sich ergebenden Zeitkonstanten sollten zwischen 8,0-9,0 ms liegen. Sofort nach erfolgter Elektroporation wurden 1 ml LB-Medium zugesetzt und die Zellen für mindestens 30 min bei 37°C zur Expression der im Plasmid enthaltenen Selektionsmarker (z.B. Ampicillin- oder Kanamycinresistenzgene) und der allgemeinen Regeneration auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Danach folgte ein 5-minütiger Zentrifugationsschritt bei 5000 rpm. Der Überstand wurde bis auf maximal 100 µl verworfen und das Pellet im übrigen Medium resuspendiert, um es auf antibiotikahaltigen Selektivnährböden (50 mg/l Ampicillin bzw. 30 mg/l Kanamycin) auszuplattieren. Es folgte die Inkubation der Platten bei 37°C im Brutschrank über einen Zeitraum von 12-16 Stunden.

3.2.3.6 Plasmidamplifikation und –aufreinigung

Als Basis für die Plasmidamplifikation dienten die auf Selektivnährböden gewachsenen Klone oder retransformierte Plasmid-DNA einer Stocklösung. Die Klone wurden mit einem abgeflamten Zahnstocher gepickt und jeweils in 3 ml antibiotikahaltigem LB-Medium aufgenommen, wohingegen die retransformierten Zellen komplett in 100 ml antibiotikahaltiges LB-Medium überführt wurden. Das Wachstum erfolgte bei 37°C und 2500 rpm im Horizontalschüttler über einen Zeitraum von 12-16 Stunden. Die Aufreinigung wurde nach Anleitung des *Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas, St. Leon-Rot, D) bzw. des *PureYield Plasmid Midiprep System* (Promega, Mannheim) durchgeführt.

Für eine DNA-Konzentrationsbestimmung wurden aus der aufgereinigten Plasmid-DNA-Lösung 3 µl entnommen und mit Hilfe des Biotek-Mikroplattenlesers (Biotek Instruments, Bad Friedrichshall, D) auf ihre DNA-Konzentration bestimmt (Abschnitt 3.2.4).

3.2.3.7 Klonierung spezieller LIMP-2-Konstrukte

Die hier verwendeten Expressionsplasmide der murinen und humanen LIMP-2-myc-Konstrukte des Wildtyps (Blanz et al, 2010; Reczek et al, 2007) wurden als Basis zur Erstellung der LIMP-2-Punktmutanten verwendet. Zur Einführung der Punktmutationen wurden Fusions-PCR-Protokolle mit den in Tabelle 3.1 aufgeführten Klonierungsprimern, sowie den pFrog-Vektor-Primern pF3r und pFrog-hin erstellt. Um die PCR-Produkte in den pFrog-Vektor zu überführen, wurden sie einem Restriktionsverdau mit Hind III und Bam HI (Fermentas, St. Leon-Rot, D) unterzogen und mit einem, ebenso verdauten und zusätzlich mit FastAP (Fermentas, St. Leon-Rot, D) dephosphorylierten, Vektor ligiert.

Für die Herstellung der Histidin freien LIMP-2-Mutanten wurde eine LIMP-2-Nukleotidsequenz bei der Firma Geneart (Regensburg, D) bestellt, deren histidinkodierende Basentriplets zu alanin- oder phenylalaninkodierenden ausgetauscht worden waren. Das etwa 1000 bp umfassende Sequenzstück wurde zunächst in einen, humanes LIMP-2 enthaltenden pTLN-Vektor kloniert, nachdem sowohl Sequenz als auch Vektor mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und BamHI verdaut worden waren. Nach einer weiteren Umklonierung, in den, für alle verwendeten LIMP-2-Konstrukte genutzten pFrog-myc-Vektor, wurde das LIMP-2-HisFree-Ala-myc-Konstrukt für die Herstellung einer Chimäre aus humanem Wildtyp-LIMP-2 und der Mutante verwendet. Hiefür wurde ein Restriktionsverdau mit den Enzymen Bsp1407I und HindIII durchgeführt. Nach erfolgter Ligation wurde das erhaltene, in den Histidinresten 150, 171, 189 und 257 zu Alanin mutierte, LIMP-2-4xHisFree-Ala-Konstrukt unter Verwendung der Fusions-PCR-Methode zunächst im Rest 257 wieder zu einem Histidin mutiert. Das erhaltene LIMP-2-3xHisFree-Ala-Konstrukt wurde im letzten Schritt erneut einer Fusions-PCR unterzogen, um auch den Rest an Position 171 wieder in ein Histidin umzuwandeln.

3.2.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Bei der Konzentrationsbestimmung von DNA macht man sich das charakteristische Absorptionsspektrum von Nukleinsäuren zwischen 250 und 280 nm mit einem Absorptionsmaximum von 260 nm zu Nutze. Die Extinktion beschreibt die Absorptivität eines Materials (zum Beispiel DNA) bei einer bestimmten Wellenlänge: $E_{\lambda} = -\lg(I_1 / I_0) = \epsilon_{\lambda} \times c \times d$ (E: Extinktion [nm]; I_0 : einfallende Strahlung; I_1 : austretende Strahlung; ϵ_{λ} : Extinktionskoeffizient; c: Konzentration [g/l]; d: Schichtdicke [cm]). Sie entspricht bei einem Absorptionsmaximum von 260 nm $A_{260} = 1$ einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$. Zur Bestimmung der Reinheit wird der Quotient A_{260} / A_{280} gebildet, wobei ein Wert zwischen 1,8-2,0 für eine geringe Kontamination der Probe z.B. mit Protein spricht.

3.2.5 Sequenzierung

Um rekombinant hergestellte DNA auf ihre genaue Sequenz hin überprüfen zu lassen, wurde die Plasmid-DNA-Lösung auf eine Konzentration von 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt und in einem Volumen von 20 μl , das für maximal 8 Sequenzierungsreaktionen reichte, an die Firma GATC-

Biotech (Konstanz, D) geschickt. Ebenso eingeschickt wurden die für die Sequenzierung notwendigen Oligonukleotidprimer. Diese wurden nach Möglichkeit so gewählt, dass sie maximal 600 bp auseinanderlagen, um eine lückenlose Sequenzierung zu gewährleisten. Die Sequenzierung erfolgte mit dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger und wurde mit der *SeqMan-Software* von *DNASTAR* ausgewertet.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung von Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C und einer Wasserdampfatmosphäre mit einem 5 %igen CO₂-Gehalt gelagert. Die Zellkultivierung erfolgte jeweils auf dem Boden einer 60 cm² Kulturschale in 10 ml DMEM *high Glucose* Medium. Das Medium wurde durch Zugabe von 10 % nicht hitzeinaktiviertem FCS mit Wachstumsfaktoren angereichert und bot durch die Zugabe der Antibiotika Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (0,1 mg/ml) einen maximal möglichen Schutz vor bakterieller Infektion.

Die Arbeit mit den Zellen fand ausschließlich unter einer Sterilbank statt. Die verwendeten Materialien waren ausnahmslos steril; entweder durch die Verwendung steriler Einwegmaterialien oder durch spezielle Maßnahmen, wie Backen bei mindestens 160°C über Nacht, Autoklavieren bei 120°C und die Verwendung von 70 % Ethanol zur Desinfektion. Eine Desinfektion der Hände und Flächen erfolgte ebenfalls mit 70% Ethanol. Die für die Zellen verwendeten Medien und Lösungen wurden vor der Verwendung in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Die Passage adhärenter Zellen erfolgte ein bis zwei Mal die Woche, jedoch spätestens, wenn der Zellrasen in der Kulturschale eine Konfluenz von über 100 % erreichte. Zunächst war es notwendig, die Zellen nach Entfernung des Mediums und dessen Inaktivierung mit 1x PBS, vom Boden der Kulturschale zu lösen. Für den Lösevorgang wurden je Kulturschale 1000 µl Trypsin (0.5 mg/ml) /EDTA (0.22 mg/ml) in PBS verwendet. Anschließend wurden die Zellen für etwa 10 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach dem Ablösen vom Boden erfolgte die Resuspension in frischem, FCS- und antibiotikahaltigen Medium. Um die Zellen auf 10 % der Ausgangsmenge zu verringern, wurden 1000 µl der Suspension in einer frischen Kulturschale auf 10 ml aufgefüllt.

3.3.2 Kryokonservierung ausgewählter Zelllinien

Um Zelllinien für längere Zeit haltbar zu machen, bedient man sich der Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff bei -196°C . Damit möglichst viele Zellen den Einfriervorgang überleben konnten, wurde eine 100 % konfluente Kultur zunächst wie oben beschrieben mit Trypsin von der Platte gelöst und anschließend in der halben Ausgangsmenge Medium aufgenommen und in einem 15 ml *Falcon*-Röhrchen bei 200 g 5 min zentrifugiert. Eine ehemals 100 % konfluente Kultur wurde in 1-3 1,5 ml Portionen aufgenommen. Für 2 Portionen wurde das Pellet auf Eis in 1,5 ml Einfriermedium resuspendiert, in zwei 1,5 ml Kryoröhrchen überführt und auf Trockeneis heruntergekühlt. Im Anschluss wurden die Zellen zunächst über Nacht bei -80°C gelagert und am Folgetag in flüssigen Stickstoff überführt.

3.3.3 Reaktivierung kryokonservierter Zellen

Um die kryokonservierten Zellen für den erneuten Gebrauch zu reaktivieren, wurde die Zellsuspension schnellstmöglich nach Entnahme aus dem Stickstofftank aufgetaut und mit 5 ml frischem DMEM in ein 15 ml *Falcon*-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 200 g innerhalb von 5 min abzentrifugiert, um sie von jeglichem bei Raumtemperatur zytotoxisch wirkenden DMSO zu befreien. Das vom DMSO-haltigen Überstand befreite Zellpellet wurde anschließend in 10 ml DMEM aufgenommen und in eine 10 cm Kulturschale überführt.

3.3.4 Ernte Wnt-3a-angereicherter Zellkulturmedien und Wnt-3a-Stimulation

Im Zuge der Wnt-Stimulationsexperimente zur Untersuchung des Wnt-Signalweges in Zusammenhang mit LIMP-2 und dem (Pro)Renin Rezeptor war es erforderlich, die zu untersuchenden Zellen mit Wnt-3a-Protein angereichertem Medium zu stimulieren. Das Medium wurde mit Hilfe Wnt-3a stabil transfizierter, Zeomycin selektionierter muriner Fibroblasten (Abschnitt 3.1.9) hergestellt. Hierzu wurden die Wnt-3a-Zellen zunächst, in Anwesenheit von 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Zeomycin, auf 10 cm Schalen ausplattiert und nach Erreichen 100 %iger Konfluenz auf 175 cm^2 Kulturflaschen (T175, Sarstedt, Nümbrecht, D) überführt. Die nun ohne Zeomycin gehaltenen Zellen wurden mit 25 ml Zellkulturmedium überschichtet und 3 Tage bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 25 ml das Wnt-3a angereicherte Medium in ein *falcon*-Röhrchen überführt und durch 10-minütige Zentrifugation bei 3750 rpm von Zelldebris

befreit. Ebenso wurde mit der nicht Wnt-3a transfizierten Referenzzelllinie (L-cell) verfahren. Zur Stimulation von Zellen, die für die Untersuchung des Wnt-Signalweges eingesetzt werden sollten, wurden diese in einer 24-Loch Platte ausplattiert und über Nacht mit 200µl Wnt-3a-Medium oder dem zugehörigen L-Cell-Kontrollmedium überschichtet (weitere Information zu Folgeversuchen siehe Abschnitt 3.5.11).

3.3.5 Transfektion

Als Transfektion wird ein Verfahren bezeichnet, bei dem eukaryotischen Zellen mit Hilfe chemischer Agenzien Plasmid-DNA übertragen wird.

3.3.5.1 Transiente Transfektion

Für die transiente, also nicht stabile Transfektion von Säugerzellen mit einer zur Überexpression bestimmten DNA, wurden die Zellen am Vortag in der gewünschten Anzahl auf 3-10 cm Kulturschalen ausplattiert. Für Westernblotanalysen bestimmte Zellen wurden auf 6 cm oder 10 cm Kulturschalen ausplattiert und bei einer Konfluenz von 50-80 % transfiziert. Für die Immunfluoreszenz wurden Zellen am Vortag in 3 cm Kulturschalen oder in 6-Loch-Platten ausplattiert, so dass unmittelbar vor der Transfektion, je nach Zelllinie, eine Konfluenz von 20-50 % zu erwarten war. 20 min vor der Transfektion wurde unter der Sterilbank das Transfektionsreagenz bestehend aus DMEM (ohne FCS und Antibiotika), Turbofect® oder FuGene HD® -Transfektionsreagenz und DNA nach Angaben des Herstellers angesetzt. Nach 20 min wurde das Reagenz mit einer Pipette auf die Zellen getropft und möglichst gut durch Schwenken der Kulturschale verteilt. Da die Aufnahme des die DNA enthaltenden Plasmids nach etwa 4 Stunden abgeschlossen sein sollte, konnte ab diesem Zeitpunkt das mit Transfektionsreagenz angereicherte Medium gewechselt werden. Die für die Expression der Fremd-DNA nötige Inkubation der Zellen erfolgte in einem Zeitraum von 24-48 Stunden bei 37°C im Brutschrank.

3.3.5.2 Retrovirale Transduktion

Die retrovirale Transduktion von Säugerzellen erfolgte in zwei Schritten in einem dafür ausgelegten Labor der Sicherheitsstufe 2. Zunächst wurde die Verpackungszelllinie Phönix, die die Informationen zur Transkription retroviraler Strukturgene (*gag*, *pol* und *env*) enthält,

mit den jeweiligen retroviralen Plasmidvektoren (pLNCX2 bzw. pMOWS inklusive des Gens von Interesse) nach Standardprotokoll transfiziert. 6 Stunden nach Transfektion wurde das Medium durch IMEM-Zellkulturmedium ersetzt. 24 Stunden nach Transfektion wurde das Medium von den Phönixzellen geerntet, indem es zunächst durch einen 0,2 µM Filter sterilfiltriert wurde. Pro Loch einer, am Vortag mit MEF-Zellen ausplattierten 6-Loch Platte, wurden 1-1,5 ml Phönixzellüberstand und 0,8 µg/µl *Polybren* appliziert. Die im Phönixzellüberstand enthaltenen Virionen wurden anschließend durch 2-stündige Zentrifugation der 6-Loch Platten bei 18000 rpm und Raumtemperatur an die MEFs sedimentiert, um einen Viruseintritt zu erleichtern. In den folgenden zwei Tagen wurden die MEF-Zellen im 37°C Brutschrank inkubiert und anschließend entweder geerntet oder eine Selektion mit Antibiotika begonnen, um die zunächst transiente Transduktion zu stabilisieren.

3.3.6 pH-Wert-Veränderungen in lebenden Zellen

Um den pH-Wert in lebenden Zellen zu verändern und daraufhin Proteininteraktionen zu beeinflussen, wurden HeLa-Zellen entweder mit Ammoniumchlorid (NH₄Cl) oder Bafilomycin-A1 behandelt. Dazu wurden die Zellen in 3-10 cm Schalen ausplattiert, gegebenenfalls transfiziert und am Abend vor der Ernte einer NH₄Cl-Behandlung unterzogen. Dazu wurde das NH₄Cl zunächst in Wasser gelöst und anschließend in einer Konzentration von 50 mM auf die Zellen gegeben. Die entsprechende Kontrollschale wurde mit der gleichen Menge destilliertem Wasser behandelt. Bei der Bafilomycin-A1 Behandlung wurde ähnlich verfahren, nur dass hier 20 µM Bafilomycin-A1 gelöst in DMSO verwendet wurden und die entsprechende Kontrollschale mit DMSO alleine beschickt wurde.

3.3.7 Inhibition des *ERAD* (*ER associated degradation*)-Prozesses durch MG-132

Um zu veranlassen, dass fehlgefaltete oder aufgestaute Proteine nicht mehr durch die ER-assoziierte Degradationsmaschinerie abgebaut werden können, wurde der proteasomale Inhibitor MG-132 der Firma Merck (Darmstadt, D) verwendet. MG-132 ist ein Peptidaldehyd, das durch eine inaktivierende Bindung an 20S oder 26S Proteasomen die ubiquitingesteuerte Proteolyse und damit den *ERAD*-Prozess (Abschnitt 1.1) beeinflusst (Rock et al, 1994). Für die Behandlung wurden am Vortag ausplattierte und transfizierte Zellen über Nacht mit 4 µM MG-132 versetzt. Dies entsprach 2 µl einer 10 mM MG-132 Ausgangslösung pro 5 ml DMEM pro 10 cm Schale Zellen.

3.4 Mikroskopische Methoden

3.4.1 Zellfixierung und Immunfluoreszenzfärbung intrazellulärer Proteine

Die in 6-Loch-Platten auf Deckgläschen ausplattierten und gegebenenfalls transfizierten Zellen wurden vom Medium befreit und einmal mit 1 x PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen, wenn nicht anders angegeben (Abbildung 4.1 und 4.21), durch 5-minütige Inkubation mit Methanol bei -20°C auf den Deckgläschen fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurde dreimal mit 1 x PBS gewaschen. Die mit Methanol fixierten Zellen konnten danach direkt für mindestens 15 min mit Blockierungslösung überschichtet werden. Alle weiteren Schritte erfolgten in einer mit feuchtem Cellophan ausgelegten Kammer, in der die Deckgläschen einzeln, mit der zellbedeckten Seite nach unten, auf Parafilm ausgelegt wurden. Zwischen Deckgläschen und Parafilm wurden jeweils 50 μl Portionen antikörperhaltiger Blockierungslösung aufgetragen. Der erste, antigenspezifische Antikörper wurde für mindestens 60 min in der feuchten Kammer inkubiert. Zur Anfärbung definierter Zellkompartimente wurden endogene Marker als antigenspezifische Antikörper verwendet. Es folgten 4 Waschschriffe pro Deckgläschen in 1 x PBS und die Inkubation mit dem zweiten an einen Fluorophor gekoppelten Antikörper. Nach einer Stunde wurden die Deckgläschen erneut fünfmal in 1 x PBS und einmal in destilliertem Wasser gewaschen, um sie danach auf Objektträgern mit DABCO- und Dapi-haltigem Mowiol zu immobilisieren.

Um nach Überexpression einer nicht markierten β -Glukocerebrosidase-Mutante (β -GC-L444P; Abschnitt 4.1.7.2) eine gleichzeitige Detektion der endogenen β -Glukocerebrosidase mit einem spezifischen Antikörper zu vermeiden, wurde eine murine β -GC-L444P-Mutante verwendet. Die murine Mutante wurde dementsprechend mit dem nur gegen murine β -Glukocerebrosidase gerichteten GC1341-Antikörper detektiert. Auf Grund der Verwendung myc-markierter LIMP-2-Proteine konnte so gewährleistet werden, dass nur die transfizierten und nicht die endogenen Proteine mittels Immunfluoreszenz detektiert wurden.

3.4.2 Das konfokale Laser-Scanning Mikroskop Fluoview 1000

Zur Begutachtung und Analyse der immunfluoreszierenden Zellen wurde das konfokale Laserscanning-Mikroskop des Typs Fluoview 1000 der Firma Olympus (Olympus, Hamburg, D) verwendet.

Die Detektion der verwendeten Färbungen erfolgte mit den folgenden Lasern:

- DAPI: LD 405 nm
- Alexa Fluor 488: Argon 488 nm
- Alexa Fluor 594: LD 559 nm

Um ein Überlappen der einzelnen Farbkanäle beim Abbilden der Objekte zu vermeiden, wurde jedes Bild im *sequential*-Modus aufgenommen. Dabei wurden die Laser in Gruppen unterteilt und die Probe mit jedem einzeln gescannt. Es wurde mit 100-facher Vergrößerung und einem 1,5-2x optischen Zoom gearbeitet, und die Verweildauer der Laser pro Pixel gescannter Fläche wurde auf 40-100 μ s eingestellt. Das Einstellen der Aperturblende erfolgte automatisch und wurde bei einer Standardeinstellung von 180 μ m belassen.

Zur Analyse von Kollokalisationsereignissen, bezogen auf die Maße einzelner Lysosomen (Abschnitt 4.1.1.2), wurde das *intensity profile* Werkzeug der FV1000-ASW 3.0 Viewer-Software (Olympus, Hamburg, D) verwendet. Diese ermittelt die Emissionsintensität der Kanäle an jedem Punkt einer dem Objekt angelegten Gerade.

3.4.3 LysoTracker-Red Färbung

Für die spezifische Färbung ausschließlich saurer Organellen wurde der mit einer schwachen Base verlinkte Fluoreszenzfarbstoff *LysoTracker®Red* DND-99 der Firma Invitrogen (Karlsruhe, D) verwendet. Die zunächst auf Deckgläschen in einer 6-Loch-Platte ausplattierten Zellen wurden gegebenenfalls mit pH-Wert beeinflussenden Agenzien wie Bafilomycin-A1 oder Ammoniumchlorid behandelt. Am Folgetag wurde das Medium entfernt und durch *LysoTracker®Red*-haltiges DMEM (1:3000) ersetzt. Die Verwendung des lichtempfindlichen Farbstoffs machte die Arbeit unter möglichst kargen Lichtverhältnissen erforderlich. Nach 5-minütiger Inkubationszeit wurden die Zellen 5 Mal mit 1x PBS gewaschen und anschließend durch 20-minütige Inkubation mit 4 % Paraformaldehyd in 1 x PBS auf den Deckgläschen fixiert. Im Anschluss wurden die Deckgläschen erneut dreimal mit 1 x PBS gewaschen, um sie danach auf Objektträgern mit DABCO- und Dapi-haltigem Mowiol zu immobilisieren. Auf Grund der Instabilität der *LysoTracker*-Färbung erfolgte die Dokumentation der Fluoreszenz an einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss (Zeiss, Jena, D).

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Biotinylierung von Proteinen an Zelloberflächen

Für die Biotinylierung von Zelloberflächen wurden je eine zu biotinylierende und eine Kontrollschale an Zellen ausplattiert, gegebenenfalls transfiziert und vor der Ernte einer Biotinylierung unterzogen. Hierfür wurden die Zellschalen 5 min auf Eis inkubiert, um Endozytoseprozesse zu stoppen. Pro 10 cm Schale wurden 5 ml Biotinlösung appliziert. Das verwendete, mit N-Hydroxysulfosuccinimide veresterte Biotin (Thermo Fisher, D) bindet an primäre Amine, wie zum Beispiel proteineingebundenes Lysin und markiert damit die auf der Zelloberfläche befindlichen Proteine. Als Kontrolle wurde eine 10 cm Schale mit Zellen nur mit PBS-CM behandelt. Die anschließende Inkubation erfolgte auf Eis oder im Kühlschrank. Nach 30 min wurde die Biotinlösung durch 10 ml Tris-haltige Quenchinglösung ersetzt. Tris enthält selber eine NH₂-Gruppe und kann im Überschuss auf die Zelle gegeben, alle freien Biotinmoleküle absättigen. Nach 10 min wurde die Quenchinglösung entfernt und die Zellen drei Mal vorsichtig mit PBS-CM gewaschen. Bei Zellernte und Zellyse wurde wie unter Abschnitt 3.5.3 beschrieben verfahren. Als Zellysispuffer wurde der Biotinylierungspuffer verwendet.

3.5.2 Präzipitation biotinylierter Proteine durch Streptavidin

10 % des biotinylierten Zellysats wurden zur Erstellung eines Totallysats mit reduzierendem Lämmli versehen und 10 min bei 60°C aufgeköcht. 90 % des biotinylierten Zellysats bzw. des zugehörigen Kontrolllysats wurden auf je eine 50 µl Portion Streptavidin gekoppelter und drei Mal mit Biotinylierungspuffer gewaschener Sepharosebeads gegeben. Zellysat und Beads wurden für 40-60 min bei Raumtemperatur in einem Überkopfschüttler inkubiert, wobei biotinylierte Proteine an den Beads haftend präzipitiert wurden. Fünf anschließende Waschschrte folgten, bestehend aus 5-minütiger Beads-Lysispuffer-Inkubation im Überkopfschüttler und Zentrifugation bei 2000 rpm zum Separieren der Beads. Die gewaschenen Beads wurden mit 30 µl 1x reduzierendem Lämmli für 20 min bei 60°C aufgeköcht und der Überstand zusammen mit den korrespondierenden Totallysatproben auf ein SDS-Gel aufgetragen. Als Kontrollstandard für eine erfolgreiche Oberflächenbiotinylierung wurde der an der Plasmamembran befindliche Transferrin Rezeptor (TfR) im Westernblot detektiert.

Außerdem wurde das zytosolische Protein Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) detektiert, um zu prüfen, ob die Biotinylierung nur an der Oberfläche der Zellen stattgefunden hat.

Für die Berechnung des an der Membran befindlichen Proteinanteils (Abbildung 4.23) wurde die folgende Berechnungsmethode gewählt:

$$\frac{\text{Bandenintensität Präzipitat}}{\text{Bandenintensität Totallysat}} = X$$

$$\frac{\text{Einsatz } \mu\text{g Präzipitat}}{\text{Einsatz } \mu\text{g Totallysat}} = Y$$

$$\frac{X}{Y} * 100 = \text{LIMP2 an der Oberfläche [\%]}$$

3.5.3 Herstellung eines Zelllysats

Zur Vermeidung enzymatischer Degradation der in den Zellen befindlichen Proteine wurden alle Arbeiten zur Gewinnung von und bei der Arbeit mit Zelllysaten auf Eis durchgeführt. Um die adhären Zellen von der Kulturschale zu lösen, wurden sie zunächst mit 1 ml eiskaltem 1 x PBS gewaschen und mit einem Zellschaber nach Zugabe von 300-500 µl eiskaltem 1 x PBS von der Platte geschabt. Die Suspension wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und bei 3000 rpm für 20 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet, je nach Größe, in 50–200 µl Lysispuffer aufgenommen. Die Zellyse wurde im Ultraschallbad bei 4°C durchgeführt und die Zelltrümmer durch 10-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm in der Kühlzentrifuge pelletiert. Das proteinhaltige Zelllysate im Überstand wurde entweder sofort weiter verwendet oder bei –20°C gelagert.

3.5.4 Membranpräparation

Ausplattierte und gegebenenfalls transfizierte Zellen wurden, wie unter 3.5.3 beschrieben von der Kulturschale geerntet und das Zellpellet in 300 µl *complete*-Proteaseinhibitorhaltigem 1 x PBS resuspendiert und einer Ultraschallbehandlung unterzogen, um die Mem-

branen aufzubrechen. 50 µl der Suspension wurden nach Zugabe von 1 % Triton X und erneuter Ultraschallbehandlung als Totallysat (TL) verwendet. Die übrigen 250 µl wurden 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Von dem erhaltenen Überstand wurden erneut 50 µl abgenommen, mit 1 % Triton X 100 versetzt einer Ultraschallbehandlung unterzogen und als postnukleäre Fraktion (PN) verwendet. Die verbleibenden 200 µl wurden bei 50000 rpm für 60 min in einer Beckmannzentrifuge ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde nach Zugabe von 1 % Triton X 100 als lösliche Fraktion (SL) verwendet. Das, die Membranen enthaltende, Pellet wurde in 50 µl Lysispuffer aufgenommen und wie unter 3.5.3 beschrieben zu einem Lysat der Membranfraktion (MF) verarbeitet.

3.5.5 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Zellysate erfolgte mit dem *BCA Protein Assay Kit* (Pierce, Rockford, USA) gegenüber einer Standardreihe. Zu diesem Zweck wurden 10 µl der zu messenden 1:10 verdünnten Probe und jeweils 10 µl der BSA enthaltenden Standardproben in je ein Loch einer 96-Loch-Platte überführt und mit jeweils 200 µl BCA (Reagenz A:B = 1:50) versetzt. Es folgte eine Inkubationszeit von 30 min bei 37°C im Brutschrank. Nach erfolgter Farbreaktion, die sich proportional zur enthaltenen Proteinkonzentration ergab, wurden die Proben in der 96-Loch-Platte im 96-Loch-Mikrotiterplattenleser (Biotek Instruments, Bad Friedrichshall, D) bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Die Proteinkonzentrationen konnten mit Hilfe der Extinktionswerte anhand der linearen Regression der Standardreihe im *Excel*-Programm (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) bestimmt werden.

3.5.6 Deglykosylierung mit N-Glykosidase F und Endoglykosidase H

Die Deglykosylierung glykosylierter Proteine wurde durch die Verwendung von 1,5 µl Verdauungsenzym pro 50 µg lysiertem Protein mit dem entsprechenden Deglykosylierungspuffer (PNGase F-oder Endo H-Puffer) erreicht. Es wurde darauf geachtet, dass möglichst hoch konzentrierte Proteinlysate verwendet wurden, die durch Zugabe des jeweiligen Deglykosylierungspuffers im Verhältnis 1:2 auf Konzentrationen von 1-2 µg/µl herunterverdünnt werden konnten. Nach Zugabe des Deglykosylierungspuffers wurden die Proben für 5 min bei 95°C erhitzt, danach auf etwa 37°C abgekühlt und mit dem jeweiligen Enzym

versetzt. Es folgte eine Inkubation bei 37°C über Nacht. PNGase F (N-Glykosidase F) führt zum Verdau aller Zuckerreste des Proteins, während Endoglykosidase H nur die mannose-reichen Zucker des unreifen Proteins im ER angreift.

3.5.7 Koimmunopräzipitation

Bei der Koimmunpräzipitation handelt es sich um ein Verfahren, das es ermöglicht, Proteininteraktionen zu identifizieren. Dabei wurden 600-1500 µg ($c = 1-3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) eines mit EBC-Lysispuffer angefertigten Proteinlysats (Abschnitt 3.5.2) mit 1-1,5 µl eines antigenspezifischen Antikörpers für mindestens 4 Stunden und 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Parallel zum Protein-Antikörper-Mix wurden je Ansatz 50 µl magnetische *Dynabeads*® (Invitrogen, Mannheim, D) in 1-3 %iger BSA/PBS Lösung inkubiert. Ob Protein A oder G gekoppelte *Dynabeads*® verwendet werden mussten, wurde, je nach eingesetztem Antikörper, den Angaben des Herstellers entnommen.

Nach 4 Stunden wurden die *Dynabeads*® mit einem magnetischen Eppendorfhalter vom BSA separiert und nach Zugabe des Protein-Antikörper-Mix für 20 min bei Raumtemperatur in einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach der Inkubation soll sich ein stabiler Protein-Antikörper-*Dynabeads*®-Komplex gebildet haben. Es folgten fünf Waschschriffe, bestehend aus je 5-minütiger *Beads*-Lysispuffer-Inkubation im Überkopfschüttler. Der gewaschene *Dynabeads*®-Komplex wurde je nach eingesetzter Ausgangsmenge an Protein in 25-60 µl 1x reduzierendem Lämmli (200 mM DTT Endkonzentration) aufgenommen, 10 min bei 70°C aufgeköcht und im Anschluss auf ein SDS-Gel aufgetragen.

3.5.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen, wurden 10-50 µg Protein in einem Volumen von 30 µl aufgenommen, mit 10 µl reduzierendem SDS-Elektrodenpuffer (4x Lämmli inklusive 400-800 mM DTT) aufgefüllt und in die Gelkammern des Sammelgels eines 7,5-12,5 %igen Polyacrylamid enthaltenden SDS-Polyacrylamidgels pipettiert. Das befüllte Gel wurde in einer SDS-PAGE-Kammer an eine konstante Spannungsquelle von 100-165 Volt gelegt. Als Proteinstandard diente der *Page Ruler Prestained Plus* (Fermentas, St. Leon-Rot).

3.5.9 Westernblot

Für den Transfer der im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde die Tankblotmethode durchgeführt. Die Membran wurde dazu luftblasenfrei auf eine Lage *Whatman*-Papier in den Schlitten der Tankblotkammer gelegt und mit Transferpuffer getränkt. Dann folgte das SDS-Gel und eine weitere Lage *Whatman*-Papier. Der Schlitten wurde geschlossen und mit der Gelseite, zur Kathode zeigend, in die mit Transferpuffer aufgefüllte Kammer geschoben. Die durch das SDS negativ geladenen Proteine konnten so bei einer angelegten Spannung von 20 Volt vom Minuspol abgestoßen und über Nacht auf die Membran geblottet werden. Alternativ konnte die Blotzeit auf 2 Stunden verkürzt werden, indem die Tankblotkammer einer konstanten Stromstärke von 800 mA ausgesetzt wurde. Anschließend wurde die Membran in 5 %iger Milchpulverlösung in TBS/Tween 30 min inkubiert, um unspezifische Bindungen der später verwendeten Antikörper an die Membran zu minimieren. Die immunchemische Detektion erfolgte über die Bindung eines antigenspezifischen primären Antikörpers, mit dem die Membran 2–3 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in Milchpulverlösung inkubiert wurde. Die Membran wurde dann dreimal für 10 min mit TBS/Tween gewaschen und anschließend für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Danach wurde die Membran wiederum drei- bis fünfmal für 10 min mit TBS/Tween gewaschen. Die Detektion erfolgte über eine HRP-katalysierte Chemilumineszenzreaktion (*ECLadvanced Western Blotting Detection Systems*, Amersham, Little Chalfont, UK), die über eine Chemilumineszenzkamera aufgenommen wurde.

3.5.9.1 Strippen von Westernblots

Um Proteine ähnlicher Größe auf derselben Nitrozellulosemembran mit unterschiedlichen Antikörpern nachzuweisen, war es notwendig, die Membran nach Erst- oder Mehrfachgebrauch von den Antikörpern zu befreien. So konnte eine erneute Inkubation mit einem anderen Erstantikörper erfolgen. Zu diesem Zweck wurde die Membran in einem reduzierenden β -Mercaptoethanol enthaltenden Puffer (*Stripp*-Puffer) für 30 min bei 70°C im Brutschrank inkubiert und anschließend in 5-Minuten-Schritten mit TBS/Tween bis zur Geruchsneutralität gewaschen. Danach konnte die Immundetektion, beginnend mit dem Blockierungsschritt in 5 %iger Milchpulverlösung, wiederholt werden.

3.5.9.2 Densitometrische Analyse von Bandenintensitäten im Westernblot

Für die densitometrische Analyse der Bandenstärken auf einem Westernblot wurde die frei im Netz verfügbare, von Wayne Rasband, einem Mitarbeiter des *National Institutes of Health* (Bethesda, Maryland, USA), programmierte Image J Software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) verwendet. Es wurde darauf geachtet, dass möglichst nur luftblasenfreie, klar auf die Membran übertragene und moderat belichtete Proteinbanden analysiert wurden. Mittels Rechteckwerkzeug wurden die Banden abgegrenzt und deren Intensität in Form eines Integrals durch die Software berechnet. Die Flächen unter den, die Banden repräsentierenden, Kurven wurden als Zahlenwerte in ein *Excel*-Dokument überführt, um sie für weitergehende Berechnungen zu verwenden. In Koimmunpräzipitationen wurde jeweils der Intensitätswert des Kopräzipitates durch den Intensitätswert des korrespondierenden Präzipitates dividiert.

3.5.10 Enzymaktivitätsassay

Um die Aktivität der β -Glukocerebrosidase in Zelllysaten zu bestimmen, wurden Wildtyp- und LIMP-2-defiziente Zellen in 10 cm Schalen ausplattiert, transfiziert und in Lysispuffer lysiert. Die Konzentration des Zelllysats sollte zwischen 10-20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ liegen. Je 20-40 μl (etwa 200-400 μg) wurden in 3 x 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben. Jede Lysatprobe bestand demnach aus einem zu messenden Doppelwert, dem je 100 μl β -Glukocerebrosidasesubstrat appliziert wurden und einem Kontrollwert, der nur mit 100 μl Citratpuffer versetzt wurde. Nach einer 2-4 stündigen Inkubationszeit im 37°C Brutschrank wurden die Enzymreaktionen mit 600-1000 μl stark basischer Stopplösung versehen, bei 13000 rpm 10 min zentrifugiert und zu je 161 μl Portionen auf eine 96 Loch Platte aufgetragen. Die Extinktion wurde bei 405 nm im Mikroplattenleser (Biotek Instruments, Bad Friedrichshall, D) gemessen und die Mittelwerte der Doppelwerte um deren jeweilige Kontrollwerte bereinigt. Die Berechnung der Enzymaktivitäten erfolgte unter Einbeziehung der Proteinkonzentrationswerte in U/mg.

$$\text{Aktivität} \left[\frac{U}{\text{mg}} \right] = \left(\frac{dE \times V_{\text{end}}}{\Delta t \times \varepsilon \times d \times V_{\text{Lysate}}} \right) \div c_{\text{Lysate}}$$

3.5.11 Luciferaseassay

Für die Ausführung des Luciferaseassays wurde das *Dual-LuciferaseTM Reporter (DLRTM)* System der Firma Promega (Mannheim, D) gewählt. Als Vektor wurde der unter Abschnitt 3.1.6 beschriebene pGL4-Vektor verwendet. Insgesamt wurden drei Vektorvarianten genutzt (Tabelle 3.13)

Tabelle 3.15: Verwendete pGL4-Vektoren

| Bezeichnung | Alternativer Name | Responsive element | Gen |
|---------------|-------------------|---------------------------------|---------------------------|
| pGL4-TOPflash | TOP | TCF/LEF Bindungsstelle | <i>firefly luciferase</i> |
| pGL4-FOPflash | FOP | Mutierte TCF/LEF Bindungsstelle | <i>firefly luciferase</i> |
| pGL4-Renilla | Renilla | Kein responsive element | <i>renilla luciferase</i> |

Der als Reporter genutzten *firefly luciferase* ist ein im Wnt-Signalweg spezifisches *responsive element* vorangeschaltet. Dieses dient als Bindestelle für den Transkriptionsfaktor TCF/LEF, der im Zusammenhang mit β -Catenin die Wnt-Protein gesteuerte Genexpression reguliert (Korinek et al, 1997; Molenaar et al, 1996). Ein weiterer Reportervektor, ebenso aufgebaut wie der die *firefly luciferase* exprimierende Vektor, enthält als *responsive element* eine mutierte TCF/LEF-Bindestelle, diese führt dazu, dass die Wnt-Signalkaskade unterbrochen wird und es nicht zur Expression des Reportergens kommt.

Für den Assay wurden Zellen in einer 24-Loch Platte ausplattiert und mit den Luciferase exprimierenden Vektoren transfiziert. Pro Transfektionsansatz wurden entweder TOP/ Renilla oder FOP/ Renilla jeweils im Verhältnis 10:1 nach Standardtransfektionsprotokoll mit Turbofect® transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen entweder mit 200 μ l Wnt-Medium oder 200 μ l Kontroll-Medium (*L-cell* Medium) stimuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit je 100 μ l Lysispuffer des *Dual-LuciferaseTM Reporter-Assay-Kits* lysiert und anschließend bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. 20 μ l des Zelllysats im Überstand wurden in Doppelwerten auf eine, für Biolumineszenzmessungen geeignete, 96-Loch Platte pipettiert, die dann in das *GloMax® 96 Microplate* Luminometer überführt wurde. Als Substrate für die *firefly* bzw. Renilla Luciferase wurde das im *Kit* mitgelieferte *Beetle Luciferin* bzw. *Coelenterazine* nach Angaben des Herstellers

verwendet (*Dual-Luciferase®Reporter Assay System instructions for use of products E1910 and E1960*). Eine erste Analyse erfolgte mit dem *Run Promega Protocoll-DLR-DLR2injections*-Programm der im Luminometer mitgelieferten Software. Da das Programm nur eine Normalisierung der *firefly* Lumineszenzen gegen die Werte der Renilla Lumineszenzen vornimmt, wurde eine vervollständigte Auswertung im Anschluss manuell durchgeführt. Dafür wurden die Werte der TOP/Renilla-Werte gegen die FOP/Renilla-Kontrollwerte normalisiert. Während die Renillaluciferaseaktivität eine interne Expressionskontrolle auf Grund Stimulus unabhängiger Aktivität darstellt, gibt der Aktivitätswert in FOP-transfizierten Zellen falsch-positive Aktivitätswerte der *firefly* Luciferase an. Der daraus erhaltene Wert wurde als Wnt-3a- (Wnt-stimuliert) bzw.- *L-cell*- (unstimuliert) Medium Aktivitätswert dokumentiert. Die relative Luciferaseaktivität des Wnt3a-Mediums ergibt sich aus dem Quotienten von Wnt-3a Aktivität zu *L-cell* Aktivität und repräsentiert im Experiment die Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalweges.

3.6 Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden mit Hilfe der Microsoft Excel Software erstellt. Balkendiagramme stellen die Mittelwerte samt Standardabweichungen von unabhängig voneinander erstellten Experimenten dar. Zur Ermittlung der Signifikanz dargestellter Zusammenhänge im Enzymaktivitätsassay wurde der ungepaarte, zweiseitige, studentische T-Test verwendet. Die mittels T-Test berechneten P-Werte wurden als Sterne über den in Beziehung gesetzten Balken im Diagramm dargestellt. Dabei wurden folgende Definitionen festgelegt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$.

Da es sich bei den in dieser Arbeit analysierten Westernblotexperimenten mit einer jeweiligen Maximalanzahl von $n=10$ handelt, bei gleichzeitig fehlender Definition einheitlicher und akzeptierter Standards in der densitometrischen Analyse von Westernblots (Gassmann et al, 2009), wurde auf den T-Test verzichtet. Stattdessen wurde in den Bildunterschriften angegeben, in wie vielen Experimenten der diskutierte Trend ausgemacht werden konnte.

4 Ergebnisse

Innerhalb der Zellen finden Proteininteraktionen zur Regulation (z.B. Genexpression) zum Aufbau großer Proteinkomplexe (z.B. ATPasen) oder auch zu Transportzwecken ständig statt. Um diese Interaktionen zum richtigen Zeitpunkt zu stabilisieren und – wenn es nötig wird – wieder zu lösen, sind Regulationsmechanismen erforderlich, die in der Regel durch äußere Faktoren im umgebenden Milieu gestaltet werden. So führen Signaltransduktionsprozesse (Abschnitt 1.2.1.1 und 4.2.4) zu einer ganzen Reihe von hintereinandergeschalteten Proteininteraktionen, meistens ausgelöst durch ein einziges Signal an der Zelloberfläche. In sekretorischen Transportprozessen wird die Interaktion des kationenunabhängigen M6P-Rezeptors und seiner Fracht jedoch in den allermeisten Fällen vom umgebenden pH-Wert reguliert (Olson et al, 2008).

4.1 Charakterisierung der pH-Wert-abhängigen Interaktion von LIMP-2 und der β -Glukocerebrosidase

Der pH-Wert im sekretorischen Weg bildet einen Gradienten, der ausgehend vom ER über Golgiapparat und Endosomen, bis hin zu den Lysosomen stetig saurer wird (Mellman et al, 1986). Reguliert wird dieses Gefälle unter anderem durch die vesikuläre H^+ -ATPase (Abschnitt 1.2 und 1.2.1), die in der Membran saurer Kompartimente und in der Plasmamembran aktiv ist (Brown et al, 1987; Mego et al, 1972; Stevens & Forgac, 1997).

Die Interaktion zwischen der sauren Sphingolipidase β -Glukocerebrosidase und LIMP-2 ist wahrscheinlich auch von dem pH-Gradienten innerhalb des sekretorischen Weges abhängig. Bisher konnte jedoch nur *in vitro* bestätigt werden, dass die beiden Interaktionspartner umso stärker miteinander interagieren, je höher der pH-Wert ist (Reczek et al, 2007); Abschnitt 1.3.2.1.1). Aus diesem Grund sollte der Hauptteil dieser Arbeit dazu dienen, der pH-Wert-Abhängigkeit der LIMP-2-/ β -Glukocerebrosidase-Interaktion sowohl auf zellulärer als auch molekularer Ebene nachzugehen, um den pH-sensitiven Mechanismus auf Seiten von LIMP-2 besser zu verstehen.

4.1.1 Analyse der LIMP-2-/ β -Glukocerebrosidase-Interaktion nach Erhöhung des intralysosomalen pH-Wertes

Um den pH-Wert innerhalb der lebenden Zelle und dort besonders in den sauren Kompartimenten zu verändern, können lysosomotropische Substanzen, wie Ammoniumchlorid oder

spezifische Inhibitoren der V-ATPase, zum Beispiel Bafilomycin-A1, verwendet werden (Gonzalez-Noriega et al, 1980; Yoshimori et al, 1991).

Um Ammoniumchlorid und Bafilomycin-A1 für Untersuchungen zur Charakterisierung der vom pH-Wert-abhängigen LIMP-2-/ β -Glukocerebrosidase-Interaktion zu verwenden, wurden diese Agenzien zunächst in HeLa-Zellen auf ihre Effektivität, den lysosomalen pH-Wert zu steigern, getestet. Hierbei diente die Verwendung von *LysoTracker*[®]Red DND-99, eines mit einer schwachen Base verlinkten Fluorophors, als Indikator (Abschnitt 3.4.3). Die Fluoreszenz entsteht in H⁺-reicher Umgebung durch Protonierung der Base und ist demnach in allen sauren Organellen zu sehen (Invitrogen, Manual, *LysoTracker*[®] and *LysoSensor*[™] Probes; (Dingle & Fell, 1969).

Im Test wurden die Zellen mit 50 mM Ammoniumchlorid oder 20 μ M Bafilomycin-A1 versetzt, 6-15 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend mit einer *LysoTracker*[®]Red DND-99 Lösung versetzt. Das Ausbleiben der Fluoreszenz auf Grund eines gestiegenen vesikulären pH-Wertes war nur bei Bafilomycin-A1 behandelten Zellen über einen längeren Zeitraum erkennbar (Abbildung 4.1 unten). Im Fall von Ammoniumchlorid zeigten die Zellen nach einer anfänglichen Deazidifizierung eine Regenerierung des lysosomalen pH-Wertes, sichtbar an einem wiedergekehrten Farbsignal nach 15 Stunden (Abbildung 4.1 oben).

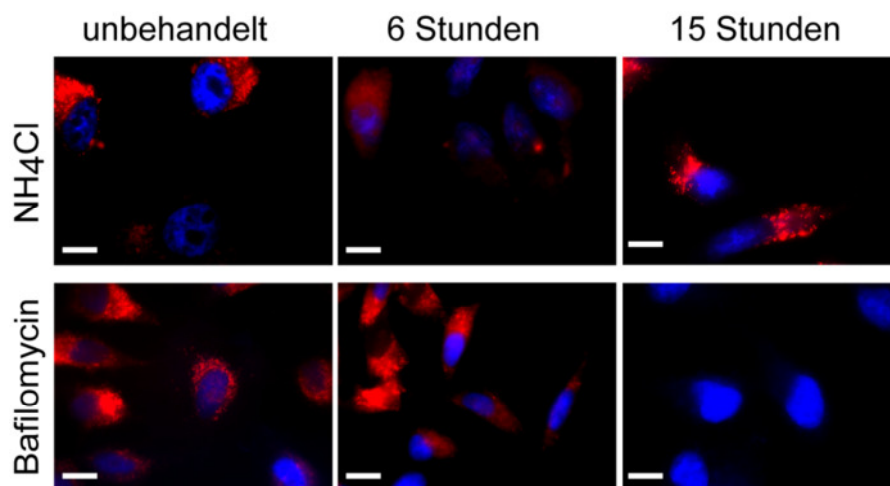


Abbildung 4.1: Test auf Deazidifizierung saurer Vesikel durch Ammoniumchlorid oder Bafilomycin-A1 zu verschiedenen Zeitpunkten. Für den Test wurden HeLa-Zellen ausplattiert und entweder mit dem Lösungsmittel (Wasser bzw. DMSO) oder NH₄Cl bzw. Bafilomycin-A1 6-15 Stunden inkubiert. Die Anfärbung saurer Vesikel erfolgte mit *LysoTracker*[®]Red DND-99. Anschließend wurden die Zellen mit 4% PFA auf Objektträgern fixiert und unter einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss visualisiert. Größenmarker = 10 μ m

Diese Wirkungsstudien von Ammoniumchlorid und Bafilomycin-A1 in den HeLa-Zellen gaben die Richtwerte für die Anwendung im Experiment vor. Eine Ernte der Zellen sollte nach Ammoniumchlorid-Behandlung bevorzugt nach 6-8 Stunden und nach einer Behandlung mit Bafilomycin-A1 nach etwa 15 Stunden erfolgen.

4.1.1.1 Koimmunpräzipitation von β -Glukocerebrosidase durch LIMP-2 in Ammoniumchlorid oder Bafilomycin behandelten HeLa-Zellen

Um die pH-Wert-abhängige Interaktion zwischen LIMP-2 und der β -Glukocerebrosidase möglichst spezifisch und auf zellulärer Ebene zu untersuchen, wurden Koimmunpräzipitationen beider Proteine nach Ammoniumchlorid- oder Bafilomycin-A1-Behandlung von HeLa-Zellen durchgeführt.

Da endogene β -Glukocerebrosidase in HeLa-Zellen nach Koimmunpräzipitation durch endogenes LIMP-2 durch die vorhandenen Antikörper nicht in ausreichenden Mengen detektiert werden konnte, wurden alle Experimente nach Überexpression mindestens eines der zu untersuchenden Interaktionspartner in HeLa-Zellen durchgeführt.

Für die Koimmunpräzipitation der β -Glukocerebrosidase durch LIMP-2 wurden HeLa-Zellen zunächst mit humanem LIMP-2-myc und humaner β -Glukocerebrosidase transfiziert und nach 24-36 Stunden entweder für weitere 6 Stunden mit Ammoniumchlorid oder über Nacht mit Bafilomycin-A1 behandelt. Als Kontrollen dienten ebenfalls mit LIMP-2-myc und der β -Glukocerebrosidase transfizierte Zellen, die jedoch über Nacht nur mit Wasser im Fall der NH_4Cl -Kontrolle bzw. DMSO im Fall der Bafilomycin-A1-Kontrolle versetzt wurden.

Nach Präparation der Zelllysate wurden diese über Nacht mit einem LIMP-2-Antikörper einer Koimmunpräzipitation unterzogen (Abschnitt 3.5.3 und 3.5.7; Schema in Abbildung 4.2 A). Totallysate und Präzipitate wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und im Anschluss auf eine Nitrozellulosemembran geblottet (Abbildung 4.2.B). Die Koimmunpräzipitationen wurden jeweils mehrfach durchgeführt und die erhaltenen Westernblots einer densitometrischen Analyse unterzogen (Abschnitt 3.5.9.2). Eine Zusammenfassung aller Ergebnisse ist in Abbildung 4.2 B verdeutlicht. In jedem Einzelexperiment war die Tendenz zu erkennen, dass die Steigerung des endosomalen/lysosomalen pH-Wertes eine Steigerung der Bindungsintensität von LIMP-2 und der β -Glukocerebrosidase zur Folge hatte. Der gleiche Effekt konnte ebenfalls in COS-7-Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

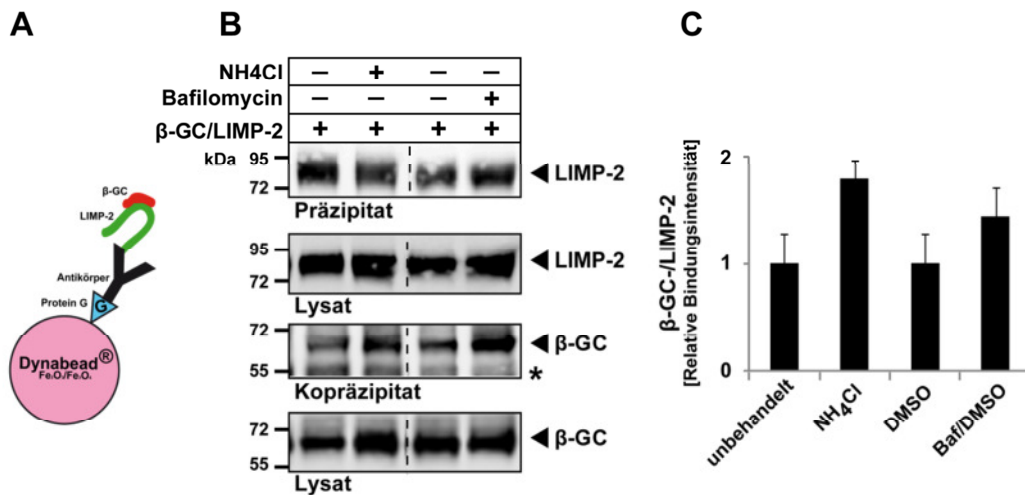


Abbildung 4.2: Einfluss des pH-Wertes auf die Bindung von LIMP-2 und der β -Glukocerebrosidase. A) Ein Schema veranschaulicht das Prinzip der hier durchgeführten Koimmunpräzipitation von β -Glukocerebrosidase (β -GC) durch LIMP-2. B) HeLa-Zellen wurden mit β -Glukocerebrosidase und LIMP-2-myc transfiziert und einer Ammoniumchlorid (NH_4Cl) bzw. Bafilomycin-(Baf)-behandlung unterzogen. Die anschließend präparierten Zelllysate wurden entweder direkt oder nach einer Koimmunpräzipitation mit einem LIMP-2-Antikörper (α -L2T2) auf ein SDS-Gel aufgetragen. Auf dem dargestellten Westernblot wurden β -Glukocerebrosidase bzw. LIMP-2 mit spezifischen Antikörpern (α -GC8E4, α -L2T2) detektiert. C) Zusammenfassung der erhobenen densitometrischen Westernblotanalysen von 3 (NH_4Cl) bzw. 6 (Bafilomycin) unabhängig voneinander, wie unter A) beschrieben, durchgeführten Koimmunpräzipitationen. Die Balken stellen die Mittelwerte der in den Experimenten erhaltenen β -GC/LIMP-2-myc Verhältnisse dar. Einzelwerte wurde jeweils zum β -GC/LIMP-2-myc-Mittelwert der unbehandelten Zellen normalisiert. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen der erhaltenen Mittelwerte. In allen Experimenten zeigte sich eine intensivierte β -GC-/LIMP-2-myc-Interaktion durch NH_4Cl -oder Bafilomycinbehandlung. *= schwere Kette des α -L2T2-Antikörpers bei 55 kDa.

4.1.1.2 Kolokalisationsstudien von LIMP-2 und der β -Glukocerebrosidase in Ammoniumchlorid oder Bafilomycin behandelten HeLa-Zellen

Um zu visualisieren, dass die pH-Werterhöhung besonders in den sauren Organellen zu einer verstärkten Bindung der β -Glukocerebrosidase an ihren Rezeptor LIMP-2 führt, wurden Kolokalisationsstudien von LIMP-2 und der β -Glukocerebrosidase nach Inhibition der vesikulären H^+ ATPase mittels Bafilomycin-A1 in HeLa-Zellen durchgeführt.

Die zu verwendenden HeLa-Zellen wurden auf Objektgläschen ausplattiert, mit LIMP-2-myc und der β -Glukocerebrosidase bzw. der lysosomale Aspartylprotease Cathepsin D als Kontrolle kotransfiziert und über Nacht mit Bafilomycin-A1 behandelt. Sowohl β -Glukocerebrosidase als auch Cathepsin D sind lösliche Hydrolasen, die sich im *steady state* hauptsächlich im lysosomalen Lumen befinden (Saftig & Klumperman, 2009; Yokota & Atsumi, 1983); Abbildung 4.3.A und C). Charakteristisch für eine Bafilomycin-Behandlung ist ein leichtes

Anschwellen später Endosomen und Lysosomen, da sich der osmotische Druck durch den Ausfall der vesikulären H⁺-ATPase verändert (Busch et al, 1995).

Ein Vergleich Bafilomycin behandelter HeLa-Zellen, transfiziert mit LIMP-2-myc und β -Glukocerebrosidase einerseits oder LIMP-2-myc und Cathepsin D andererseits, konnte zeigen, dass sich die pH-Werterhöhung nur auf die Interaktion von β -Glukocerebrosidase und LIMP-2 auswirkte. Denn während Cathepsin D im Lumen der angeschwollenen Lysosomen verblieb, kolokalisiert β -Glukocerebrosidase mit membranständigem LIMP-2 (Abbildung 4.3. B und D). Für die Quantifizierung wurden in jedem Objekt mindestens 10 Vesikel einer mit Bafilomycin behandelten Zelle mit dem *intensity profile* Werkzeug der FV1000-ASW 3.0 Viewer-Software (Olympus, Hamburg, D) vermessen, und die Vermessungspunkte wurden auf Kolokalisation analysiert. Im Fall der LIMP-2/ Cathepsin D transfizierten Zellen zeigten beide Proteine getrennte Kurvenmaxima, wohingegen die Kurven von LIMP-2 und der β -Glukocerebrosidase jeweils an den Außenbereichen der Lysosomen ihre Maxima aufwiesen (Abbildung 4.3.B₁ und D₁). Dieses Experiment weist darauf hin, dass die Interaktion zwischen der β -Glukocerebrosidase und LIMP-2 vom pH-Wert-abhängig ist.

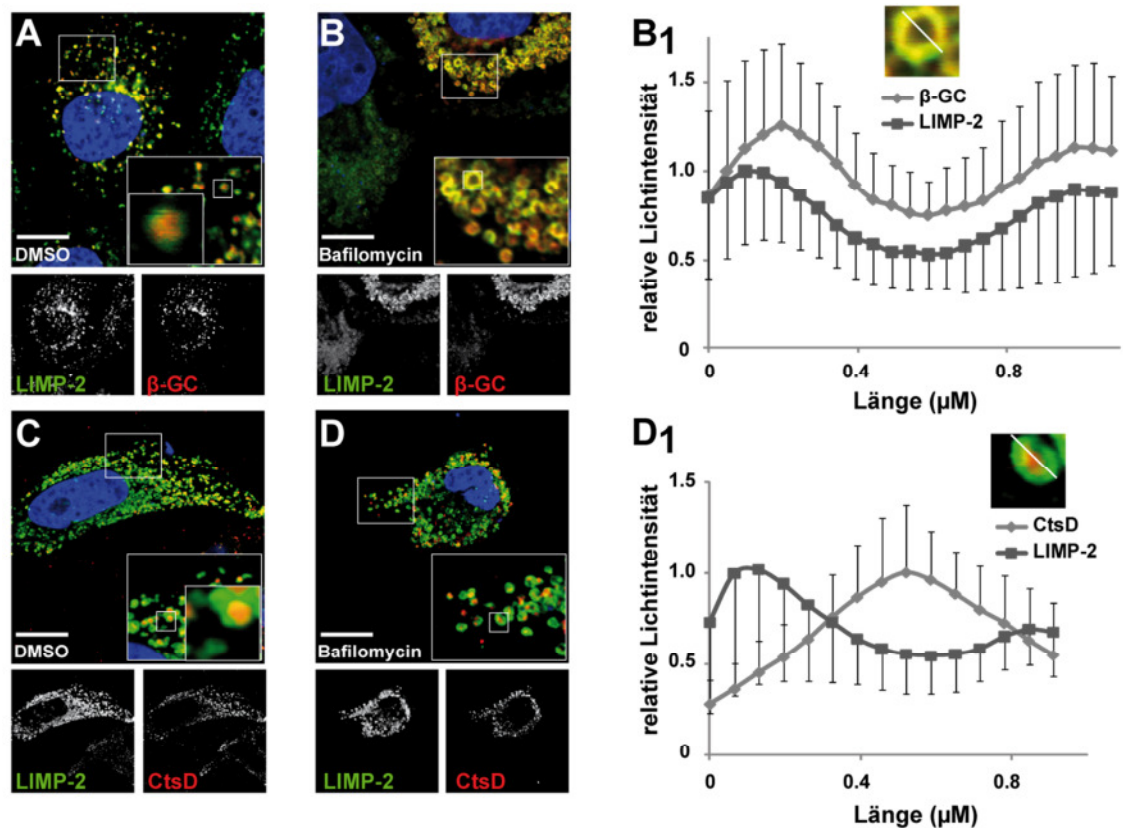


Abbildung 4.3: Einfluss des lysosomalen pH-Wertes auf die Lokalisation der β -Glukocerebrosidase. HeLa-Zellen wurden mit LIMP-2-myc und β -Glukocerebrosidase oder LIMP-2-myc und Cathepsin D ko-transfiziert und nach Inkubation mit den angegebenen Antikörpern auf Objektträgern fixiert. Anschließend folgte eine Analyse mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop. A) und B) Kolokalisation von LIMP-2-myc (LIMP-2) und der β -Glukocerebrosidase (β -GC) mit oder ohne vorherige Bafilomycin-A1-Behandlung. C) und D) Kolokalisation von LIMP-2-myc und Cathepsin D (CtsD) mit oder ohne vorherige Bafilomycin-A1-Behandlung. Bei den mehreren Vesikel umfassenden Ausschnitten (A-D) handelt es sich jeweils um eine 1,5-fache Vergrößerung der Teilabbildungen, während die Ausschnitte einzelner Vesikel A-D inklusive B_1 und D_1) einer 4-fachen Vergrößerung der korrespondierenden Teilabbildungen entsprechen. B_1 und D_1) Analyse der Kolokalisation der angezeigten Proteine mit dem *intensity profile* Werkzeug der FV1000-ASW 3.0 Viewer-Software (Olympus, Hamburg, D). Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert der aus 11 (B_1) bzw. 10 (D_1) Vesikeln der gezeigten Zellen zusammengefassten Lichtintensitäten am jeweiligen Längenabschnitt der Vesikel. Die Mittelwerte wurden jeweils zum Mittelwert der LIMP-2-Lichtintensität bei 0,098 μm (B_1) bzw. 0,065 μm (D_1) normalisiert. Vesikeldurchmesser: $B_1=1,078$; $D_1=0,91$. Darstellung der Fehler als Standardabweichungen der Mittelwerte. Größenmarker = 10 μm . Verwendete Antikörper: α -myc-9B11 zur LIMP-2-myc Detektion; α -GC8E4 zur Detektion der β -Glukocerebrosidase und α -CtsD zur Detektion von Cathepsin D.

4.1.2 Untersuchung einer pH-Wert-unabhängigen LIMP-2-Mutante

Im vorhergehenden Abschnitt konnte gezeigt werden, dass eine pH-Wert-Abhängigkeit der LIMP-2-/ β -Glukocerebrosidase-Interaktion auch auf zellulärer Ebene existiert.

Da häufig Histidinreste auf Grund ihrer Protonierungs- und Deprotonierungseigenschaften innerhalb physiologischer pH-Wertbedingungen in pH-Wert-abhängige Proteininteraktionen involviert sind (Abschnitt 1.2.2), sollte eine LIMP-2-Mutante, deren 8 Histidinreste zu Alanin

ausgetauscht wurden, als putativ pH-Wert unabhängiges LIMP-2-Protein in seiner Bindung zur β -Glukocerebrosidase untersucht werden.

Wie Abbildung 4.4 A deutlich zeigt, führte jedoch der Austausch aller Histidinreste zu Alanin (Abschnitt 3.2.3.7) zu einer Retention des Proteins im ER. Da vermutet wurde, dass die im Vergleich zu Histidin strukturell sehr unterschiedliche Natur des Alanins möglicherweise der Grund für die Fehllokalisierung der LIMP-2-HisFree-Ala-myc-Mutante gewesen sein könnte, wurde das gleiche Experiment erneut mit einer LIMP-2-HisFree-Phe-myc-Mutante wiederholt, deren Histidinreste durch ein aromatisches Phenylalanin substituiert vorlagen. Die erneut durchgeführte Immunfluoreszenz in COS-7-Zellen zeigte jedoch auch für die LIMP-2-HisFree-Phe-myc-Mutante eine ER-Lokalisation (Abbildung 4.4 B).

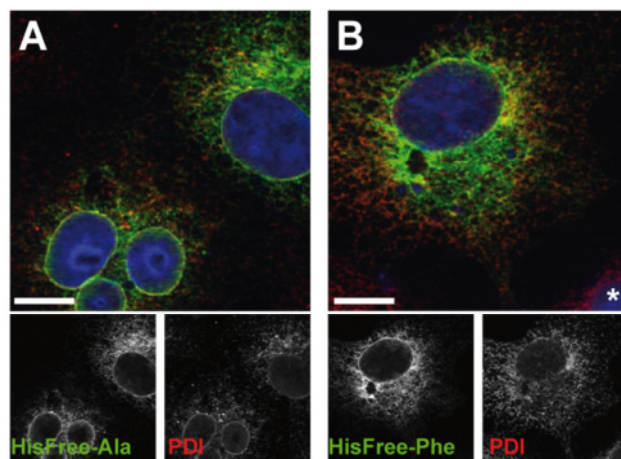


Abbildung 4.4: ER-Retention von LIMP-2 nach einer Substitution aller 8 Histidinreste zu Alanin oder Phenylalanin. Mit A) LIMP-2-HisFreeAla-myc oder B) LIMP-2-HisFreePhe-myc transfizierte COS-7-Zellen wurden fixiert und durch Kofärbung mit endogener PDI (Protein-Disulfid-Isomerase) als ER-resident nachgewiesen. Detektion der myc-Epitope mit α -myc-9B11-Antikörper und der PDI mit α -PDI-Sc-Antikörper; * = untransfizierte Zelle; Größenmarker = 10 μ m.

Auf Grund der fehlenden lysosomalen Lokalisation der putativ pH-insensitiven LIMP-2-HisFree-Mutanten wurde eine Interaktionsstudie mit der β -Glukocerebrosidase zwar durchgeführt (Daten nicht gezeigt), aber eine Interpretation bezüglich der Relevanz von Histidinresten in der LIMP-2-/ β -Glukocerebrosidase-Interaktion für nicht sinnvoll erachtet. Denn Proteine, die wegen ihrer Mutation im ER zurückgehalten werden, sind in der Regel fehlgefaltet und für strukturell veränderte Proteine ist bekannt, dass sie unterschiedliche Bindungseigenschaften besitzen können (Bonifacino et al, 1989; Kelly, 1998), was einen Vergleich der Bindungsintensität zur β -Glukocerebrosidase von dieser LIMP-2-Mutante und Wildtyp-LIMP-2 erschwert.

4.1.3 Analyse des klinisch relevanten LIMP-2-Histidin-363-Rests als mögliche pH-sensitive Aminosäure in der LIMP-2-/ β -Glukocerebrosidase-Interaktion

Der vorherige Abschnitt konnte zeigen, dass eine putativ vom pH-Wert unabhängige LIMP-2-Mutante, deren Histidinreste durch Alanin oder Phenylalanin substituiert wurden, im pH-neutralen ER verbleibt. Aus diesem Grund konnte eine vergleichende Interaktionsstudie von LIMP-2 bzw. der putativ pH-Wert unabhängigen LIMP-2-Mutante und der β -Glukocerebrosidase nicht durchgeführt werden.

Im weiteren Vorgehen wurde deshalb gezielter nach einzelnen Histidinresten innerhalb des LIMP-2-Proteins als möglicherweise entscheidende Regulatoren der pH-Wert-abhängigen LIMP-2-/ β -Glukocerebrosidase-Interaktion gesucht. Hierbei sollte zunächst ein, in manchen Fällen des *action myoclonus renal failure* (AMRF) Syndrom zu Asparagin mutierter, Histidinrest an Position 363 des humanen LIMP-2-Proteins näher untersucht werden (Dardis et al, 2009). Ob es sich bei diesem Histidin um einen gesuchten pH-sensitiven Rest in der LIMP-2/ β -Glukocerebrosidase-Interaktion handelt, sollte durch dessen Austausch zu Alanin oder Lysin ermittelt werden. Theoretisch sollte der ungeladene Alaninrest eine verstärkte Interaktion verursachen, während der, unter zellulären pH-Wertbedingungen, konstant geladene Lysinrest zu einer Abstoßung der β -Glukocerebrosidase führen müsste (Abschnitt 1.2.2).

4.1.3.1 Koimmunpräzitationsstudien zwischen den LIMP-2-H363-Mutanten und der β -Glukocerebrosidase

Um die neu hergestellten LIMP-2-H363-myc-Mutanten (Abschnitt 3.2.3.7) auf ihre Bindungsintensitäten zur β -Glukocerebrosidase zu untersuchen, wurde erneut mit einer Koimmunpräzitationsstudie begonnen. Dazu wurden COS-7-Zellen sowohl mit der humanen β -Glukocerebrosidase als auch den jeweiligen LIMP-2-myc-Konstrukten transfiziert. Als Kontrolle zur Detektion unspezifisch an die Sepharose-*Beads* oder den myc-9B11 Antikörper gebundener β -Glukocerebrosidase wurde eine Probe verwendet, in der nur die β -Glukocerebrosidase alleine exprimiert wurde. Wie sich herausstellte, interagierte die zudem schwach exprimierte LIMP-2-H363K-myc-Mutante tendenziell wesentlich stärker mit der β -Glukocerebrosidase als LIMP-2-myc, während die LIMP-2-H363A-myc Mutante eine zu LIMP-2-myc vergleichbare Bindungskapazität aufwies (Abbildung 4.5 A und B). Eine regulatorische Funktion des Histidins an Position 363 in der pH-Wert-abhängigen Interaktion von LIMP-2 und der β -Glukocerebrosidase konnte mit dem verwendeten Modell also nicht bestätigt werden.

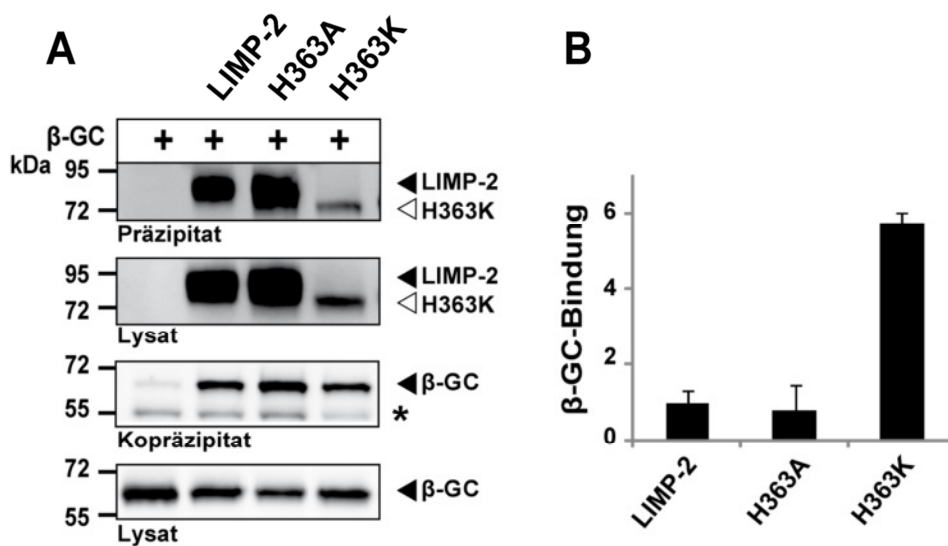


Abbildung 4.5: Die Mutation des klinisch relevanten LIMP-2 Histidinrests 363 zu Lysin intensiviert die Interaktion zur β -Glukocerebrosidase. A) Mit β -Glukocerebrosidase und LIMP-2-myc bzw. LIMP-2-H363A-myc oder LIMP-2-H363K-myc kotransfizierte COS-7-Zellen wurden entweder direkt oder nach einer Koimmunpräzipitation mit einem myc-Antikörper (α -myc-9B11) auf ein SDS-Gel aufgetragen. Auf dem dargestellten Westernblot wurden die β -Glukocerebrosidase bzw. die LIMP-2-myc-Konstrukte mit spezifischen Antikörpern (α -GC8E4, α -myc-9B11) detektiert. B) Zusammenfassung der erhobenen densitometrischen Westernblotanalysen von 3 unabhängig voneinander, wie unter A) beschrieben, durchgeführten Koimmunpräzipitationen. Die Balken stellen die Mittelwerte der pro Experiment erhaltenen β -Glukocerebrosidase-/LIMP-2-Konstrukt-Verhältnisse dar. Die Einzelwerte wurden je zum β -Glukocerebrosidase-/LIMP-2-myc-Mittelwert normalisiert. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen der erhaltenen Mittelwerte. Im Fall der LIMP-2-H363K-myc-Mutante zeigte sich eine intensivierete β -Glukocerebrosidase-/LIMP-2-H363K-myc-Interaktion. * = schwere Kette des α -myc-9B11 Antikörpers bei 55 kDa.

4.1.3.2 Bestimmung der intrazellulären Lokalisation der LIMP-2-H363-Mutanten

Auf Grund der verstärkten Bindung der LIMP-2-H363K-myc Mutante zur β -Glukocerebrosidase sollte überprüft werden, wo sich die beiden Mutanten innerhalb der Zellen befinden. Denn wie schon unter Abschnitt 4.1.2 beschrieben, können fehllokalisierte Proteine fehlgefaltet sein und daraufhin andere Bindungseigenschaften besitzen.

Für die Lokalisationsstudie wurden die jeweiligen LIMP-2-H363-myc-Mutanten einzeln in COS-7-Zellen überexprimiert und mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie analysiert. Während die LIMP-2-H363A-myc-Mutante mit dem lysosomalen Protein LAMP-2 kolokalisierte, wurde die LIMP-2-H363K-myc-Mutante im ER zurückgehalten und kolokalisierte mit KDEL-Motiv enthaltenden ER-Proteinen (Abbildung 4.6 A u. B).

Da die Kolokalisation zwischen der LIMP-2-H363K-myc Mutante und KDEL-markierten Proteinen nicht im gesamten endoplasmatischen Retikulum sichtbar war (Abbildung 4.6 B), wurde untersucht, ob die Mutante zumindest teilweise das ER verlässt.

Für die Kolokalisationsstudien im frühen sekretorischen Weg wurde die LIMP-2-H363K-myc-Mutante erneut in COS-7-Zellen überexprimiert und auf einzelnen Objektträgern mit dem ERGIC-53-Protein oder dem *cis*-Golgi-130-Protein kogefärbt. Für die Untersuchung, ob die LIMP-2-H363K-Mutante eine teilweise lysosomale Lokalisation zeigt oder ob ihre veränderte Verteilung möglicherweise einen Einfluss auf die Lokalisation der endogenen β -Glukocerebrosidase hat, wurde eine Kofärbung mit dieser durchgeführt.

Eine Lokalisation der Mutante konnte sowohl im ER-Golgi-*Intermediate-Compartment* als auch im *cis*-Golgiapparat teilweise detektiert werden, was auf einen geringfügigen Transport der Mutante über das ER hinaus spricht (Abbildung 4.6 C und D). Die Kolokalisationsstudie der LIMP-2-H363K-myc-Mutante mit endogener β -Glukocerebrosidase konnte zudem zeigen, dass sich die Mutante nicht in den Lysosomen aufhält und im *steady state* keinen Einfluss auf die endogene β -Glukocerebrosidase ausübt (Abbildung 4.6 E).

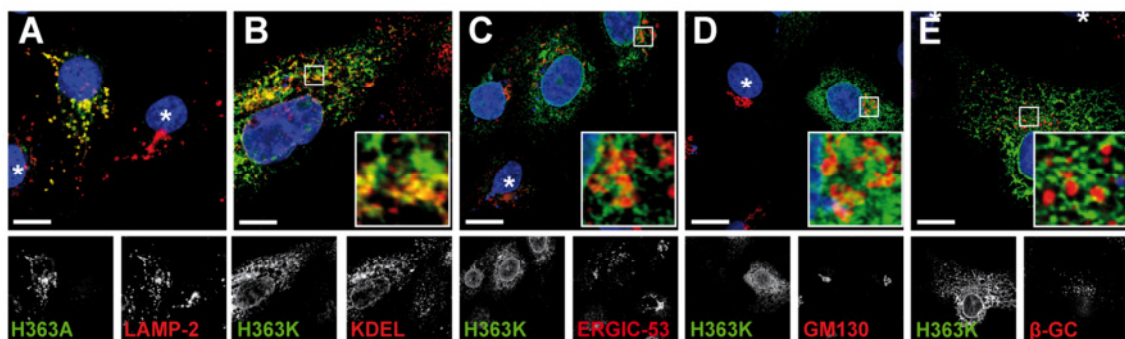


Abbildung 4.6: Lokalisation der LIMP-2-H363-Mutanten innerhalb der Zelle. Mit LIMP-2-H363A-myc oder LIMP-2-H363K-myc transfizierte und anschließend fixierte COS-7-Zellen wurden mit den angegebenen Antikörpern inkubiert und mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop analysiert. A) Kolokalisation der LIMP-2-H363-A-myc Mutante (α -myc9B11) mit dem lysosomalen Protein LAMP-2 (α -LAMP-2-H4B4). B)–D) Kolokalisationsstudien der LIMP-2-H363K-myc Mutante mit Markern des frühen sekretorischen Weges. B) zeigt eine teilweise Kolokalisation mit KDEL-Motiv markierten ER-Proteinen (α -KDEL). C) Kolokalisation der Mutante mit dem ERGIC-53-Protein (α ERGIC-53). D) Kolokalisation der Mutante mit dem *cis*-Golgi-130-Protein GM130 (α -GM130). E) Kofärbung der LIMP-2-H363K-myc Mutante mit endogener β -Glukocerebrosidase zur Untersuchung auf lysosomale Lokalisation. Detektion mit einem α -GC8E4 Antikörper. Bei den Teilabbildungen in B)–E) handelt es sich jeweils um eine 5-fache Vergrößerung der korrespondierenden Ausschnitte. * = untransfizierte Zelle; Größenmarker = 10 μ m.

4.1.3.3 Detaillierte Untersuchung des Einflusses der LIMP-2-H363K-myc-Mutante auf die endogene β -Glukocerebrosidase

Um auch auf Westernblotebene zu untersuchen, ob die LIMP-2-H363K-myc-Mutante nur den frühen sekretorischen Bereich passiert und möglicherweise anteilig in der Lage ist, endogene β -Glukocerebrosidase im ER zurückzuhalten, wurden Zelllysate von LIMP-2-myc und LIMP-2-H363K-myc überexprimierenden COS-7-Zellen einem Verdau ihrer Zuckerreste unterzogen (Abschnitt 3.5.6).

Während PNGase F zum Verdau aller Zuckerreste des Proteins eingesetzt wurde, sollte Endoglykosidase H nur die mannosereichen Zucker der Proteine verdauen. Somit sind zwar alle glykosylierten Proteine PNGase F sensitiv und der Verdau bringt das unglykosylierte Rückgrat hervor, aber nur die im ER zurückgehaltenen sowie die noch unreifen sekretorischen oder lysosomalen Proteine innerhalb des sekretorischen Weges sind sensitiv gegenüber Endoglykosidase H (Trimble et al, 1978).

Der Vergleich von deglykosyliertem LIMP-2-myc zu deglykosyliertem LIMP-2-H363K-myc ergab, dass nur die LIMP-2-H363K-myc Mutante sowohl PNGaseF als auch vollständig Endoglykosidase H sensitiv war (Abbildung 4.7 Spuren 7-9). Das myc-markierte Wildtyp-LIMP-2 konnte hingegen, wie auch in der Literatur für LIMP-2 beschrieben, nur geringfügig durch Endoglykosidase H verdaut werden (Abbildung 4.7 Spur 2; (Barriocanal et al, 1986).

Die in den unbehandelten Zellen (Abbildung 4.7 Spuren 1-3 und 7-9) sowohl zu LIMP-2-myc als auch zu LIMP-2-H363K-myc korrespondierenden Banden der endogenen β -Glukocerebrosidase zeigten, dass diese in beiden Fällen prominente Endoglykosidase H resistente und nur geringfügig unreife Formen vorzuweisen hatten (Abbildung 4.7 Spur 2 und 8). Jedoch schien die generelle Expression der β -Glukocerebrosidase in den LIMP-2-H363K-myc transfizierten Zellen reduziert zu sein (Abbildung 4.7 Spur 8).

Eine Behandlung der Zellen mit dem proteasomalen Inhibitor MG-132 konnte allerdings einen stärkeren Rückhalt der β -Glukocerebrosidase im ER hervorrufen (Abschnitt 3.3.7; Abbildung 4.7 Spuren 5 und 11). Die Berechnung der anteilig im ER verbliebenen β -Glukocerebrosidase (Ron & Horowitz, 2005) in den Spuren 5 und 11 ergab einen etwa doppelt so hohen Anteil der β -Glukocerebrosidase im ER, wenn die Zellen statt mit LIMP-2-myc mit der LIMP-2-H363K-myc-Mutante transfiziert wurden.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die humane LIMP-2-H363K-myc-Mutante im Gegensatz zu LIMP-2-myc auch in der Lage ist, endogene β -Glukocerebrosidase stärker an sich zu binden, wenn zuvor ein verstärkter gemeinsamer Abbau durch proteasomale Inhibition unterbunden wurde.

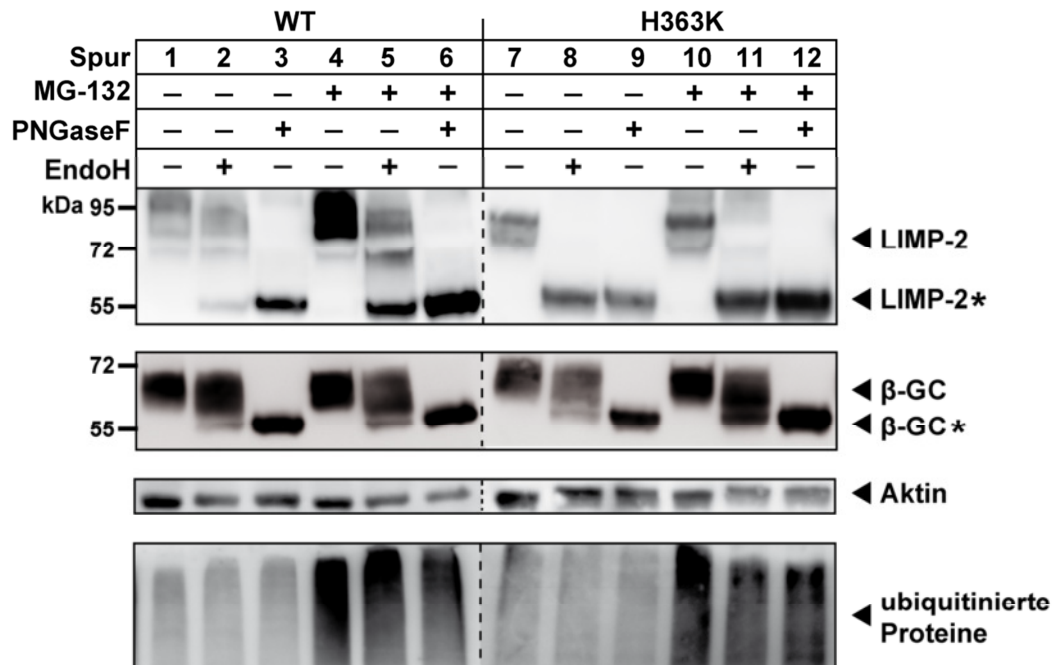


Abbildung 4.7: Einfluss der ER-residenten LIMP-2-H363K Mutante auf endogene β -Glukocerebrosidase. Westernblotanalyse von LIMP-2-myc und LIMP-2-H363K-myc transfizierten COS-7 Zellen mit (Spuren 10-12) oder ohne (Spuren 4-6) vorheriger proteasomaler Inhibition mittels MG-132. Gleichmäßige Beladung des Gels mit je 40 μ g Lysat, das entweder keinem (Spuren 1, 4, 7, 10), einem Endo H (Spuren 2, 5, 8, 11) oder einem PNGase F (3,6,9,12) Verdau unterzogen wurde, um reife von unreifen sowie unglykosylierten LIMP-2- bzw. β -Glukocerebrosidase-Formen zu unterscheiden. Detektion von LIMP-2 mit einem α -myc-9B11 und von β -Glukocerebrosidase mit einem α -GC8E4 Antikörper. Gleichmäßige Gelbeladung wurde mit einem α -Aktin Antikörper und erfolgreiche proteasomale Inhibition mit einem Antikörper gegen Ubiquitin (α -Ubiquitin) nachgewiesen. *= unreife ER-Form. Zur Berechnung der in den Spuren 8 und 11 im ER befindlichen β -Glukocerebrosidase wurde das Verhältnis des densitometrisch ermittelten Signals der unreifen β -GC* zum Signal der gesamten β -GC (β -GC+ β -GC*) in der selben Spur (Ron & Horowitz, 2005) ermittelt (siehe Text).

4.1.3.4 Reduktion der LIMP-2-H363K-myc-/ β -GC-Bindungsintensität durch Mutation der LIMP-2-coiled-coil-Domäne

Um in einem letzten Schritt die Frage zu beantworten, ob die verstärkte Bindungskapazität der LIMP-2-H363K-myc-Mutante möglicherweise nur auf eine komplette Fehlfaltung des mutierten Proteins zurückzuführen war, wurde eine weitere Koimmunpräzipitation mit einer in ihrer putativen *coiled-coil*-Domäne mutierten LIMP-2-H363K-myc-Mutante durchgeführt.

Innerhalb dieser LIMP-2-L160P-H363K-myc-Mutante ist die *coiled-coil*-Domäne durch den Austausch eines Leucins zu einem Prolin zerstört, weshalb eine Reduktion der Bindungsintensität zur β -Glukocerebrosidase zu vermuten wäre.

Für die erneuten Interaktionsstudien wurden COS-7-Zellen sowohl mit LIMP-2-H363K-myc oder LIMP-2-L160P-H363K-myc als auch mit der β -Glukocerebrosidase transfiziert und einer Koimmunpräzipitation mit anschließender densitometrischer Westernblotanalyse unterzogen (Abbildung 4.8). Die Daten konnten zeigen, dass die Zerstörung der *coiled-coil*-Domäne innerhalb der LIMP-2-H363K-myc-Mutante wieder eine Reduktion der Bindungsintensität zur β -Glukocerebrosidase zur Folge hatte, was darauf hindeutet, dass die intensivierete LIMP-2-H363K-myc/ β -Glukocerebrosidase-Interaktion nicht auf ein Artefakt durch komplette Fehlfaltung der LIMP-2-Mutante zurückzuführen war.

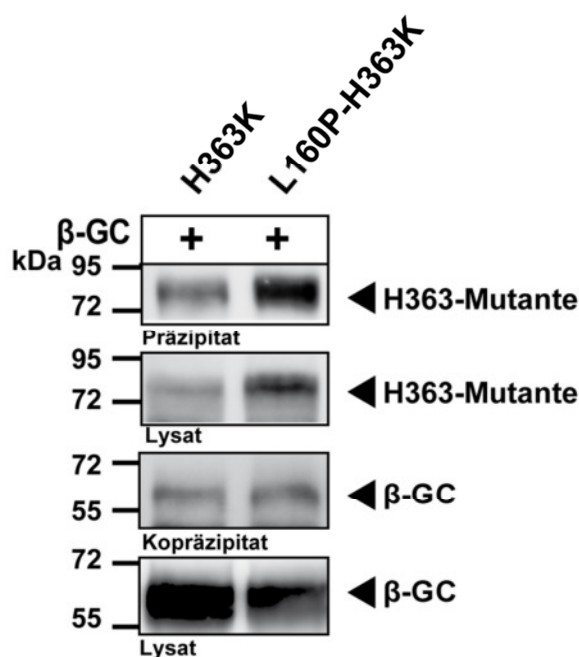


Abbildung 4.8: Veränderung der Bindungseigenschaften der LIMP-2-H363K-Mutante nach Zerstörung der vermuteten LIMP-2-*coiled-coil*-Domäne. A) Mit β -Glukocerebrosidase und LIMP-2-H363K-myc oder LIMP-2-L160P-H363K-myc kotransfizierte und einer Koimmunpräzipitation mit einem α -myc-9B11 Antikörper unterzogene COS-7 Zellysate. Totallysate und Präzipitate wurden auf einem SDS-Gel separiert und mit einem β -Glukocerebrosidase (α -GC8E4) bzw. myc-Antikörper (α -myc-9B11) detektiert. Eine vergleichende densitometrische Westernblotanalyse der LIMP-2-H363K-Mutanten ergab eine Reduktion der Bindungsintensität zur β -Glukocerebrosidase durch Einfügen der L160P-Mutation.

Die vorliegenden Ergebnisse präsentieren eine nähere Charakterisierung des klinisch wichtigen LIMP-2-Histidin-363-Rests. Vieles deutet darauf hin, dass er keine Rolle in der pH-Wert-abhängigen Bindung zur β -Glukocerebrosidase spielt. Jedoch erschwert die Tatsache, dass der zu Lysin mutierte H363-Rest eine ER-Retention des LIMP-2-Proteins verursacht, eine Untersuchung mit dem verwendeten Alanin/ Lysin-Mutationssystem.

Um nach weiteren LIMP-2-Histidinresten zu suchen, die möglicherweise in der pH-Wert-abhängigen LIMP-2-/ β -Glukocerebrosidase-Interaktion eine Rolle spielen, wurde zunächst die Region innerhalb des LIMP-2-Proteins definiert, die neben der putativen *coiled-coil*-Domäne essentiell für die Bindung zur β -Glukocerebrosidase ist.

4.1.4 Bestimmung der pH-sensitiven Domäne des LIMP-2-Proteins

Um herauszufinden, welcher der insgesamt acht Histidinreste im luminalen Bereich von LIMP-2 für die pH-sensitive Bindung von β -Glukocerebrosidase verantwortlich ist, wurde zunächst der für die Interaktion beider Proteine erforderliche Bereich innerhalb des LIMP-2-Proteins festgelegt. Bisher konnte eine algorithmisch ermittelte *coiled-coil*-Domäne innerhalb des LIMP-2-Proteins (Aminosäurereste 152-167) als essentiell für die Interaktion zur β -Glukocerebrosidase definiert werden (Reczek et al, 2007). Jedoch zeigt auch eine klinische LIMP-2-Trunktionsmutante (LIMP-2-W178X), die zwar stark verkürzt ist, aber die *coiled-coil*-Domäne enthält, eine reduzierte Bindungskapazität zur β -Glukocerebrosidase (Blanz et al, 2010). Daher ist davon auszugehen, dass es möglicherweise einen über die *coiled-coil*-Domäne hinausgehenden Bereich gibt, der in die Bindung zur β -Glukocerebrosidase involviert ist.

Da im Entstehungsprozess dieser Arbeit eine weitere klinische LIMP-2-Mutante beschrieben wurde, die hinter Tyrosin 222 einen Abbruch erfährt (Dibbens et al, 2009), sollte in dieser Arbeit zunächst eine Interaktionsstudie zwischen der LIMP-2-Y222X-Mutante und der β -Glukocerebrosidase dazu dienen, den Bindungsbereich weiter einzugrenzen.

Somit wurde zunächst überprüft, wo die LIMP-2-Y222X-Mutante innerhalb der Zelle lokalisiert ist. Hierzu wurden COS-7-Zellen mit einer myc-markierten LIMP-2-Y222X-Mutante transfiziert und einer Kolo-kalisationstudie mit KDEL-markierten Proteinen unterzogen. So konnte eine ER-Lokalisation der Mutante ausgemacht werden (Abbildung 4.9 A).

Die anschließende Durchführung einer Koimmunpräzipitation zwischen LIMP-2-Y222X-myc und überexprimierter β -Glukocerebrosidase in COS-7-Zellen konnte im Westernblot zeigen, dass das nur 222 Aminosäuren umfassende LIMP-2-Y222X-myc Protein ausreichte, um die β -Glukocerebrosidase zu kopräzipitieren (Abbildung 4.9 B). Die durchgeführten densitometrischen Westernblotanalysen ergaben, dass gegenüber LIMP-2-myc transfizierten Zellen etwa eine verdoppelte Menge an β -Glukocerebrosidase durch die Mutante gebunden wurde (Abbildung 4.9 C).

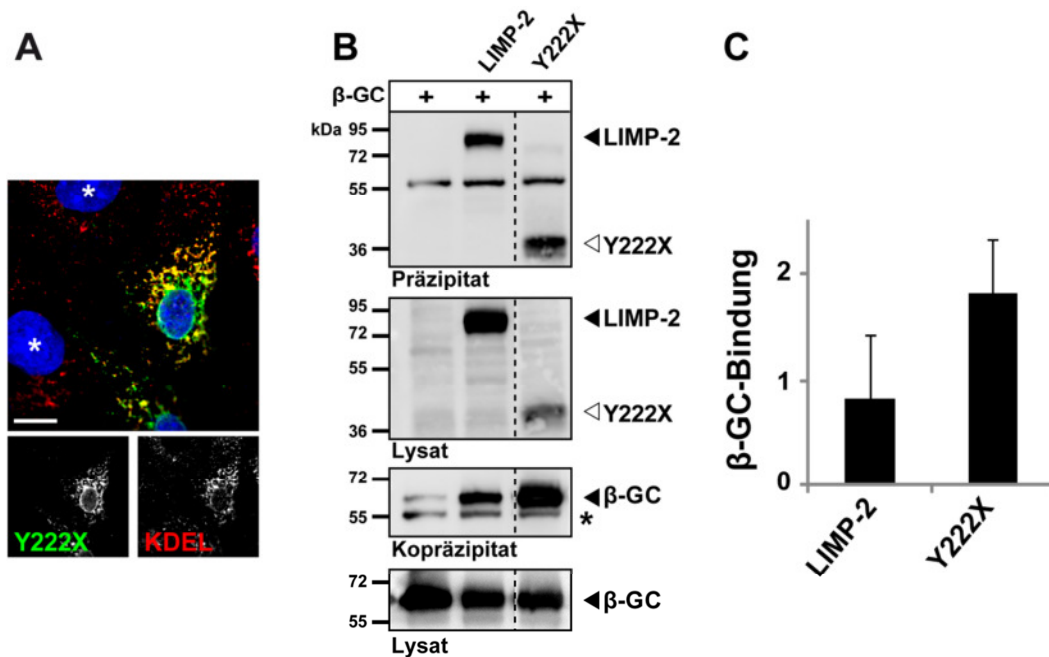


Abbildung 4.9: ER-Lokalisation der myc-markierten klinischen LIMP-2-Y222X-Mutante und ihre verstärkte Bindung zur β -Glukocerebrosidase. A) LIMP-2-Y222X-myc überexprimierende COS-7-Zellen wurden fixiert und nach Kofärbung mit dem ER-Marker KDEL (α -KDEL) mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie visualisiert. * = untransfizierte Zelle B) Mit β -Glukocerebrosidase und LIMP-2-myc bzw. LIMP-2-Y222X-myc kotransfizierte und einer Koimmunpräzipitation durch einen α -myc-9B11 Antikörper unterzogene COS-7 Zellen. Totallysate und Präzipitate wurden auf einem SDS-Gel separiert und mit einem Antikörper gegen humane β -Glukocerebrosidase (α -GC8E4) bzw. das myc-Epitop (α -myc-9B11) auf einem Westernblot sichtbar gemacht. C) Zusammenfassung der erhobenen densitometrischen Westernblotanalysen von 5 unabhängig voneinander, wie unter B) beschrieben, durchgeführten Koimmunpräzipitationen. Die Balken stellen die Mittelwerte der in den Experimenten erhaltenen β -Glukocerebrosidase/LIMP-2-Konstrukt Verhältnisse dar. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen der erhaltenen Mittelwerte. In allen Experimenten zeigte sich eine im Vergleich zur β -Glukocerebrosidase /LIMP-2-myc-Interaktion stark intensivierte β -Glukocerebrosidase /LIMP-2-Y222X-myc-Interaktion. * = schwere Kette des α -myc-9B11 Antikörpers bei 55 kDa

Mit dieser Interaktionsstudie konnte der für die β -Glukocerebrosidase-Bindung erforderliche Bereich auf die LIMP-2-Region zwischen der *coiled-coil* Domäne und dem Tyrosinrest 222 eingegrenzt werden. Die Suche nach einem möglicherweise in die pH-Wert-abhängige Interaktion von LIMP-2 und der β -Glukocerebrosidase involvierten Histidinrest sollte demnach innerhalb dieser Domäne fortgesetzt werden.

4.1.5 In der LIMP-2-Domäne zur Bindung von β -Glukocerebrosidase befinden sich drei Histidinreste

Um festzustellen, wie viele Histidinreste in dem Bereich zwischen *coiled-coil*-Motiv und dem Tyrosinrest 222 liegen, wurde die LIMP-2-Sequenz von 8 Vertebraten verglichen. In der gesamten Region befinden sich maximal drei Histidinreste an den Positionen 150, 171 und 189, von denen jedoch Histidin 150 nicht konserviert ist und sich in einer von 4 hochvariablen Regionen innerhalb des LIMP-2-Proteins befindet (Chen et al, 2012); Abbildung 4.10).

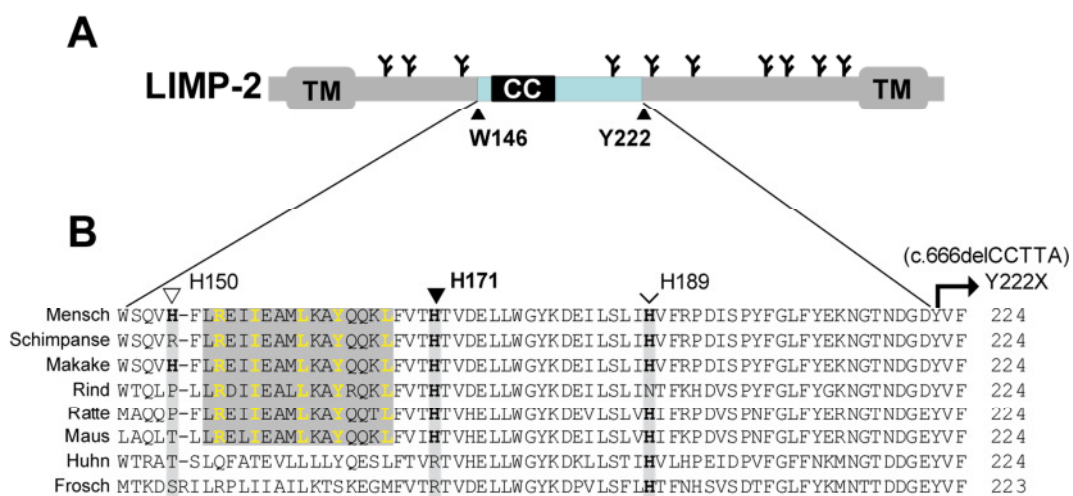


Abbildung 4.10: Histidinreste innerhalb der, für die β -Glukocerebrosidase-Bindung, erforderlichen Region im LIMP-2-Protein. A) Darstellung von humanem LIMP-2 mit dem, in Türkis markierten Bereiche in LIMP-2, der für die β -Glukocerebrosidase-Interaktion nötig ist. Hervorgehobene Reste markieren Trunkationsstellen klinisch relevanter LIMP-2-Mutanten. CC=coiled-coil-Domäne. B) Sequenzvergleich des Türkis markierten LIMP-2-Sequenzbereichs aus A) von acht verschiedenen Wirbeltierspezies. Die coiled-coil-Domäne ist grau hinterlegt, gelbe Aminosäuren stellen die für coiled-coil Motive charakteristischen Reste dar. Alle Histidinreste in der Binderegion sind in Fett hervorgehoben und die Position ist angegeben. Der klinisch relevante Tyrosinrest an Position 222 ist samt Genmutation hervorgehoben. Sequenzvergleich mit der Clustal W Berechnungsmethode des Seq-Align-Programms der DNASTAR-Software (Lasergene, Madison, WI, US).

Bevor mit den Interaktionsstudien der nur in den einzelnen Histidinresten mutierten LIMP-2-Mutanten und der β -Glukocerebrosidase begonnen wurde, wurde zunächst eine, in der definierten Bindungsregion putativ pH-Wert-unabhängige, LIMP-2-Mutante hergestellt und auf Anwendbarkeit überprüft.

4.1.6 Untersuchung einer in ihrer Bindedomäne putativ pH-insensitiven LIMP-2-Mutante

Um zu untersuchen, wie sich eine, nur in der definierten Bindungsregion putativ pH-Wert-unabhängige LIMP-2-Mutante in ihrer Bindung zur β -Glukocerebrosidase verhält, wurde die

in den Histidinresten 150, 171 und 189 zu Alanin mutierte LIMP-2-3xHisFree-Ala-myc-Mutante und eine im Rest 171 wieder zurück zu Histidin mutierte LIMP-2-3xHisFree-A171H-myc-Mutante (Abschnitt 3.2.3.7) zunächst auf ihre Lokalisation innerhalb der Zelle untersucht. Dafür wurden die Mutanten in COS-7-Zellen überexprimiert und am Laser Scanning-Mikroskop analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass die LIMP-2-3xHisFree-Ala-myc-Mutante nicht vollständig in die Lysosomen transportiert wurde (Abbildung 4.11 A und B). Erst der A171H-Austausch brachte eine lysosomal lokalisierte LIMP-2-Mutante hervor (Abbildung 4.11 C).

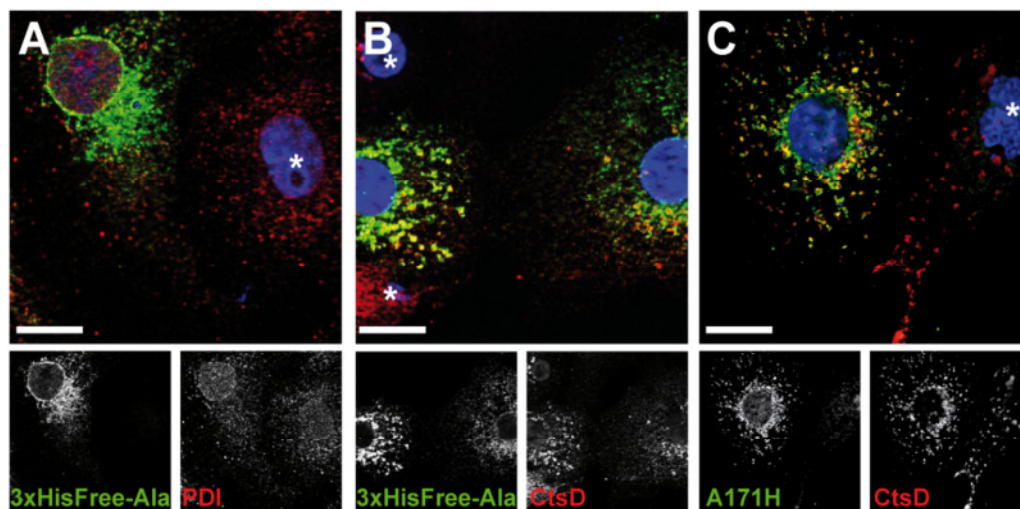


Abbildung 4.11: Lokalisation von LIMP-2 nach Substitution der Histidinreste innerhalb der Binderegion zu Alanin. Die in H150, H171 und H189 zu Alanin mutierte LIMP-2-3xHisFreeAla-myc-Mutante (3xHisFreeAla) überexprimiert in COS-7-Zellen und kofärbt mit A) Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) oder B) Cathepsin D, (CtsD) zeigt eine nur anteilige lysosomale Lokalisation. C) Die in H150 und H189 zu Alanin mutierte LIMP-2-3xHisFreeA171H-myc-Mutante (A171H) wurde in COS-7-Zellen überexprimiert und war in einer Kofärbung mit Cathepsin D hauptsächlich in vesikulären Strukturen zu finden. Detektion der myc-Epitope mit α -myc-9B11 Antikörper, der PDI mit α -PDI-Sc- und von Cathepsin D mit α -CtsD-Antikörper; *= untransfizierte Zelle; Größemarker = 10 μ m.

Wenn auch informativ für die allgemeine LIMP-2-Struktur, bedeutete die ER-Retention des in den Histidinresten 150, 171 und 189 zu Alanin mutierten LIMP-2-Proteins, dass eine Interaktionsstudie mit der β -Glukocerebrosidase im Vergleich zu Wildtyp-LIMP-2 aus den schon erwähnten Gründen (Abschnitt 4.1.2) nicht möglich war. Daher wurde in diesem Fall von einer Interaktionsstudie abgesehen und die Histidinreste innerhalb der eingegrenzten Binde-domäne einzeln mutiert, um sie auf ihre Interaktion zur β -Glukocerebrosidase zu untersuchen.

Da es sich bei dem Histidin an Position 171 im LIMP-2-Protein um einen, besonders unter Säugetieren stark konservierten Rest handelt, wurde der Fokus zunächst auf diesen Rest gelegt.

4.1.7 Analyse des unter Säugetieren hoch konservierten LIMP-2-H171-Rests

Wie die Untersuchungen am Histidinrest 363 des LIMP-2-Proteins zeigen konnten, erschweren Mutationen, die die LIMP-2-Struktur beeinträchtigen, eine auf die pH-Wert-Abhängigkeit der Bindung bezogene Interpretation der Interaktionsstudien mit der β -Glukocerebrosidase (Abschnitt 4.1.3). Deshalb war es wichtig, vor Beginn der Interaktionsstudien zwischen β -Glukocerebrosidase und den, im Histidinrest 171 zu Alanin oder Lysin mutierten, LIMP-2-Proteinen herauszufinden, ob solche LIMP-2-Mutanten sortiert werden.

Dazu wurden die LIMP-2-H171A-myc- und die LIMP-2-H171K-myc-Mutante je in COS-7-Zellen überexprimiert und eine Kofärbung mit dem lysosomalen Protein LAMP-2 konnte beide als lysosomal identifizieren (Abbildung 4.12 A und B). Auch die Koexpression jeder Mutante mit einem humanen, HA-markierten Wildtyp-LIMP-2 konnte bestätigen, dass die Mutanten in denselben vesikulären Strukturen wie Wildtyp-LIMP-2-HA zu finden waren (Abbildung 4.12 A₁ und B₁).

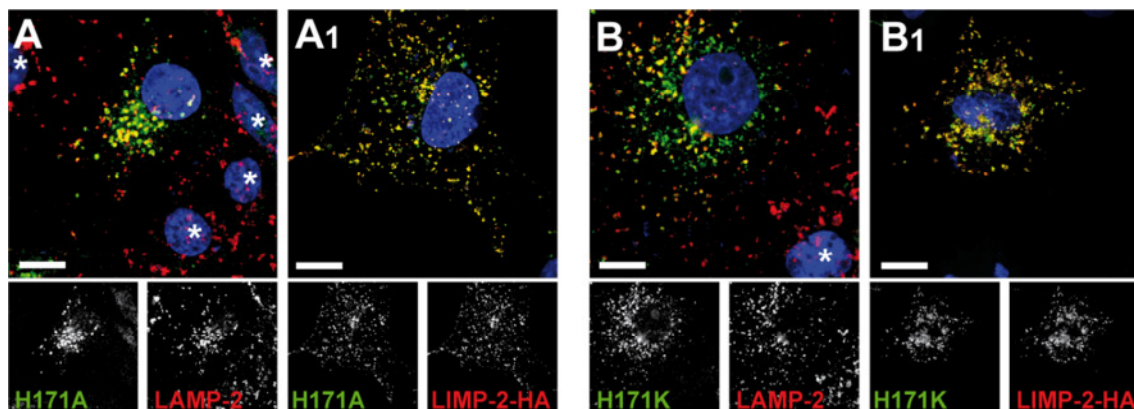


Abbildung 4.12: Lyso-somale Lokalisation und LIMP-2-Kolokalisation der humanen LIMP-2-H171-myc-Mutanten. A) LIMP-2 H171A-myc bzw. B) LIMP-2H171K-myc überexprimierende COS-7-Zellen wurden fixiert und nach Kofärbung mit dem lysosomalen Membranprotein LAMP-2 mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie visualisiert. A₁) und B₁) stellen ebenfalls LIMP-2 H171A-myc bzw. LIMP-2-H171K-myc transfizierte COS-7-Zellen dar, die zusätzlich mit einem HA-markierten Wildtyp-LIMP-2 kotransfiziert wurden. Detektion der myc- bzw. HA-Epitope mit einem α -myc-9B11 bzw. α -HA-3F10 Antikörper und des LAMP-2 Proteins mit einem α -LAMP-2-H4B4 Antikörper; Größenmarker = 10 μ m; *= untransfizierte Zelle.

4.1.7.1 Koimmunpräzitationsstudien zwischen den LIMP-2-H171-Mutanten und der β -Glukocerebrosidase

Da beide LIMP-2-H171-myc-Mutanten kolokalisierend mit Wildtyp-LIMP-2 in den Lysosomen gefunden werden konnten, wurde das unter Abschnitt 1.2.2 und 4.1.3 ausführlich beschriebene Modell zur Untersuchung pH-sensitiver Aminosäuren auch im Fall der neuen Mutanten angewendet.

Für die Interaktionsstudien wurden COS-7-Zellen sowohl mit der β -Glukocerebrosidase als auch mit der LIMP-2-H171A-myc- oder der LIMP-2-H171K-myc-Mutante transfiziert. Anhand der anschließenden Koimmunpräzitation der β -Glukocerebrosidase durch die LIMP-2-H171-myc-Mutanten konnte gezeigt werden, dass der Austausch des Histidins zu einem nicht geladenen Alaninrest eine tendenziell stärkere Bindung der β -Glukocerebrosidase zur Folge hatte, während der Austausch zu einem konstant geladenen Lysinrest die Interaktion tendenziell reduzierte (Abbildung 4.13). Dieser Trend verdeutlicht, dass es sich bei dem LIMP-2-H171-Rest um einen wichtigen Histidinrest für die Regulation der pH-Wert-abhängigen LIMP-2/ β -Glukocerebrosidase-Interaktion handeln könnte.

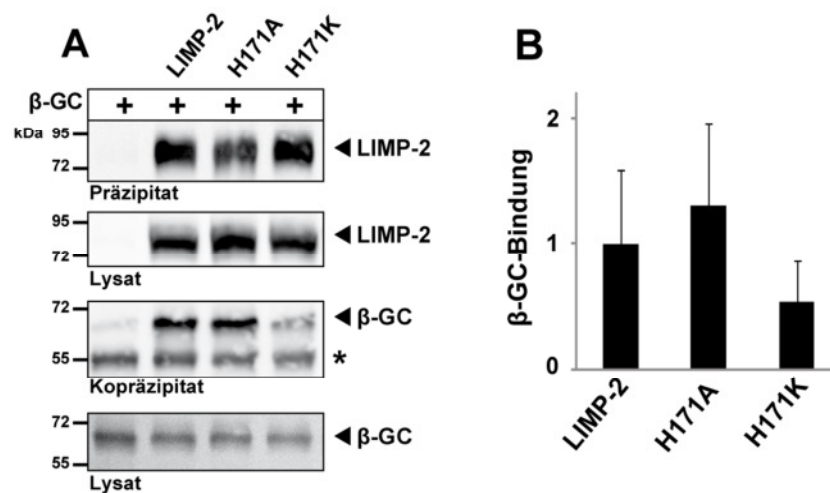


Abbildung 4.13: Mutationen in dem pH-sensitiven LIMP-2 Histidinrest 171 verändern die Interaktion zur β -Glukocerebrosidase. A) Mit der β -Glukocerebrosidase und LIMP-2-myc bzw. LIMP-2-H171A- oder LIMP-2-H171K-myc kotransfizierte und einer Koimmunpräzitation mit einem α -myc-9B11 Antikörper unterzogene COS-7 Zelllysate. Totallysate und Präzipitate wurden auf einem SDS-Gel separiert und mit einem Antikörper gegen die β -Glukocerebrosidase (α -GC8E4) bzw. einem α -myc-9B11 Antikörper auf einem Westernblot detektiert. B) Zusammenfassung der erhobenen densitometrischen Westernblotanalysen von 6 unabhängig voneinander, wie unter A) beschrieben, durchgeführten Koimmunpräzitationen. Die Balken stellen die Mittelwerte der in den Experimenten erhaltenen β -Glukocerebrosidase/LIMP-2-Konstrukt Verhältnisse dar. Einzelwerte wurde je zum β -Glukocerebrosidase /LIMP-2-myc-Mittelwert normalisiert. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen der erhaltenen Mittelwerte. * = schwere Kette des myc-9B11 Antikörpers bei 55 kDa.

4.1.7.2 Der lysosomale Transport einer klinischen β -Glukocerebrosidase-Mutante durch LIMP-2-H171A und LIMP-2-H171K

Um zu untersuchen, ob die LIMP-2-H171-Mutationen und ihre veränderten Bindungskapazitäten auch Auswirkungen auf den Transport einer gut charakterisierten, mit Morbus Gaucher assoziierten β -Glukocerebrosidase-Mutante haben können, wurden Immunfluoreszenzuntersuchungen durchgeführt. Bei der β -GC-L444P-Mutante handelt es sich um ein fehlgefaltetes Protein, das normalerweise im ER bleibt und dort schnell abgebaut wird (Bendikov-Bar et al, 2010). Nur die Gabe bestimmter enzymstabilisierender oder das Proteasom inhibierender Substanzen sowie die Überexpression des Transportrezeptors LIMP-2 konnten bisher als transportfördernd beschrieben werden (Bendikov-Bar et al, 2010; Maegawa et al, 2009; Reczek et al, 2007).

Für das Experiment wurden COS-7-Zellen mit einer murinen β -Glukocerebrosidase-L444P-Mutante (β -GC-L444P) und den humanen LIMP-2-H171-myc-Mutanten oder LIMP-2-myc transfiziert (Vergleiche Abschnitt 3.4.1). Die anschließend durchgeführte Immunfluoreszenz konnte zeigen, dass ausschließlich β -GC-L444P transfizierte Zellen die bekannte ER-Lokalisation der Mutante zeigten (Abbildung 4.14). Ein Vergleich der β -GC-L444P-Lokalisation in den doppelt transfizierten Zellen konnte zeigen, dass neben dem Wildtyp-LIMP-2 auch die beiden LIMP-2-H171-myc-Mutanten in der Lage waren die Mutante aus dem ER in die Lysosomen zu transportieren.

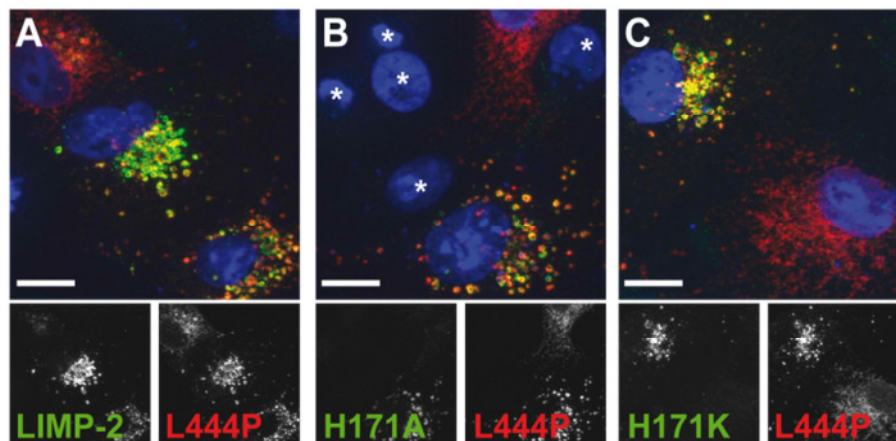


Abbildung 4.14: Lysosomaler Transport der Morbus Gaucher assoziierten β -GC-L444P-Mutante durch die LIMP-2-H171 Mutanten. Mit der β -GC-L444P-Mutante und A) LIMP-2-myc, B) LIMP-2-H171A-myc bzw. C) LIMP-2-H171K-myc kotransfizierte COS-7-Zellen wurden fixiert und mit einem Antikörper gegen murine β -Glukocerebrosidase (α -GC1341) und einem α -myc-9B11 Antikörper inkubiert. Die Kofokalisation der LIMP-2-Varianten und der β -Glukocerebrosidase-Mutante wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops der Firma Zeiss visualisiert. * = untransfizierte Zelle; Größenmarker = 10 μ m.

Mit diesem Experiment konnte zunächst gezeigt werden, dass die reduzierte Bindekapazität der immer geladenen LIMP-2-H171K-myc-Mutante offensichtlich ausreicht, um die β -GC-L444P-Mutante in die Lysosomen zu transportieren.

Um diesen Effekt auch auf endogener Ebene zu untersuchen wurde ein ähnliches Experiment in LIMP-2-defizienten Zellen durchgeführt.

4.1.7.3 Der lysosomale Transport der β -Glukocerebrosidase durch LIMP-2-H171A- und LIMP-2-H171K in LIMP-2-defizienten Zellen

Um zu untersuchen, ob die LIMP-2-H171-Mutanten und ihre veränderten Bindungskapazitäten Auswirkungen auf den Transport der fehllokalisierten β -Glukocerebrosidase aus LIMP-2-defizienten Zellen haben (Abschnitt 1.3.2.1.1), wurde der Einfluss der murinen LIMP-2-H171A-myc- und LIMP-2-H171K-myc-Mutanten auf die Lokalisation der endogenen β -Glukocerebrosidase in murinen LIMP-2-defizienten Fibroblasten überprüft.

Zu diesem Zweck wurden die LIMP-2-defizienten Zellen nach Transfektion mit LIMP-2-H171A-myc oder LIMP-2-H171K-myc in der Immunfluoreszenz mit endogener β -Glukocerebrosidase kofärbt und unter einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop visualisiert. Es stellte sich heraus, dass neben der stärker interagierenden LIMP-2-H171A-Mutante auch die schwächer bindende LIMP-2-H171K Mutante in der Lage war, β -Glukocerebrosidase in die Lysosomen der LIMP-2-defizienten Zellen zu transportieren (Abbildung 4.15).

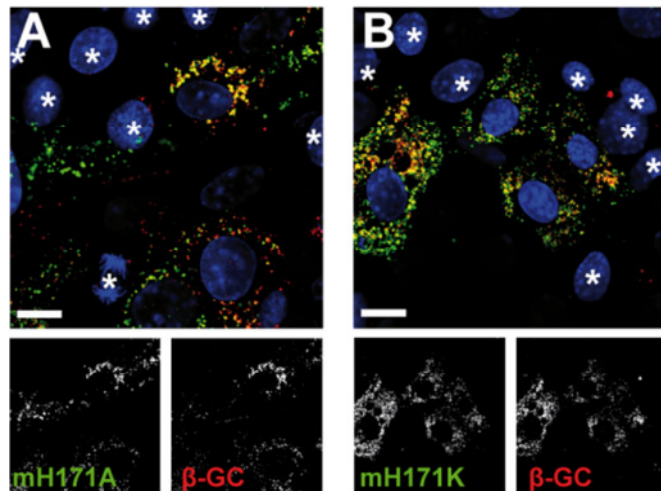


Abbildung 4.15: Lyso-somaler Transport von β -Glukocerebrosidase nach Überexpression der murinen LIMP-2-H171 Mutanten in LIMP-2-defizienten embryonalen Mausfibroblasten. A) LIMP-2-H171A-myc sowie B) LIMP-2-H171K-myc transfizierte LIMP-2-defiziente Zellen wurden einer Kollokalisationsstudie mit endogener β -Glukocerebrosidase an einem konfokalen Laserscanning Mikroskop unterzogen. Detektion der myc-Epitope mit einem α -myc-9B11 Antikörper und der β -Glukocerebrosidase mit einem α -GC1341 Antikörper; *= untransfizierte Zelle; Größenmarker = 10 μ m.

4.1.7.4 Enzymaktivität der β -Glukocerebrosidase in LIMP-2-defizienten Zellen nach Expression der LIMP-2-H171-Mutanten

Da unter *steady state* Bedingungen kein Transportunterschied der β -Glukocerebrosidase durch die unterschiedlich stark bindenden LIMP-2-H171-Mutanten ausgemacht werden konnte, wurde als nächstes versucht festzustellen, ob sich die veränderten Bindungskapazitäten möglicherweise auf die Menge der, in den Lysosomen ankommenden und damit enzymatisch voll aktiven, β -Glukocerebrosidase auswirken. Zu diesem Zweck wurden die murinen LIMP-2-H171-myc Mutanten einzeln in LIMP-2-defiziente Zellen transfiziert und nach Zellernte wurden die Zelllysate einem colorimetrischen Enzymaktivitätsassay, wie unter 3.5.10 beschrieben, unterzogen.

Da bereits gezeigt werden konnte, dass die Aktivität der β -Glukocerebrosidase in LIMP-2-defizienten Zellen drastisch gegenüber Wildtyp-Zellen reduziert ist (Reczek et al, 2007); Abbildung 4.16 A), sollte zunächst das Wiederherstellungsvermögen der reduzierten Aktivität innerhalb der LIMP-2-defizienten Zellen durch Retransfektion von LIMP-2-myc bestimmt werden. Im Anschluss wurde ermittelt, in wie weit eine LIMP-2-ER-Retentionsmutante (LIMP-2-ER-myc) und die LIMP-2-H171-myc-Mutanten in der Lage waren, die Enzymaktivität der β -Glukocerebrosidase in den LIMP-2-defizienten Zellen wieder herzustellen. Ein Vergleich der Aktivitäten sollte dann darüber Aufschluss geben, ob sich das, durch die Muta-

tionen hervorgerufene, veränderte Bindungsverhalten zur β -Glukocerebrosidase auch auf deren Aktivität auswirkt.

Während die Retransfektion von murinem LIMP-2 in die LIMP-2-defizienten (KO) Zellen eine etwa 5-fach verstärkte β -Glukocerebrosidase-Aktivität gegenüber den LIMP-2-defizienten Zellen hervorrufen konnte, stellte sich bei den beiden LIMP-2-H171-Mutanten heraus, dass sie ebenso wie die LIMP-2-myc-ER-Mutante nur eine etwa 2-3-fache Wiederherstellung der β -Glukocerebrosidase-Aktivität gegenüber LIMP-2-KO-Zellen erreichen konnten.

Da die β -Glukocerebrosidase nach Transfektion der LIMP-2-ER-Form ebenfalls im ER zurückgehalten wird (Reczek et al, 2007), deutet das Ergebnis darauf hin, dass auch die immature ER-Form der β -Glukocerebrosidase unter den gewählten Versuchsbedingungen enzymatische Aktivität aufweist (Abbildung 4.16 A).

Parallel zum Enzymaktivitätsassay wurden die korrespondierenden Zelllysate einer Westernblotanalyse unterzogen, um die Expression der einzelnen LIMP-2-Konstrukte und der endogenen β -Glukocerebrosidase zu prüfen (Abbildung 4.16 B).

Für die Interpretation der densitometrischen Auswertung (Abbildung 4.16 C) wurden die Expressionsintensitäten innerhalb der unterschiedlich transfizierten LIMP-2-defizienten Zellen zu den Expressionsintensitäten von LIMP-2-myc bzw. β -Glukocerebrosidase in den LIMP-2-myc transfizierten LIMP-2-defizienten Zellen normalisiert.

Wie sich herausstellte, zeigte die LIMP-2-H171A-myc-Mutante in jedem Experiment und die LIMP-2-ER-myc-Mutante in den meisten Experimenten eine gegenüber LIMP-2-myc um etwa 40-50 % reduzierte Expressionsrate bei jedoch nur leicht reduzierter β -Glukocerebrosidase-Expression (Abbildung 4.16 C). Außerdem war das Signal der LIMP-2-H171A-myc-Mutante im Westernblot in den meisten Fällen in eine stärker ausgeprägte Bande auf der für matures LIMP-2 bekannten Höhe und eine etwas schwächer ausgeprägte Bande auf Höhe der ER-residenten LIMP-2-myc-ER-Mutante verteilt (Abbildung 4.16 B). Die LIMP-2-H171K-myc-Mutante erreichte hingegen mit 95 % eine gegenüber LIMP-2-myc vergleichbare Expressionsstärke. Auch die Expression der β -Glukocerebrosidase war der Menge in den LIMP-2-myc transfizierten LIMP-2-defizienten Zellen entsprechend.

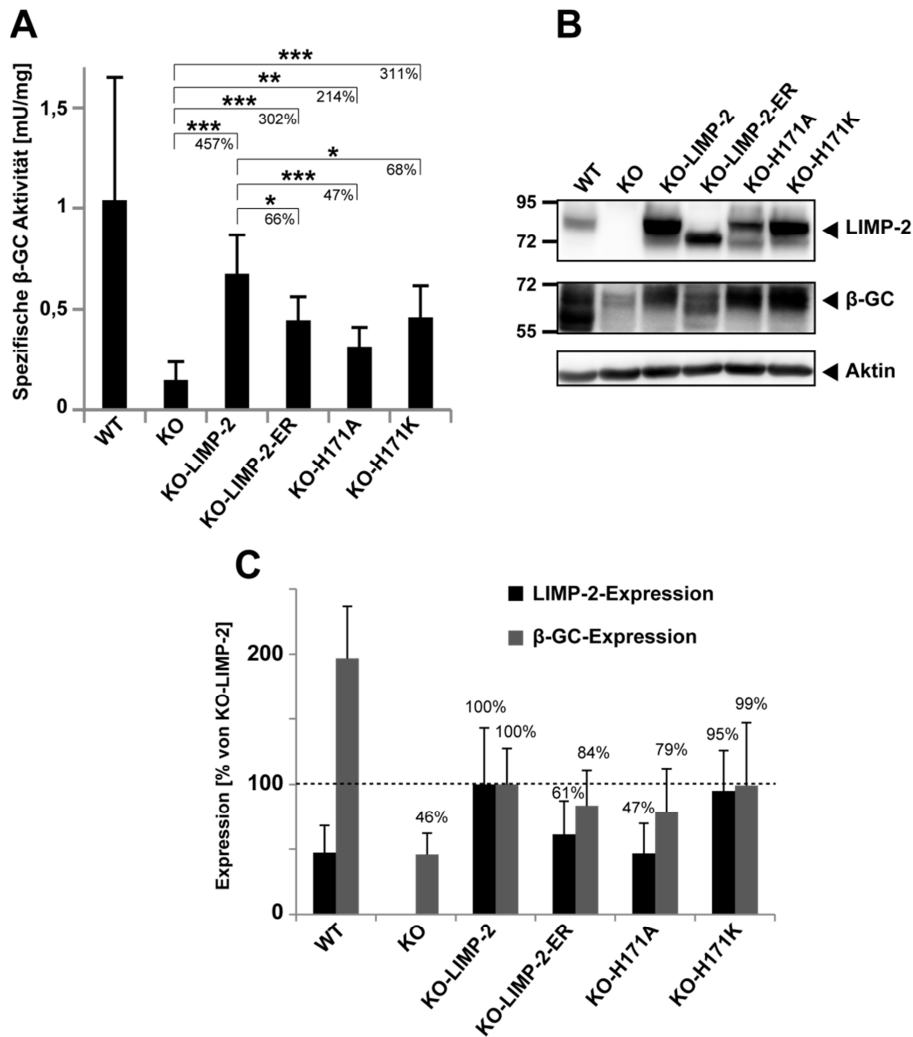


Abbildung 4.16: Enzymaktivität der β-Glukocerebrosidase in LIMP-2-defizienten Zellen in Abhängigkeit der Expression von LIMP-2 und den LIMP-2-H171-Mutanten. A) LIMP-2-defiziente Zellen (KO) wurden zu gleichen Teilen mit LIMP-2-myc (LIMP-2), einer murinen ER residenten LIMP-2-myc-Mutante (LIMP-2-ER), LIMP-2-H171A-myc (H171A) oder LIMP-2-H171K-myc (H171K) transfiziert und ein Teil des erhaltenen Proteinlysats wurde für einen β-Glukocerebrosidase-Aktivitätsassay verwendet. Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte der spezifischen Enzymaktivitätswerte der β-Glukocerebrosidase aus 10 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten in mU/mg Protein dar. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen der erhaltenen Mittelwerte und die statistische Analyse entspricht einem zweiseitigen, ungepaarten, *students* T-Test * $p < 0,05$ ** $p < 0,005$ *** $p < 0,0005$. Die %-Angaben beziehen sich auf die β-Glukocerebrosidase-Aktivität in den LIMP-2-defizienten Zellen oder den mit LIMP-2-myc transfizierten LIMP-2-defizienten Zellen. B) Die übrigen Proteinlysate wurden zu gleichen Teilen auf ein SDS-Gel aufgetragen und anschließend einer Westernblotanalyse mit Antikörpern gegen LIMP-2 (α -L2T2), die murine β-Glukocerebrosidase (α -GC4171) oder gegen Aktin (α -Aktin) unterzogen. C) Darstellung der Mittelwerte der densitometrischen Westernblotanalysen von LIMP-2-Konstrukt- und β-Glukocerebrosidase-Signalstärken aller 10 Experimente aus B) in Form eines Balkendiagramms. Die Mittelwerte der Signalstärken wurden je zum Mittelwert der LIMP-2-myc- oder der β-Glukocerebrosidase-Expression in den KO-LIMP-2-Proben normalisiert. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen der erhaltenen Mittelwerte. Die %-Angaben beziehen sich jeweils auf die Expression in den LIMP-2-myc transfizierten LIMP-2-defizienten (KO-LIMP-2) Zellen.

Es konnte demnach gezeigt werden, dass alle verwendeten LIMP-2-Mutanten zwar einen Wiederherstellungseffekt auf die geringe β-Glukocerebrosidase-Aktivität in LIMP-2-defizien-

ten Zellen hatten, dass dieser jedoch geringer ausfiel als nach Überexpression des nicht mutierten LIMP-2-myc-Proteins.

Auf Grund der geringen Expressionsrate der LIMP-2-H171A-myc-Mutante wurde durch Transfektion erhöhter cDNA-Mengen versucht eine, gegenüber der LIMP-2-myc-Mutante, vergleichbare Expression zu erreichen. Im Anschluss konnte dann geklärt werden, ob das verringerte Vermögen die Aktivität der β -Glukocerebrosidase wieder herzustellen lediglich auf zu wenig LIMP-2-Protein und nicht auf die H171A-Mutation zurückzuführen war.

Um die Expression der LIMP-2-H171A-Mutante anzugleichen, wurde ihre cDNA, verglichen zu LIMP-2-myc und LIMP-2-H171K-myc, in 4-fach höherer Konzentration in die LIMP-2-defizienten Zellen transfiziert und der Enzymaktivitätsassay sowie die Westernblotanalyse erneut durchgeführt.

Wieder zeigte sich die für die LIMP-2-H171A-myc schon beobachtete Aufteilung der Proteinbande im Westernblot, jedoch bei verstärkter Expression (Abbildung 4.17 A und B).

Die um 29 %, gegenüber LIMP-2-myc, gesteigerte Expression führte dennoch zu keiner Steigerung der β -Glukocerebrosidase-Aktivität (Abbildung 4.17 C).

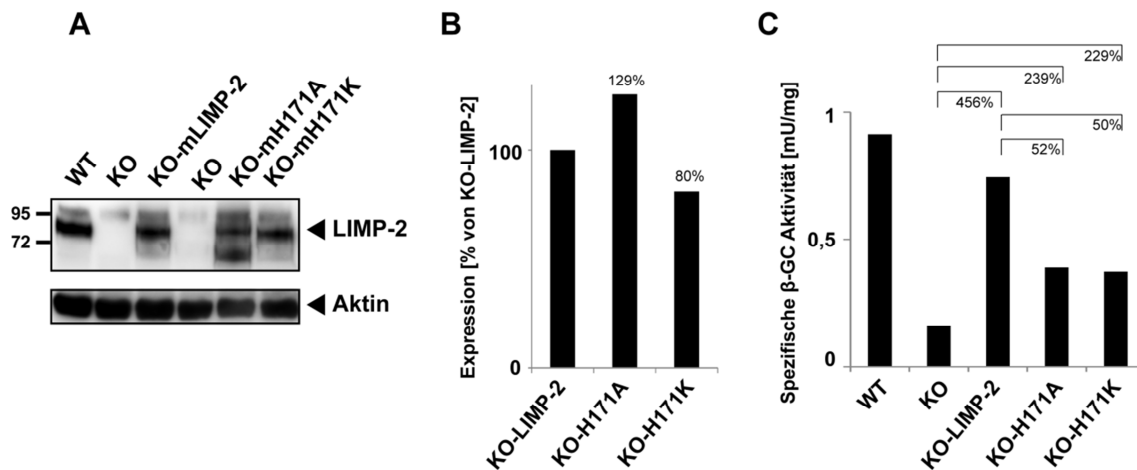


Abbildung 4.17: Vergleich des Einflusses von LIMP-2-myc und LIMP-2-H171A-myc auf die β -Glukocerebrosidase-Aktivität in LIMP-2-defizienten Zellen nach Angleichung der Expressionslevel. A) LIMP-2-defiziente Zellen wurden im Verhältnis 1:4:1 mit LIMP-2-myc, LIMP-2-H171A-myc und LIMP-2-H171K-myc transfiziert und das erhaltene Proteinlysate wurde zu gleichen Teilen auf einem SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden auf einer Westernblotmembran mit einem gegen LIMP-2 gerichteten α -L2T2 Antikörper detektiert. Die Detektion von Aktin diente als Ladekontrolle. B) Zusammenfassung der densitometrischen Westernblotanalyse aus A). C) Die übrigen Proteinlysate aus A) wurden für einen β -Glukocerebrosidase-Aktivitätsassay verwendet. Das Balkendiagramm stellt dabei die Zusammenfassung der spezifischen Enzymaktivitätswerte der β -Glukocerebrosidase in mU/mg Protein dar.

4.1.7.5 ER-Retention der β -Glukocerebrosidase nach Expression der LIMP-2-H171-Mutanten in LIMP-2-defizienten Zellen

Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob die geringere Wiederherstellung der β -Glukocerebrosidase-Aktivität durch die exprimierten LIMP-2-myc-Mutanten auf eine vermehrte Retention des Enzyms im ER zurückzuführen war, die unter *steady state* Bedingungen in der Immunfluoreszenz nicht zu ermitteln war. Außerdem sollte damit auch geklärt werden, ob die Aufspaltung der im Westernblot detektierten Bande der LIMP-2-H171A-myc-Mutante auf einer anteiligen ER-Retention des Proteins beruhte.

Erneut wurden LIMP-2-defiziente Zellen mit LIMP-2-myc, LIMP-2-myc-ER, LIMP-2-H171A-myc und LIMP-2-H171K-myc zu gleichen Mengen in die LIMP-2-defizienten Zellen transfiziert. Die Zelllysate wurden je einem Endoglykosidase H und einem PNGase F Verdau unterzogen (Abschnitt 3.5.6) und im Anschluss zusammen mit den korrespondierenden Totallysaten einer Westernblotanalyse unterzogen (Abbildung 4.18 A). Die Gesamtprotein-Expressionen der LIMP-2-Konstrukte und der β -Glukocerebrosidase zeigten, wie schon in Abbildung 4.17 dargelegt, relativ gleichbleibende β -Glukocerebrosidase-Expression und eine reduzierte Expression der LIMP-2-H171A-Mutante.

Die densitometrischen Westernblotanalysen der Endoglykosidase H sensitiven Proteine konnten zeigen, dass im Vergleich zu 100 % der LIMP-2-myc-ER-Mutante auch 37 % der LIMP-2-H171A-myc-Mutante, aber lediglich 9 % des LIMP-2-myc sowie 11 % der LIMP-2-H171K-Mutante im ER aufzufinden waren. Parallel wurde auch die Endoglykosidase H sensitive β -Glukocerebrosidase bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass in den LIMP-2-H171A-myc transfizierten LIMP-2-defizienten Zellen im Schnitt 67 % der gesamten β -Glukocerebrosidase im ER aufzufinden war, gegenüber nur 39 % der β -Glukocerebrosidase in den LIMP-2-myc transfizierten Zellen. In den LIMP-2-H171K-myc transfizierten Zellen war der Anteil der β -Glukocerebrosidase im ER mit 55 % ebenfalls gegenüber LIMP-2-myc transfizierten Zellen erhöht (Abbildung 4.18 B).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die LIMP-2-H171A-myc-Mutante im Vergleich zu LIMP-2-myc vermehrt Endoglykosidase H sensitiv war und es sich mit der β -Glukocerebrosidase in den korrespondierenden Proben ebenso verhielt. Die dauerhaft protonierte LIMP-2-H171K-myc-Mutante konnte hingegen in allen Experimenten wegen eines zu LIMP-2-myc vergleichbaren oder nur geringfügig erhöhten Endoglykosidase H sensitiven

Signals hauptsächlich in den Lysosomen vermutet werden, während jedoch das dazugehörige Endoglykosidase H sensitive Signal der β -Glukocerebrosidase in mehr als der Hälfte der Experimente stärker ausfiel und sich das Enzym somit eher im ER befand.

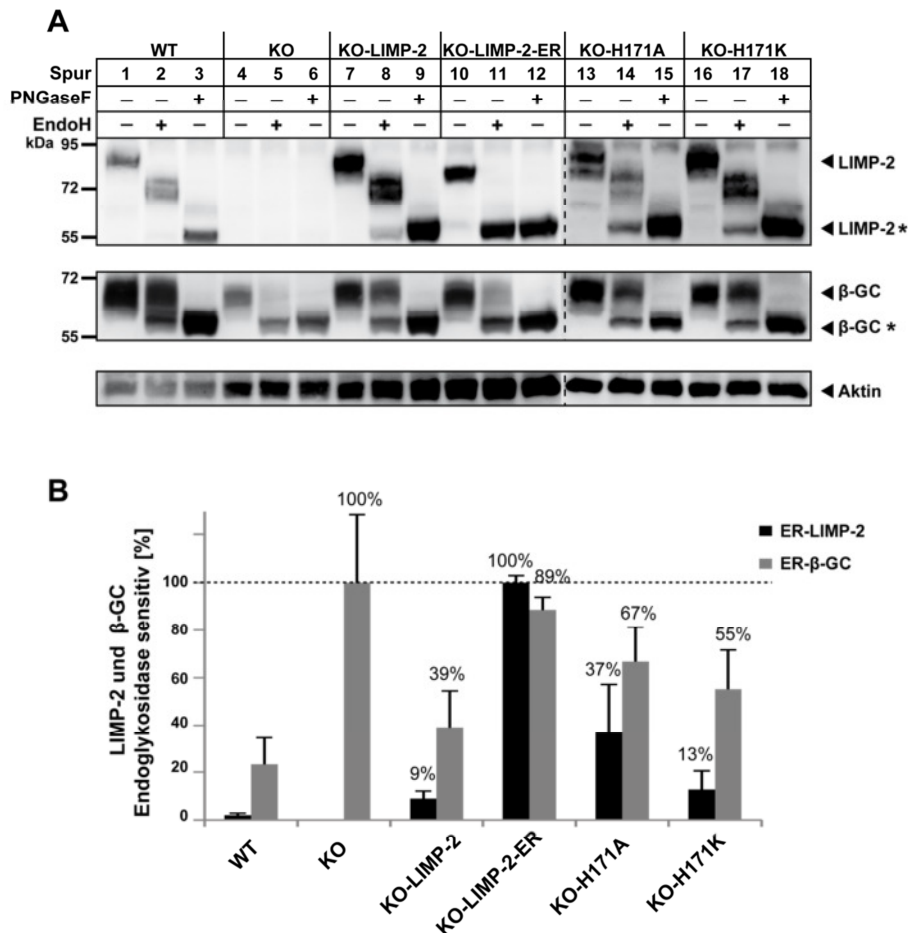


Abbildung 4.18: Einfluss der LIMP-2-H171-myc-Mutanten auf den Rückhalt von β -Glukocerebrosidase im ER. A) Westernblotanalyse von Wildtyp- und LIMP-2-defizienten Zellen, kontrolltransfiziert mit GFP, transfiziert mit LIMP-2-myc, LIMP-2-H171A-myc, LIMP-2-H171K-myc oder LIMP-2-myc-ER. Beladung des Gels mit je 60 μ g Lysat, das entweder keinem (Spuren 1, 4, 7, 10, 13, 16), einem Endoglykosidase H (Spuren 2, 5, 8, 11, 14, 17) oder einem PNGase F (3, 6, 9, 12, 15, 18) Verdau unterzogen wurde, um mature von unreifen sowie unglykosylierten LIMP-2- bzw. β -Glukocerebrosidase-Formen zu unterscheiden. Detektion von LIMP-2 mit α -L2T2 und der β -Glukocerebrosidase mit murinem α -GC4171 Antikörper. Die gleichmäßige Ladung wurde mit einem Antikörper gegen Aktin nachgewiesen. *= unreifen ER-Form. B) Zusammenfassung von 5 wie unter A) durchgeführte und je einer densitometrischen Westernblotanalyse unterzogenen Experimente. Zur Berechnung des Anteils an Endoglykosidase H sensitivem LIMP-2 oder sensitiver β -Glukocerebrosidase wurden die Bandenintensitäten der unreifen Proteinform aus den Spuren 2, 5, 8, 11, 14 und 17 zu der Gesamtmenge an LIMP-2 bzw. β -Glukocerebrosidase ins Verhältnis gesetzt. Das Balkendiagramm repräsentiert die erhaltenen Mittelwerte in Prozent und die dazu gehörigen Standardabweichungen. Die %-Angaben beziehen sich im Fall von LIMP-2 auf die zu 100 % im ER vorkommende LIMP-2-ER-Mutante und im Fall von β -Glukocerebrosidase auf die in den LIMP-2-defizienten Zellen (KO) zu 100 % im ER vorkommende β -Glukocerebrosidase.

Abschließend kann also festgehalten werden, dass die stärker bindende LIMP-2-H171A-myc-Mutante anteilig im ER bleibt, dort vermehrt abgebaut wird und die β -Glukocerebrosidase daher nicht vollständig in die Lysosomen gelangt. Wohingegen die schwächere Interaktion zur lysosomalen LIMP-2-H171K-myc-Mutante nicht so viel β -Glukocerebrosidase in die Lysosomen transportiert wie Wildtyp-LIMP-2.

4.1.8 Untersuchung der LIMP-2-Histidinreste 150 und 189 auf ihre pH-sensitive Funktion in der LIMP-2-/ β -Glukocerebrosidase-Interaktion

Um abschließend auch die zwei weiteren Histidine in der Binderegion zwischen der *coiled-coil*-Domäne und dem Tyrosinrest 222 des humanen LIMP-2-Proteins als mögliche pH-sensitive Reste für die LIMP-2-/ β -Glukocerebrosidase-Interaktion zu untersuchen, wurde auch hier das unter Abschnitt 4.1.7 angewendete Interaktionsmodell verwendet.

Nach Austausch der Histidinreste zu Alanin oder Lysin wurde zunächst die lysosomale Lokalisation der Mutanten, wie schon unter Abschnitt 4.1.7 beschrieben, bestimmt. Die Analyse mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop ergab auch hier, dass alle humanen LIMP-2-myc-Mutanten, die entweder im Histidin 150 oder im Histidin 189 zu Alanin oder Lysin mutiert waren, in die Lysosomen transportiert wurden (Abbildung 4.19).

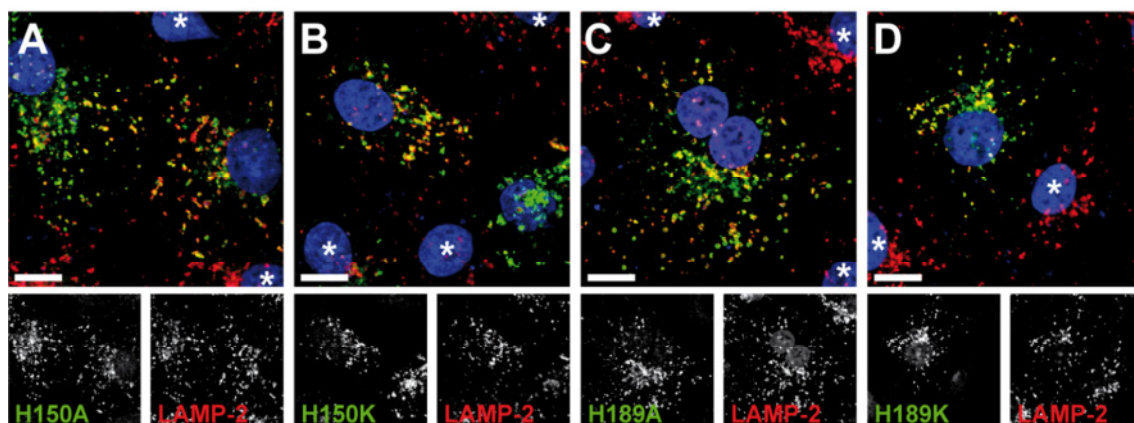


Abbildung 4.19: Lyso-somale Lokalisation der humanen LIMP-2-H150- und H189-Mutanten A) LIMP-2-H150A-myc, B) LIMP-2-H150K-myc, C) LIMP-2-H189A-myc oder D) LIMP-2-H189K-myc überexprimierende COS-7-Zellen wurden nach Kofärbung mit dem lysosomalen Membranprotein LAMP-2 mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie visualisiert. Detektion des myc-Epitops mit einem α -myc-9B11 Antikörper und des LAMP-2 Proteins mit α -LAMP-2-H4B4 Antikörper; Größenmarker = 10 μ m; *= untransfizierte Zelle.

Die folgenden Koimmunpräzipitationen der β -Glukocerebrosidase mit den 4 Histidinmutanten LIMP-2-H150A-myc, LIMP-2-H150K-myc, LIMP-2-H189A-myc und LIMP-2-H189K-myc

wurden wie unter Abschnitt 4.1.7.1 durchgeführt. Die Zusammenfassungen der densitometrischen Westernblotanalysen zeigten im Fall der Histidin-150-Mutanten eine eher ansteigende Bindungsintensität zur β -Glukocerebrosidase, während im Fall der Histidin-189-Mutanten kein spezifischer Trend auszumachen war (Abbildung 4.20).

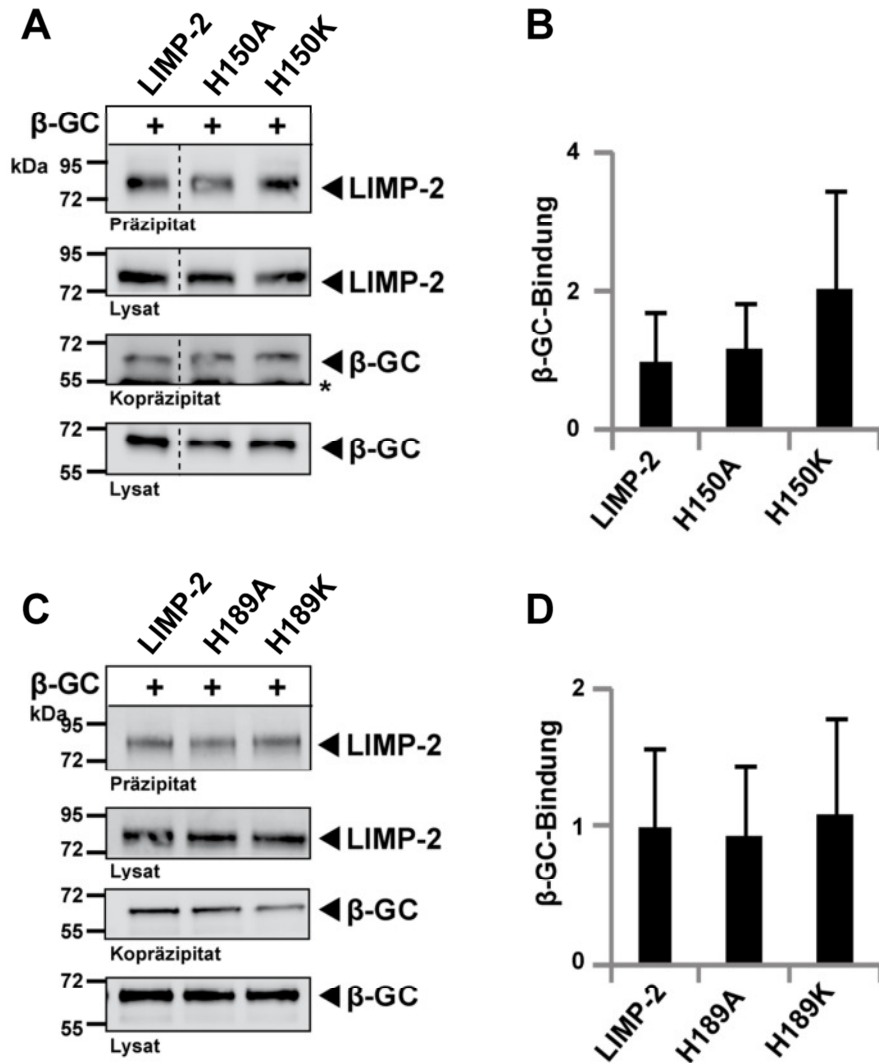


Abbildung 4.20: Mutationen der LIMP-2-Histidinreste 150 und 189 haben keinen pH sensitiven Einfluss auf die Bindungsstärke zur β -Glukocerebrosidase. Mit β -Glukocerebrosidase und LIMP-2-myc sowie A) LIMP-2-H150A-myc oder LIMP-2-H150K-myc bzw. C) LIMP-2-H189A- oder LIMP-2-H189K-myc kotransfizierte und einer Koimmunpräzipitation mit einem α -myc-9B11 Antikörper unterzogene COS-7 Zelllysate. Totallysate und Präzipitate wurden auf SDS-Gelen separiert und mit einem Antikörper gegen humane β -Glukocerebrosidase (α -GC8E4) bzw. mit einem α -myc-9B11 Antikörper detektiert. B) und D) Zusammenfassungen der erhobenen densitometrischen Westernblotanalysen von 3 (H150-Mutanten) oder 4 (H189-Mutanten) unabhängig voneinander durchgeführten Koimmunpräzipitationen. Die Balken stellen die Mittelwerte der in den Experimenten erhaltenen β -GC/LIMP-2-Konstrukt Verhältnisse dar. Einzelwerte wurde je zum β -GC/LIMP-2-myc-Mittelwert normalisiert. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen der erhaltenen Mittelwerte. Die H150-Mutanten zeigten eine stärkere Bindung zur β -GC. Bei den H189-Mutanten ließ sich kein Trend erkennen. *= schwere Kette des myc-9B11 Antikörpers bei 55 kDa.

Die vorliegende Analyse aller drei Histidinreste innerhalb der für die Bindung der β -Glukocerebrosidase wichtigen Domäne innerhalb des LIMP-2-Proteins konnte zeigen, dass der nur unter Säugetieren hoch konservierte Histidinrest an Position 171 wahrscheinlich von Bedeutung für die pH-sensitive Bindung und den Transport der β -Glukocerebrosidase ist.

Eine strukturelle Relevanz aller 8 Histidinreste wird auf Grund der hier präsentierten Ergebnisse jedoch für ebenso wahrscheinlich erachtet.

Da die β -Glukocerebrosidase bisher der einzige gut charakterisierte Ligand des LIMP-2-Proteins ist, sollte eine durch diese Arbeitsgruppe durchgeführte Hefe-2-Hybrid-Interaktionsstudie erste Hinweise auf mögliche andere LIMP-2-Interaktionspartner liefern.

In der auf die Interaktionsstudie folgenden Analyse konnte unter den etwa 150 isolierten Sequenzen putativer Interaktionspartner der (Pro)Renin Rezeptor als ein vielversprechender Kandidat identifiziert werden. Der zweite Teil dieser Arbeit wurde daher dafür genutzt, eine funktionelle Analyse der LIMP-2-/ (Pro)Renin Rezeptor-Beziehung durchzuführen.

4.2 LIMP-2 und der (Pro)Renin Rezeptor im kanonischen Wnt-/ β -Catenin-Signalweg

Im Vorfeld der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zur Verbindung von LIMP-2 und dem (Pro)Renin Rezeptor wurde die mittels Hefe-2-Hybrid-System gefundene LIMP-2-/ (Pro)Renin Rezeptor-Interaktion zunächst im Säugerzellsystem bestätigt. Dies konnte durch die Koimmunpräzipitation eines in COS-7-Zellen überexprimierten, HA-markierten, murinen (Pro)Renin Rezeptors mit einem koexprimierten murinen LIMP-2-myc-Konstrukt erreicht werden (durch PD Dr. M. Schwake und M. Wagner produzierte Ergebnisse; Daten nicht gezeigt).

Besonders die essentielle Rolle des (Pro)Renin Rezeptors als akzessorische Untereinheit der, auch lysosomal lokalisierten, vesikulären H^+ -ATPase (Ludwig et al, 1998) sowie die Tatsache, dass Mutationen im (Pro)Renin Rezeptor eine Epilepsie auslösen können (Ramser et al, 2005), machten ihn als putativen LIMP-2-Interaktionspartner für nachfolgende funktionelle Analysen interessant. Zudem wurde die Anfälligkeit für die Ausbildung von Glomerulosklerosen in transgenen, den (Pro)Renin Rezeptor überexprimierenden, Ratten (Kaneshiro et al, 2007); Abschnitt 1.2.1.1) als weitere Verbindung zu LIMP-2 und dem *action myoclonus renal failure* Syndrom gesehen.

In vorab durchgeführten Immunfluoreszenz- und Oberflächenbiotinylierungs-Experimenten sollte zunächst geklärt werden, wo sich der (Pro)Renin Rezeptor innerhalb der Zelle und in Abhängigkeit von LIMP-2 aufhält.

4.2.1 Die Lokalisation des (Pro)Renin Rezeptors in Wildtyp und LIMP-2-defizienten Zellen

Zur Untersuchung der (Pro)Renin Rezeptor-Lokalisation in Abhängigkeit von LIMP-2 mit Hilfe der Immunfluoreszenzmethode wurden die, in dieser Arbeitsgruppe durch retrovirale Transfektion hergestellten, stabil den HA-markierten (Pro)Renin Rezeptor exprimierenden Wildtyp- und LIMP-2-defizienten embryonalen Maus-Zelllinien verwendet.

Zunächst wurde eine Kolorisationsstudie des (Pro)Renin Rezeptors mit endogenem LIMP-2 in den Wildtyp-Zellen durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass der stabil exprimierte HA-markierte (Pro)Renin Rezeptor vorwiegend in vesikulären Strukturen lokalisiert ist und teilweise mit endogenem LIMP-2 kolokalisiert (Abbildung 4.21 A).

Parallel wurde eine Kofärbung mit dem lysosomalen Membranprotein LIMP-1 (CD 63) durchgeführt, um festzustellen, ob die Verteilung des (Pro)Renin Rezeptors in den LIMP-2-defizienten Zellen (LIMP-2-KO) von der in den Wildtyp-Zellen (LIMP-2-WT) abweicht. Wie in Abbildung 4.21 B/B₁ erkennbar ist, scheint die LIMP-2-Defizienz jedoch keinen, in der Immunfluoreszenz sichtbaren, Einfluss auf die Verteilung des (Pro)Renin Rezeptors zu haben.

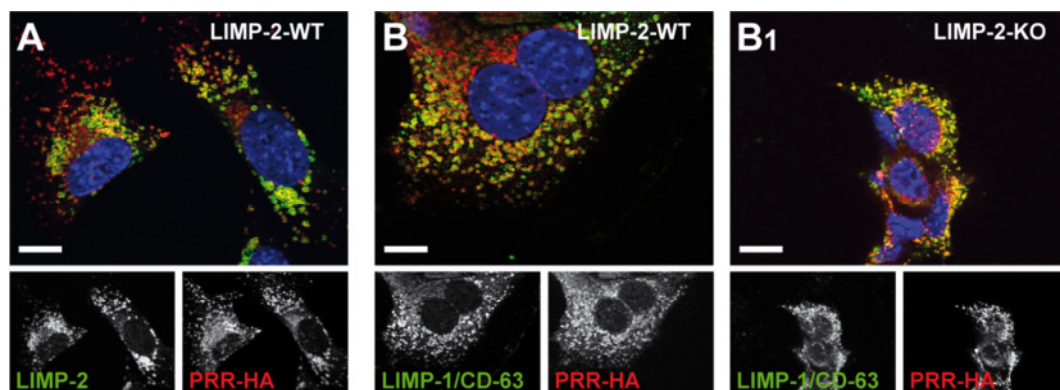


Abbildung 4.21: Lokalisation des (Pro)Renin Rezeptors in Wildtyp- und LIMP-2-defizienten murinen, embryonalen Fibroblasten. Stabil mit HA-markierten (Pro)Renin Rezeptor-HA (PRR-HA) transfizierte Wildtyp- (LIMP-2-WT)- und LIMP-2-defiziente (LIMP-2-KO) Zellen wurden mit 4 % PFA fixiert und mit 0,1 % iger TritonX-100 Lösung permeabilisiert und einer Kofärbung mit Antikörpern gegen das HA-Epitop (α -HA-3F10), LIMP-2 (α -L2T2) oder LIMP-1/CD63 (α -LIMP-1#19) unterzogen. A) Kofärbung des PRR-HA mit LIMP-2 in murinen Wildtyp-Fibroblasten B) Kofärbung des PRR-HA in Wildtyp- und LIMP-2-defizienten (B₁) Zellen mit dem lysosomalen Membranprotein LIMP-1/CD63. Die mikroskopische Visualisierung der detektierten Proteine erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop, mit Apotom, der Firma Zeiss (Jena, D). Größenmarker=10 µm.

4.2.2 Bestimmung der Oberflächenexpression des (Pro)Renin Rezeptors in Wildtyp und LIMP-2-defizienten Zellen

Da der Wnt-Signalweg an der Zelloberfläche durch die Bindung des Wnt-Proteins unter anderem an den (Pro)Renin Rezeptor initiiert wird, wurde zunächst untersucht, ob der (Pro)Renin Rezeptor eine unterschiedliche Oberflächenexpression in murinen, embryonalen Wildtyp-Fibroblasten oder den dazugehörigen LIMP-2-defizienten Fibroblasten aufweist.

Da ein qualitativ ausreichender Antikörper gegen den endogenen (Pro)Renin Rezeptor nicht vorhanden war (siehe auch Abbildung 4.24 A), wurden die Experimente in stabil, mit HA-markiertem (Pro)Renin Rezeptor (PRR-HA), transfizierten Zellen durchgeführt.

Zur Bestimmung der Oberflächenexpression wurde an beiden Zelllinien eine Oberflächenbiotinylierung und eine anschließende Präzipitation der biotinylierten Proteine mittels Streptavidin durchgeführt (Abschnitt 3.5.1 und 3.5.2; Abbildung 4.22).

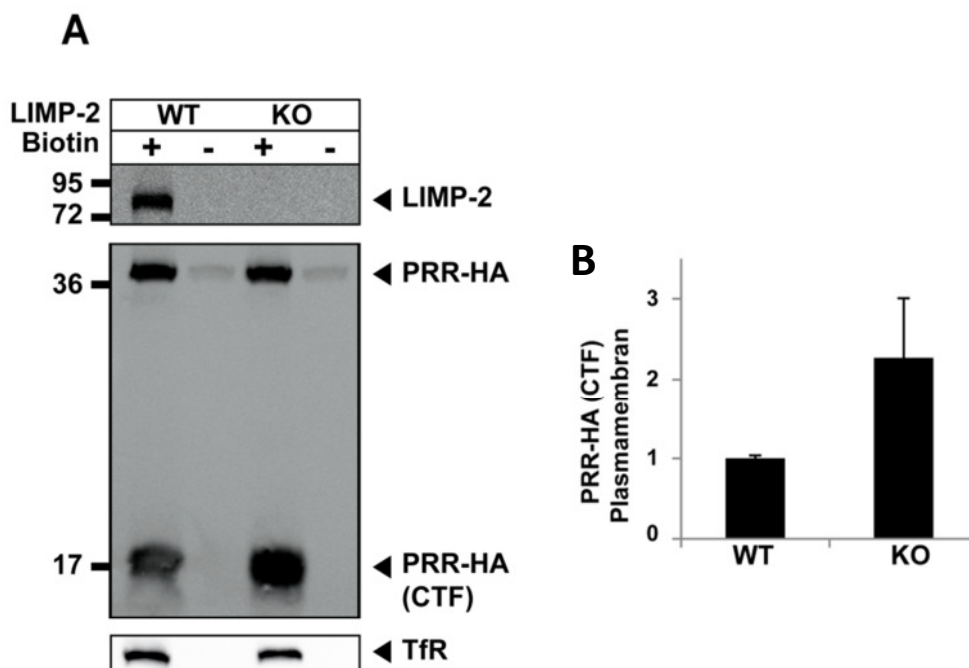


Abbildung 4.22: (Pro)Renin Rezeptor an der Plasmamembran von (Pro)Renin Rezeptor-HA stabil transfizierten Wildtyp- und LIMP-2-defizienten Zellen. A) Mit (Pro)Renin Rezeptor stabil transfizierte Wildtyp- und LIMP-2-defiziente murine Fibroblasten wurden einer Oberflächenbiotinylierung unterzogen und anschließend lysiert. Jeder Biotinylierungsprobe wurde eine, nicht biotinylierte, Probe gegenüber gestellt. Die Präzipitation der biotinylierten Proteine erfolgte durch Streptavidin gekoppelte Sepharose-Beads (Thermo Fisher Scientific, Rockford, US). Die Präzipitate wurden zu gleichen Teilen auf ein SDS-Gel aufgetragen und mit Antikörpern gegen das HA-Epitop (α -HA-3F10), LIMP-2 (α -L2T2) oder den Transferrin Rezeptor (α -TfR) auf einem Westernblot detektiert. B) Zusammenfassung der densitometrischen Westernblotanalysen aus zwei unabhängig voneinander, wie unter A) beschriebenen Experimenten. Balken stellen die Mittelwerte der, jeweils zum Transferrin Rezeptor normalisierten PRR-HA-CTF-Signalstärken dar. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen der erhaltenen Mittelwerte. CTF= C-Terminales Fragment

Die densitometrische Westernblotanalyse von zwei durchgeführten Oberflächenbiotinylierungen ergab eine verstärkte Expression des C-terminalen Fragments des (Pro)Renin Rezeptors an der Oberfläche von LIMP-2-defizienten Zellen (Abbildung 4.22 B).

4.2.3 LIMP-2 wird an der Oberfläche von HeLa-Zellen exprimiert

Da an der Plasmamembran der murinen embryonalen Fibroblasten eine relativ große Menge an LIMP-2 detektiert werden konnte (Abbildung 4.22 A), wurde die Abundanz des endogenen LIMP-2-Proteins mit Hilfe weiterer Biotinylierungs-Experimente auch in HeLa-Zellen überprüft. Denn das Vorkommen von LIMP-2 in unterschiedlichen Säugerspezies könnte, neben der Oberflächeninteraktion mit dem Enterovirus 71, auf bisher nicht beschriebene Funktionen als Plasmamembranrezeptor hindeuten.

Für das Experiment wurden HeLa-Zellen einer Oberflächenbiotinylierung sowie einer Streptavidinpräzipitation unterzogen (Abschnitt 3.5.1 und 3.5.2). Sowohl die präparierten Totallysate als auch die Streptavidinpräzipitate wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und einer Westernblotanalyse unterzogen. Als Referenz für die gelungene Präzipitation wurde der Transferrin Rezeptor detektiert, da es sich bei diesem um ein bekanntes Plasmamembranprotein handelt (Qian et al, 2002). Als Expressionskontrolle wurde das zytosolische Protein Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) nachgewiesen (Abbildung 4.23 A). Experimente, in denen die GAPDH in der Streptavidinpräzipitation zu finden war, wurden aussortiert, da GAPDH als zytosolisches Protein bei einer gelungenen Oberflächenbiotinylierung nicht mit Biotin hätte in Berührung kommen können.

Unter Anwendung der in Abschnitt 3.5.2 angegebenen Formel wurde der Prozentanteil von LIMP-2 an der Plasmamembran in den 2 verwertbaren Experimenten auf 0,3 % und 1,6 % beziffert. Da es sich bei HeLa-Zellen um humane Zellen handelt und das LIMP-2 humaner Zellen als Rezeptor für das Enterovirus 71 fungiert (Abschnitt 1.3.2.1), reichen solch geringe LIMP-2-Mengen an der Plasmamembran möglicherweise auch aus, um eine Rezeptorfunktion gemeinsam mit dem (Pro)Renin Rezeptor im Wnt-Signalweg zu übernehmen.

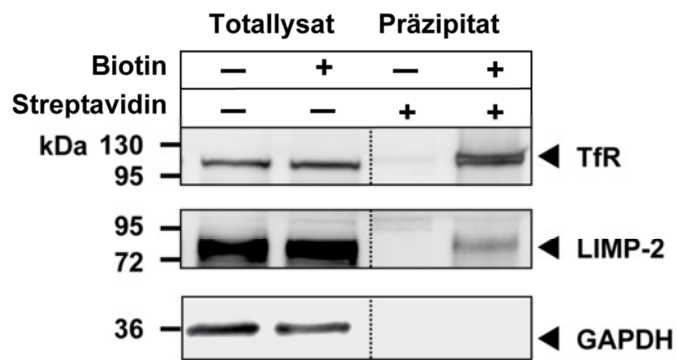


Abbildung 4.23: LIMP-2 an der Plasmamembran von HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden einer Oberflächenbiotinylierung unterzogen und 30 µg der anschließend präparierten Zelllysate wurden entweder direkt für ein SDS-Gel präpariert oder vorher einer Streptavidinpräzipitation unterzogen (1400 µg Einsatz). Das fertige SDS-Gel wurde auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit Antikörpern gegen LIMP-2 (α -L2T2), Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (α -GAPDH), oder den Transferrin Rezeptor (α -TfR) inkubiert.

4.2.4 Untersuchung des LIMP-2-Einflusses auf den Wnt-/ β -Catenin-Signalweg

Die verstärkte Oberflächenexpression des stabil transfizierten (Pro)Renin Rezeptors-HA in LIMP-2-defizienten Zellen sowie das Vorkommen von LIMP-2 an der Plasmamembran (Abschnitt 4.2.2 und 4.2.3) konnten einen ersten Hinweis auf eine Relevanz der unter Abschnitt 4.2 beschriebenen LIMP-2-/ (Pro)Renin Rezeptor-Interaktion geben.

Da der (Pro)Renin Rezeptor eine essentielle Rolle im Wnt-Signalweg spielt (Abschnitt 1.2.1.1; (Cruciat et al, 2010), dessen unkontrollierte Aktivität nicht nur mit Krebs, sondern auch mit der Ausbildung von Nierenerkrankungen in Verbindung gebracht wird, wurde ein funktioneller Zusammenhang von LIMP-2 und dem (Pro)Renin Rezeptor im Wnt-Signalweg in Erwägung gezogen. In den folgenden Untersuchungen sollte daher festgestellt werden, ob sich ein Fehlen von LIMP-2 auch auf den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg auswirkt.

4.2.4.1 LIMP-2-defiziente Zellen akkumulieren nach Wnt-Stimulation vermehrt zytosolisches β -Catenin

Da β -Catenin im stimulierten Wnt-Signalweg im Zytosol und im Zellkern akkumuliert (Hagen et al, 2004; Hocevar et al, 2003); Abschnitt 1.2.1.1), wurden murine embryonale Wildtyp- oder LIMP-2-defiziente Zellen über Nacht (12 Stunden) in einem Wnt3a-haltigen (stimuliert) oder einem korrespondierenden Kontrollmedium (unstimuliert) gehalten und nach Ernte einer Membranpräparation unterzogen (Abschnitt 3.3.4 und 3.5.4).

Die in Totallysat (TL), postnukleäre (PN), lösliche (SF) und Membranfraktion (MF) aufgeteilten Lysate der unstimulierten und stimulierten Zellen wurden zunächst auf LIMP-2- und (Pro)Renin Rezeptor-Expression überprüft. In beiden Zelllinien konnte die (Pro)Renin Rezeptor-Expression erfolgreich nachgewiesen werden, jedoch war ein Vergleich der Expression in

unstimulierten und stimulierten Wildtyp- und LIMP-2-defizienten Zellen auf Grund der schlechten Qualität des zu der Zeit vorhandenen Antikörpers gegen endogenen (Pro)Renin Rezeptor nicht möglich (Abbildung 4.24 A).

Ein anschließender Vergleich der β -Catenin-Expression in den einzelnen Fraktionen ohne und mit vorheriger Wnt-Stimulation konnte zeigen, dass die Stimulation mit Wnt-3a nur in den LIMP-2-defizienten Zellen eine gesteigerte β -Catenin-Expression zur Folge hatte (Abbildung 4.24 B). Da sich die verstärkte Expression in allen Fraktionen der LIMP-2-defizienten Zellen beobachten ließ, jedoch nur die Akkumulation von β -Catenin im Zytosol ein sicheres Indiz für die Aktivierung des Wnt- / β -Catenin-Signalweges ist (Abschnitt 1.2.1.1), wurde nur die lösliche Fraktion für die densitometrische Quantifizierung herangezogen. Dabei stellte sich heraus, dass die untransfizierten LIMP-2-defizienten Zellen etwa 1,6-fach sensitiver gegenüber Wnt-Stimulation waren als die LIMP-2 exprimierenden Zellen.

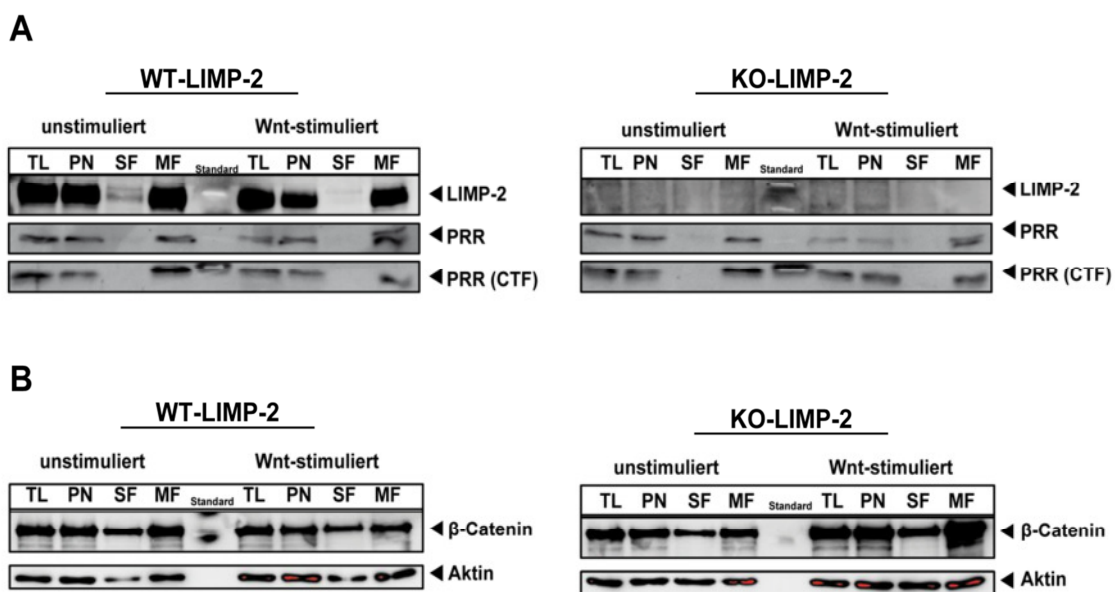


Abbildung 4.24: (Pro)Renin Rezeptor- und β -Catenin-Expression ohne und mit Wnt-Stimulation in Wildtyp (WT)- und LIMP-2-defizienten (KO) Zellen. A) Wildtyp- (WT) und LIMP-2-defiziente (KO) Zellen wurden über Nacht mit Wnt- oder einem Kontrollmedium stimuliert, und die erhaltenen Zelllysate wurden einer Membranfraktionierung unterzogen. Die einzelnen Fraktionen wurden zu gleichen Teilen auf ein SDS-Gel aufgetragen, und die Expressionen von (Pro)Renin Rezeptor sowie LIMP-2 wurden auf einem Westernblot mit endogenen Antikörpern (α -PRR-X und α -L2T2) kontrolliert. B) Wie unter A) beschriebene Präparation der Zellen und Detektion mit β -Catenin sowie Aktin (α - β -Catenin, α -Aktin). Zur Berechnung der Stimulierbarkeit durch Wnt wurden die Banden der löslichen Fraktion (SF) densitometrisch ausgewertet und eine Normalisierung des β -Catenin-Signals zur Ladekontrolle Aktin vorgenommen. Der Quotient der normalisierten β -Catenin-Werte von stimulierten zu unstimulierten defizienten Zelllinien wurde zum Quotienten der normalisierten β -Catenin-Werte von stimulierten zu unstimulierten Proben der Wildtyp-Zellen ins Verhältnis gesetzt. Der erhaltene Faktor (1,6 siehe Text) ergibt die höhere Stimulierbarkeit der LIMP-2-defizienten Zelllinie gegenüber Wildtyp-Zellen, zusammengefasst aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

4.2.4.2 LIMP-2-defiziente Zellen reagieren mit gesteigerter Genexpression auf eine Stimulation mit Wnt

Um abzusichern, dass LIMP-2-defiziente Zellen tatsächlich sensitiver gegenüber einer Wnt-Stimulation sind, wurde ein für die quantitative Analyse von Wnt-Signalwegaktivitäten besser geeignetes Experiment durchgeführt. Für den unter Abschnitt 3.5.11 beschriebenen und in Abbildung 4.25 bildlich verdeutlichten Luciferaseassay wurden erneut die murinen embryonalen Fibroblasten von Wildtyp-Mäusen und LIMP-2-defizienten Mäusen verwendet. Als Kontrolle diente eine, aus den LIMP-2-defizienten Zellen hergestellte, stabil das murine LIMP-2-Protein exprimierende Zelllinie (Abschnitt 3.3.5.2).

Alle drei Zelllinien wurden mit den Reporter-gen-Konstrukten *firefly*-Luciferase und Renilla-Luciferase (konstitutiv exprimierte, interne Expressionskontrolle) transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen über Nacht mit Wnt- bzw. Kontrollmedium stimuliert, und am nächsten Tag wurde mit Hilfe eines Luminometers die, vom TCF/LEF-Promotor abhängige, Aktivität der *firefly*-Luciferase gemessen. Wie schon im vorherigen Stimulations-Experiment, dem die Membranpräparation und die Bestimmung der β -Catenin-Expression folgten, konnte auch hier eine stärkere Aktivität des Wnt-Signalweges in den LIMP-2-defizienten Zellen beobachtet werden. Außerdem wurde die gesteigerte Sensitivität gegenüber Wnt durch die stabile Retransfektion von murinem LIMP-2 in die LIMP-2-defiziente Zelllinie wieder aufgehoben (Abbildung 4.25 B).

Abschließend kann also gesagt werden, dass das Fehlen von LIMP-2 eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Wnt-Stimulation hervorruft, was sich durch die verstärkte Aktivität im Wnt-Signalweg zeigt.

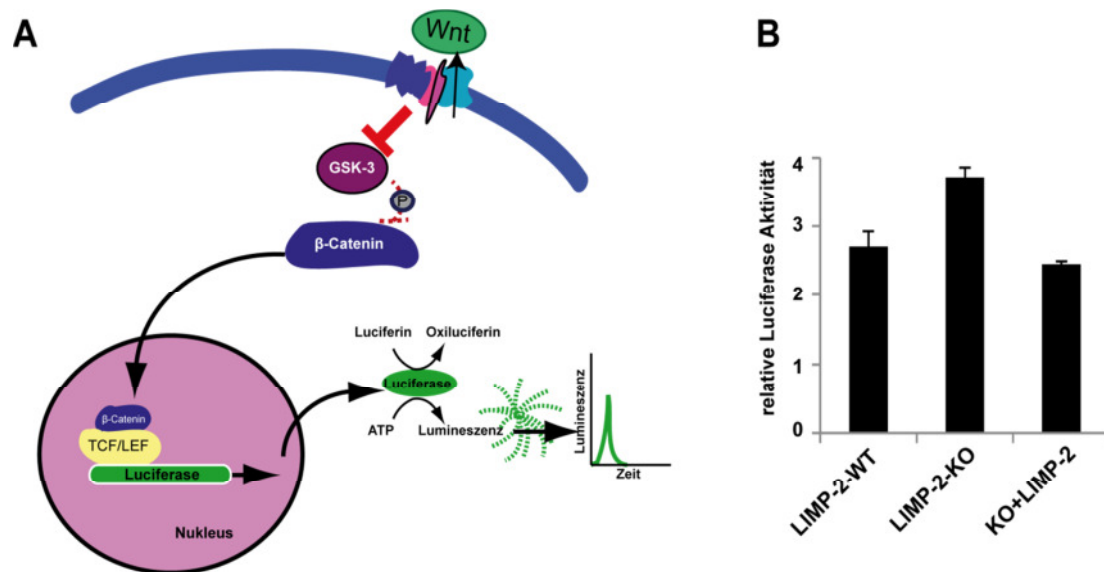


Abbildung 4.25: Messung der Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in Wildtyp-, LIMP-2-defizienten (KO) und LIMP-2 exprimierenden LIMP-2-defizienten Zellen mit Hilfe eines Luciferaseassays. A) Prinzip des Luciferaseassays: Durch Wnt-Stimulation wird der Wnt-/ β -Catenin-Signalweg aktiviert, und dadurch gelangt der Transkriptionsfaktor TCF/LEF in den Zellkern. TCF/LEF bindet an ein zuvor transfiziertes, eine TCF/LEF-Bindestelle enthaltendes Reporter-gen-Konstrukt, wodurch das Luciferasegen des Leuchtkäfers (*firefly* Luciferase) abgelesen wird. Durch Zugabe des Luciferasesubstrates (Luciferin) und ATP zum Zelllysate wird Luciferin unter Lumineszenzabgabe freigesetzt und kann, repräsentativ für die Aktivität des Wnt-Signalweges, gemessen werden. B) Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in Wnt-stimulierten Wildtyp-, LIMP-2-defizienten und LIMP-2 transfizierten LIMP-2-defizienten Zellen. Balken stellen die zur korrespondierenden unstimulierten Probe normalisierten Mittelwerte der relativen Luciferaseaktivitäten aus zwei unabhängig voneinander erstellten, je zwei technische Replikate enthaltende Luciferaseassays nach Wnt-Stimulation dar.

5 Diskussion

Das lysosomale integrale Membranprotein Typ 2 (LIMP-2) hat neben seiner postulierten Funktion als stabilisierender Faktor der lysosomalen Membran (Kuronita et al, 2002) auch die Aufgabe die, im Morbus Gaucher Syndrom defekte, β -Glukocerebrosidase zu den Lysosomen zu transportieren (Reczek et al, 2007). Der Transport der β -Glukocerebrosidase durch LIMP-2 erfolgt wahrscheinlich über einen pH-sensitiven Mechanismus, der gewährleistet, dass die beiden Proteine im ER aneinander binden und im sauren Milieu der Lysosomen wieder dissoziieren.

Da jedoch ein Fehlen des LIMP-2-Proteins in LIMP-2-defizienten Mäusen oder die Mutationen von LIMP-2 in Patienten mit dem *action myoclonus renal failure* Syndrom kaum Morbus Gaucher ähnliche Symptome hervorrufen, stellt sich außerdem die Frage nach weiteren Aufgaben von LIMP-2 (Berkovic et al, 2008; Gamp et al, 2003); Abschnitt 1.3.2.1).

Um einerseits die pH-sensitive Interaktion zwischen LIMP-2 und seinem Liganden β -Glukocerebrosidase besser zu charakterisieren und andererseits die Relevanz einer weiteren putativen Interaktion des LIMP-2-Proteins zu einem bisher unbekanntem Liganden zu untersuchen, wurde diese Arbeit durchgeführt und im folgenden deren Ergebnisse diskutiert.

5.1 Die pH-Wert-abhängige Interaktion von LIMP-2 und der β -Glukocerebrosidase

5.1.1 Die Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes hat einen verstärkenden Effekt auf die Interaktion von LIMP-2 und der β -Glukocerebrosidase

Die pH-Wert-abhängige Interaktion des lysosomalen Membranproteins LIMP-2 und der lysosomalen Sphingolipidase β -Glukocerebrosidase wurde in dieser Arbeit nun auch erstmals intrazellulär gezeigt. Die Vermutung, LIMP-2 und die β -Glukocerebrosidase würden in Form eines Komplexes über ER und Golgiapparat transportiert und erst in den Lysosomen voneinander dissoziieren (Griffiths, 2007; Reczek et al, 2007), konnte dadurch unterstützt werden, dass die β -Glukocerebrosidase nach der Behandlung von Zellen mit pH-Wert erhöhenden Substanzen verstärkt durch LIMP-2 gebunden wurde (Abbildung 4.2). Auch konnte gezeigt werden, dass der saure lysosomale pH-Wert essentiell für eine Dissoziation der β -Glukocerebrosidase von ihrem Liganden LIMP-2 ist. Gegenteilig zu ihrer bekannten lysosomalen Verteilung innerhalb des lysosomalen Lumens mit geringfügiger Membranassoziation (Blanz et al, 2010; Saftig & Klumperman, 2009), führte die pH-Wert-Erhöhung zu einer vollständigen

Umverteilung der β -Glukocerebrosidase an die lysosomale Membran (Abbildung 4.3). Ähnlich verhält es sich auch bei den M6P-Rezeptor-abhängigen lysosomalen Hydrolasen, deren Transport ebenso entscheidend vom pH-Wert abhängt (Gonzalez-Noriega et al, 1980). M6P-Rezeptoren gelangen jedoch nur bis in die Endosomen und akkumulieren dort, wenn der pH-Wert steigt, denn die verstärkte Bindung an die Hydrolasen behindert einen Rücktransport zum Golgiapparat oder an die Plasmamembran (Brown et al, 1986). Als Folge werden die M6P-Rezeptor-abhängig transportierten Hydrolasen vermehrt sekretiert (Braulke et al, 1987; Gonzalez-Noriega et al, 1980). Ob ein solcher Wiederverwertungsmechanismus auch für LIMP-2 existiert, muss noch geklärt werden, erscheint jedoch als unwahrscheinlich, da die meisten Ergebnisse sowohl dieser Arbeit als auch aus vorherigen Studien darauf hindeuten, dass LIMP-2 und die β -Glukocerebrosidase bereits im ER aneinander binden und in den Lysosomen voneinander dissoziieren (Blanz et al, 2010; Reczek et al, 2007).

5.1.2 Histidin als entscheidender pH-Wert-regulierender Rest

Nachdem im ersten Abschnitt dieser Arbeit die Interaktion von LIMP-2 und der β -Glukocerebrosidase auch auf intrazellulärer Ebene als pH-Wert-abhängig bestätigt werden konnte, wurde versucht den molekularen Regulationsmechanismus aufzuklären.

Von Histidinresten ist bekannt, dass sie auf Grund ihrer Ladungseigenschaften oft in die pH-Wert-abhängige Interaktion von Proteinen involviert sind (Dang et al, 2011; Kulkarni et al, 2010; Röttschke et al, 2002; Wendland et al, 1991). Eine histidinfreie LIMP-2-Mutante, die in allen 8 Histidinen zu Alanin mutiert war, somit also innerhalb saurer Organellen sehr viel geringer protoniert vorliegen würde, konnte zwar in einer Bindungsstudie tatsächlich stärker an die β -Glukocerebrosidase binden als nicht mutiertes LIMP-2 (Daten nicht gezeigt), was jedoch auf Grund der hier gezeigten ER-Retention, innerhalb neutraler pH-Wert-Bedingungen (Paroutis et al, 2004), zu erwarten war (Abbildung 4.4). Auf Grund des pKs-Wertes der Histidin-Seitenkette von 6,0 würde im ER auch eine nicht mutierte, jedoch ein ER-Retentionsmotiv enthaltende, LIMP-2-Variante unprotoniert vorliegen und daher verstärkt an die β -Glukocerebrosidase binden. Dieser Zusammenhang konnte auch bereits erfolgreich gezeigt werden (Reczek et al, 2007). Ein weiteres Problem betreffend der Verwendung der in allen 8 Histidinresten zu Alanin substituierten LIMP-2-Mutante, war, dass sich die Proteinbande des Totallysats im Westernblot der oben erwähnten Koimmunpräzipitation nicht nur, wie zur Immunfluoreszenz entsprechend auf einer für ER-residentes LIMP-2 bekannten Höhe

(Barriocanal et al, 1986) befand, sondern auch stark in ihrer Expression reduziert war. Vermutlich wurde durch die Substitution aller Histidinreste zu Alanin das Entstehen von vermehrt hydrophoben Regionen begünstigt. Diese stellen eine Gefahr für die Zelle dar, da sich toxische Aggregate bilden können was in einem gesteigerten Abbau durch die ERAD-Maschinerie endet (Denic et al, 2006; Tyedmers et al, 2010). Gleichzeitig gehen derart fehlgefaltete Proteine auf Grund ihrer meist starken Hydrophobizität auch vermehrt unspezifische Bindungen ein (Selkoe, 2003), was ein Grund für eine verstärkte Bindungsintensität zur β -Glukocerebrosidase hätte sein können.

5.1.3 Der LIMP-2-Histidinrest 363

5.1.3.1 Die pH-sensitive LIMP-2-/ β -Glukocerebrosidase-Interaktion wird nicht durch den klinisch relevanten LIMP-2-H363-Rest reguliert

Da ein histidinfreies LIMP-2-Molekül auf Grund seiner ER-Retention nicht dazu beitragen konnte den Regulationsmechanismus der pH-sensitiven LIMP-2-/ β -Glukocerebrosidase-Interaktion aufzuklären, wurde zunächst damit begonnen, einen einzelnen Histidinrest näher zu untersuchen.

Der zunächst in Betracht gezogene Histidinrest innerhalb des LIMP-2-Proteins war der im *action myoclonus renal failure* Syndrome zu Asparagin mutierte H363-Rest. Ein in dieser Weise mutiertes LIMP-2-Protein verbleibt im ER, bindet dort verstärkt an die β -Glukocerebrosidase, setzt gleichzeitig deren lysosomale Aktivität herab und führt zu einer progressiven myoklonischen Epilepsie, gepaart mit einer fortschreitenden Zerstörung der Niere (Blanz et al, 2010; Dardis et al, 2009). Deshalb wurde zunächst vermutet, dass der Austausch des Histidins dazu führt, dass β -Glukocerebrosidase nicht mehr von seinem Liganden dissoziieren kann und gemeinsam mit diesem über den proteasomalen Abbauweg verstärkt degradiert wird.

Würde der H363-Rest die pH-sensitive Interaktion von LIMP-2 und der β -Glukocerebrosidase regulieren, so hätte eine Mutation zu Lysin schon im ER eine Dissoziation beider Proteine veranlassen müssen, da Lysin auch dort protoniert vorliegt. Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden. Die Interaktion zwischen der ER-residenten LIMP-2-H363K-myc Mutante zeigte sogar eine, im Vergleich zu Wildtyp-LIMP-2, eher intensivierete β -Glukocerebrosidase-Bindung (Abbildung 4.5 und 4.6). Auch konnte nach Mutation des H363-Rests zu Alanin, die

keine ER-Retention des mutierten LIMP-2-Proteins, aber auch keine Protonierung des Rests zur Folge hatte, keine stark veränderte Bindungsintensität zur β -Glukocerebrosidase im Vergleich zu Wildtyp-LIMP-2 beobachtet werden. Deshalb ist davon auszugehen, dass der Histidinrest an Position 363 keine Funktion in der pH-Wert-abhängigen Assoziation und Dissoziation von LIMP-2 und der β -Glukocerebrosidase übernimmt.

5.1.3.2 Die ER-residente LIMP-2-H363K-myc-Mutante verstärkt die proteasomale Degradation der β -Glukocerebrosidase

Die gesteigerte Bindungsintensität der LIMP-2-H363K-Mutante zur β -Glukocerebrosidase kann dennoch als weiterer Hinweis für eine pH-sensitive Interaktion beider Proteine angesehen werden. Denn innerhalb der pH-neutralen Bedingungen des ERs ist davon auszugehen, dass sich durch die fehlende Protonierung von Histidinresten ein stabiler Interaktions-Komplex bildet, wie auch schon für deprotonierte Lysosomen gezeigt (Abschnitt 4.1.1.2 und 5.1.1). Dass die gesteigerte Bindungsintensität der LIMP-2-H363K-Mutante zunächst nicht durch den verstärkten Rückhalt endogener β -Glukocerebrosidase im ER zu beobachten war, lag möglicherweise daran, dass die Überexpression der fehlgefalteten LIMP-2-H363K-Mutante eine Hochregulation der ERAD-Maschinerie zur Folge hatte (Ellgaard et al, 1999), was durch eine stark reduzierte Expression der Mutante gegenüber Wildtyp-LIMP-2 gezeigt werden konnte (Abbildung 4.5). Gleichzeitig hatte der Abbau der Mutante auch gesteigerte Abbauraten endogener β -Glukocerebrosidase zur Folge, was darauf hindeutet, dass diese, stark gebunden an die Mutante, im ER vorliegt und gemeinsam mit ihr degradiert wird (Abbildung 4.7). Tatsächlich konnte die LIMP-2-H363K-Mutante im Vergleich zu LIMP-2-myc verstärkt β -Glukocerebrosidase im ER zurückhalten, wenn der proteasomale Abbau durch MG-132 inhibiert wurde.

Abschließend kann also festgehalten werden, dass auf die ER-Retention der LIMP-2-H363K-myc-Mutante in pH-neutraler Umgebung eine verstärkte Interaktion zur β -Glukocerebrosidase folgt, die in einer erhöhten proteasomalen Degradation beider Proteine endet.

5.1.3.3 Der Histidinrest 363 ist vermutlich entscheidend für die LIMP-2-Struktur

Auch wenn es sich bei dem Histidin 363 nicht um den Rest handelt, der die pH-Wert-Abhängigkeit der LIMP-2-/ β -Glukocerebrosidase-Interaktion reguliert, so konnte seine Mutation zu Lysin dennoch bestätigen, dass es sich wahrscheinlich um eine strukturell entscheidende

Position handelt. Die Tatsache, dass eine Mutation zu Alanin, die als kleine ungeladene Aminosäure dafür bekannt ist α -Helices zu stabilisieren (Rohl et al, 1999), keine Fehllokalisierung des LIMP-2-Proteins zur Folge hatte, wohingegen die klinische Mutation zu Asparagin oder die, in dieser Arbeit verwendete, Mutation zu Lysin eine ER-Retention des LIMP-2-Proteins verursachten (Blanz et al, 2010), könnte für eine α -helikale Struktur im Bereich um Histidin 363 sprechen (Cheng et al, 2006). Auch die nähere Umgebung des H363-Rests, in der sich an den Positionen 357 und 341 noch zwei weitere hoch konservierte Histidinreste befinden, könnte bedeuten, dass diese Region strukturell entscheidend ist. So konnte für Histidinreste in Verbindung mit Tryptophanresten eine stabilisierende Funktion für α -Helices beschrieben werden (Fernandez-Recio et al, 1997).

Da stark entfaltete Proteine, die vermehrt hydrophobe Strukturen aufweisen, auch in ihrem Interaktionsverhalten verändert sein können (Selkoe, 2003), lag der Verdacht nahe, dass die verstärkte Bindungsintensität zwischen β -Glukocerebrosidase und der LIMP-2-H363K-myc-Mutante auf Grund einer vollständigen Fehlfaltung des mutierten LIMP-2-Proteins verursacht wurde.

Das Einfügen eines helixbrechenden Prolinrests in die vermutete *coiled-coil*-Domäne der LIMP-2-H363K-Mutante, die maßgeblich für die Bindung der β -Glukocerebrosidase bekannt ist (Blanz et al, 2010; Reczek et al, 2007), hatte jedoch wieder eine Reduktion der Bindungsintensität zur Folge (Abbildung 4.8). Aus diesem Grund wurde vermutet, dass die Lysinmutation keine vollständig zerstörende Wirkung auf die Struktur des LIMP-2-Proteins hatte und die Interaktion der LIMP-2-H363K-Mutante zur β -Glukocerebrosidase vermutlich auch auf Grund des neutralen pH-Wertes innerhalb des ERs intensiviert war.

5.1.4 Die pH-sensitive Bindungsdomäne im LIMP-2-Protein liegt zwischen Tryptophan 146 und Tyrosin 222

Weitere in Frage kommende Histidinreste konnten zunächst durch die Eingrenzung der für die LIMP-2/ β -Glukocerebrosidase wichtigen Binderegion im LIMP-2-Protein ermittelt werden. Bisher konnte in zwei Studien der Bereich im LIMP-2-Protein, der für die Interaktion zur β -Glukocerebrosidase entscheidend ist, auf die Region zwischen Tryptophan 146 und Glutamin 288 eingegrenzt werden (Blanz et al, 2010; Reczek et al, 2007). Während die postulierte LIMP-2-*coiled-coil*-Domäne (Leucin 152- Leucin 167) als essentiell für die Bindung endogener β -Glukocerebrosidase gilt (Reczek et al, 2007), scheinen auch darüber hinaus-

gehende Sequenzbereiche bis mindestens Tryptophan 178 für eine vollständige Interaktion von β -Glukocerebrosidase und LIMP-2 erforderlich zu sein. Nur das 288 Aminosäuren lange LIMP-2-Protein hat wieder die Möglichkeit, strukturell wichtige Regionen auszubilden, damit eine Bindung der β -Glukocerebrosidase erreicht werden kann (Blanz et al, 2010).

Mit einer mit myoklonischer Epilepsie, nicht jedoch mit fokaler Glomerulosklerose assoziierten LIMP-2-Y222X-Mutante, kam eine weitere Trunktionsmutante von LIMP-2 hinzu (Dibbens et al, 2009), die trotz ihrer reduzierten Länge in der Lage war, β -Glukocerebrosidase zu binden (Abbildung 4.9).

Die gezeigte, im Vergleich zu LIMP-2-myc, gesteigerte, Bindungsstärke der LIMP-2-Y222X-myc-Mutante gegenüber der β -Glukocerebrosidase kann auch hier, wie schon bei der LIMP-2-H363K-myc-Mutante, wahrscheinlich mit der Retention der Mutante innerhalb der pH-neutralen Bedingungen des ERs erklärt werden.

Somit kann festgehalten werden, dass der Bereich zwischen Tryptophan 146 und Tyrosin 222 also offensichtlich ausreicht, um wichtige Regionen für die Interaktion zur β -Glukocerebrosidase zu enthalten. Die für die Interaktion zur β -Glukocerebrosidase nötige Bindedomäne konnte demnach auf den Bereich zwischen der vermuteten LIMP-2-*coiled-coil*-Domäne und den Y222-Rest weiter eingegrenzt werden.

5.1.5 Die pH-sensitive Bindungsdomäne im LIMP-2-Protein enthält die strukturell wichtigen Histidinreste H150, H171 und H189

Ein multipler Sequenzvergleich des LIMP-2-Bereichs zwischen Tryptophan 146 und Tyrosin 222 konnte zeigen, dass hier maximal drei Histidinreste für die Regulation der pH-sensitiven LIMP-2-/ β -Glukocerebrosidase-Interaktion in Frage kommen (Abbildung 4.10).

Von diesen an den Positionen 150, 171 und 189 befindlichen Histidinen konnte nur der H171-Rest in allen verglichenen Säugern gefunden werden. Somit könnte dieser Rest in Frage kommen, die pH-sensitive Interaktion von LIMP-2 und der β -Glukocerebrosidase zu regulieren. Die beiden übrigen Vertebraten, Huhn und Frosch, haben an Position 171 auch einen basischen Rest, ein Arginin. Allerdings ist nicht sicher, ob Huhn und Frosch überhaupt eine lysosomale Glykosylceramidase besitzen, da diese bisher nur anhand der jeweiligen genomischen Sequenzen vorhergesagt werden konnten.

Ein weiterer konservierter Histidinrest innerhalb der Region, Histidin 189, wurde weniger wahrscheinlich für die Regulation der pH-sensitive LIMP-2-/ β -Glukocerebrosidase-Inter-

aktion erachtet, da innerhalb der Rinder-LIMP-2-Sequenz eine Glykosylierungsstelle statt eines Histidinrests positioniert ist.

Der Histidinrest an Position 150 ist zwar ein in der humanen LIMP-2-Sequenz für die Interaktion mit dem Enterovirus 71 entscheidender Rest, er liegt aber auch in einer von 4 hochvariablen Regionen (Chen et al, 2012; Yamayoshi et al, 2009) und ist außer in der menschlichen und der Makaken-LIMP-2-Sequenz in keiner der anderen hier verglichenen Sequenzen zu finden.

Was allerdings durch einen Versuch, eine LIMP-2-Mutante herzustellen, deren Histidinreste innerhalb der Binderegion zu pH-insensitiven Alaninresten mutiert waren, deutlich wurde, ist, dass die LIMP-2-Histidinreste offenbar entscheidend für die LIMP-2-Struktur sind.

Denn wie schon die in allen Histidinresten (Abschnitt 5.1.2) mutierte LIMP-2-HisFree-Ala-Mutante oder die im Histidin 363 zu Asparagin bzw. Lysin mutierten LIMP-2-Proteine, zeigte auch das in den drei Histidinresten 150, 171 und 189 zu Alanin mutierte LIMP-2-Protein einen hauptsächlichen Verbleib im ER. Nur durch das Einfügen des Histidins an Position 171 konnte die Mutante wieder als lysosomal nachgewiesen werden (Abbildung 4.11). Der hohe Konservierungsgrad der meisten Histidine innerhalb des LIMP-2-Proteins, deren Mutationen zum Teil zerstörend auf die Struktur wirken, deutet auf eine, wie schon für andere Proteine beschriebene, strukturelle Relevanz hin (Cheng et al, 2006; Fernandez-Recio et al, 1997).

Abschließend kann also festgehalten werden, dass der LIMP-2-Histidinrest an Position 171 als wahrscheinlichster Kandidat in Frage kommt, die pH-sensitive Interaktion von LIMP-2 und β -Glukocerebrosidase zu regulieren, eine strukturelle Funktion der 3 Histidinreste innerhalb der Binderegion scheint jedoch ebenso relevant zu sein.

5.1.6 Der LIMP-2-Histidinrest 171

5.1.6.1 Die Mutation von Histidin 171 zu Alanin oder Lysin führt zu einer verstärkten Assoziation bzw. Dissoziation der β -Glukocerebrosidase

Trotz ihrer offenbar strukturellen Relevanz war es möglich, die Histidinreste innerhalb der Binderegion einzeln zu mutieren, ohne dass eine ER-Retention verursacht wurde (Abbildung 4.12 und 4.19). Eine daraufhin mögliche Interaktionsstudie mit dem schon unter 5.1.3 verwendeten Alanin-/ Lysin-Modell konnte ein ziemlich eindeutiges Ergebnis präsentieren (Abbildung 4.13). Während die fehlende Protonierbarkeit des zu Alanin mutierten H171-

Rests eine verstärkte Assoziation der β -Glukocerebrosidase zur Folge hatte, wurde durch den Austausch zu Lysin wiederum die Dissoziation verstärkt. Das in Abbildung 5.1 dargestellte Modell spiegelt die vermutliche Situation in der Zelle wider, die folgt, wenn der pH-sensitive Rest im LIMP-2-Protein mutiert ist.

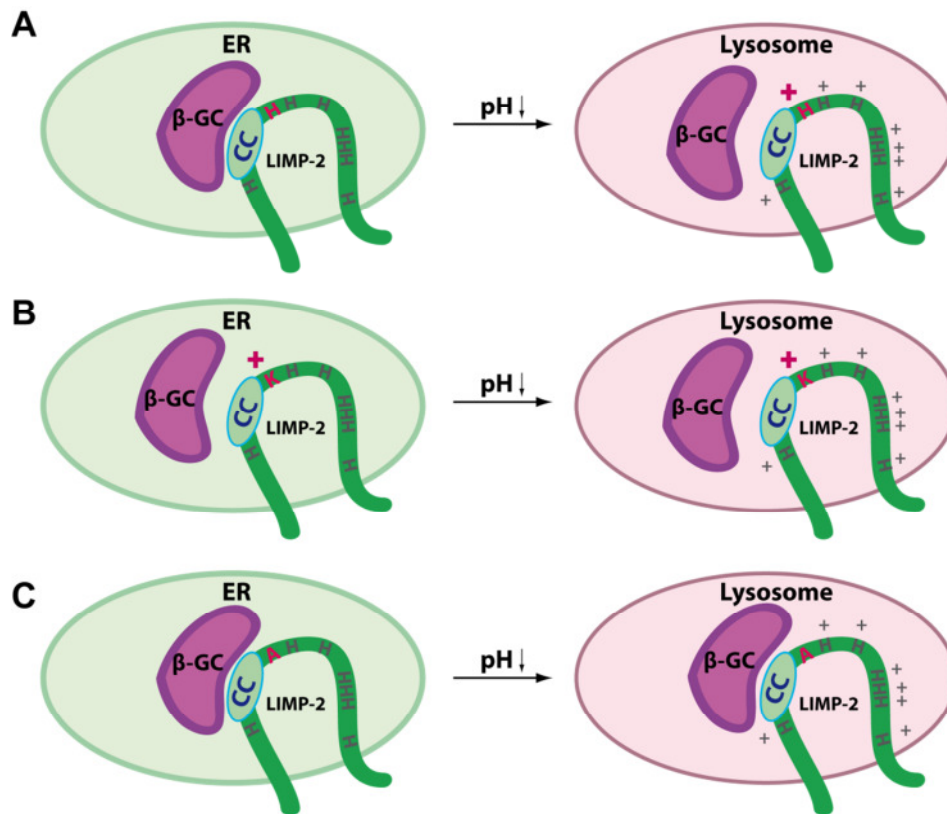


Abbildung 5.1: Darstellung der LIMP-2-/ β -Glukocerebrosidase-Interaktion nach Austausch des vermuteten pH-sensitiven Histidinrestes an Position 171 des LIMP-2-Proteins. Während der Histidinrest 171 im Wildtyp-LIMP-2 A) innerhalb des ERs ungeladen und in den Lysosomen geladen vorliegt, ist ein zu Lysin mutierter H171K-Rest B) konstant geladen. C) Ein Austausch des Histidins zu Alanin sorgt hingegen für eine fehlende Protonierung im 171-Rest. Die unterschiedlichen Mutationen wirken sich auf die Interaktion zur β -Glukocerebrosidase entweder reduzierend B) oder intensivierend C) aus.

Da im Gegensatz zum Histidinrest 171 eine Mutation der Histidine an Position 150 und 189 keine so einheitlichen Effekte zur Folge hatte, die auf eine pH-regulatorische Funktion hindeuten würden (Abbildung 4.20), wurden die Ergebnisse als Hinweis angesehen, dass es sich bei Histidin 150 und 189, im Gegensatz zum Histidin 171, wahrscheinlich nicht um pH-regulatorisch wirksame Reste für die LIMP-2-/ β -Glukocerebrosidase-Interaktion handelt.

5.1.6.2 Beide LIMP-2-H171-Mutanten transportieren β -Glukocerebrosidase in die Lysosomen

Um die Auswirkungen der H171-Mutationen auf die endogene β -Glukocerebrosidase zu studieren, wurden LIMP-2-defiziente murine embryonale Fibroblasten für die Expression der verschiedenen LIMP-2-Mutanten verwendet.

Wie bereits gezeigt werden konnte, befindet sich in LIMP-2-defizienten Zellen nur ein geringer Teil der endogenen β -Glukocerebrosidase im ER, während der überwiegende Rest sekretiert oder proteasomal degradiert wird. Erst eine Retransfektion mit LIMP-2 sorgt für einen Transport der β -Glukocerebrosidase in die Lysosomen (Reczek et al, 2007).

Wie sich herausstellte, war im Experiment nicht nur die stärker bindende LIMP-2-H171A-myc-Mutante in der Lage, für eine lysosomale Lokalisation der β -Glukocerebrosidase zu sorgen, sondern auch die schwächer bindende LIMP-2-H171K-myc-Mutante kolokalisierte mit der Hydrolase in den Lysosomen (Abbildung 4.15).

Nach dem reduzierten Bindungsverhalten der LIMP-2-H171K-myc-Mutante zu urteilen, wäre zu erwarten gewesen, dass die so transfizierten Zellen durch eine vermehrte ER-Lokalisation der β -Glukocerebrosidase ausgezeichnet wären. Möglicherweise spiegelt die lysosomale Kolokalisation von β -Glukocerebrosidase und der LIMP-2-H171K-myc-Mutante eventuell den reduzierten Anteil an gebundener β -Glukocerebrosidase wider, der auch in der Koimmunpräzipitation nachgewiesen werden konnte.

Erstaunlich war jedoch auch, dass die LIMP-2-H171K-myc-Mutante in der Lage war, die L444P-Mutante der β -Glukocerebrosidase in die Lysosomen zu transportieren (Abbildung 4.14). Diese, besonders unter Ashkenazi-Juden weit verbreitete, mit Morbus Gaucher assoziierte L444P-Mutation (Tsuji et al, 1987), ist normalerweise fehlgefaltet und zeigt eine verstärkte Retention im ER. Ein rapider Abbau durch die ERAD-Maschinerie ist die Folge, der vermutlich auch Grund für die meist neuronopathisch ausgeprägte Krankheitsform ist (Bendikov-Bar et al, 2010; Guggenbuhl et al, 2008; Ron & Horowitz, 2005). Es ist allerdings beschrieben, dass überexprimiertes LIMP-2 eine vermehrte lysosomale Lokalisation der β -GC-L444P-Mutante verursachen kann (Reczek et al, 2007). Dass dieser Effekt auch durch die eigentlich reduziert an die β -Glukocerebrosidase bindende LIMP-2-H171K-myc-Mutante hervorgerufen werden konnte, ist möglicherweise auch hier auf die reduzierte, jedoch nicht vollständig verhinderte Interaktion zurückzuführen.

Um der Beantwortung der Frage näher zu kommen, ob die Mutationen des putativen pH-sensitiven Histidins doch auch Auswirkungen auf den Transport der β -Glukocerebrosidase haben, wurden zunächst colorimetrische Enzymaktivitätstest mit der β -Glukocerebrosidase in LIMP-2-H171-Mutanten überexprimierenden LIMP-2-defizienten Zellen durchgeführt. Denn ein Fehltransport der β -Glukocerebrosidase oder ihr verstärkter proteasomaler Abbau müsste sich auch in der Enzymaktivität widerspiegeln (Reczek et al, 2007; Ron & Horowitz, 2005).

5.1.6.3 Beide LIMP-2-H171-Mutanten stellen die Aktivität der β -Glukocerebrosidase in LIMP-2-defizienten Zellen nur geringfügig wieder her

Wie bereits gezeigt werden konnte, gelangt die β -Glukocerebrosidase in LIMP-2-defizienten Zellen nicht mehr in die Lysosomen, sondern bleibt im ER oder wird in das umgebende Medium sezerniert. Dieser Fehltransport der β -Glukocerebrosidase wirkt sich ebenfalls reduzierend auf die messbare intrazelluläre Enzymaktivität der β -Glukocerebrosidase aus (Reczek et al, 2007).

Zunächst konnte in dieser Arbeit nun erstmals gezeigt werden, dass eine Retransfektion der LIMP-2-defizienten Zellen mit LIMP-2-myc dazu führt, dass die Aktivität der β -Glukocerebrosidase wieder ähnlich hoch ausfällt wie in Wildtyp-Zellen (Abbildung 4.16). Gegenüber nicht transfizierten Zellen führte die Überexpression von LIMP-2 zu einer 5-fachen Steigerung der β -Glukocerebrosidase-Aktivität.

Der hier beobachtete wieder herstellende Effekt der ER-Mutante auf die β -Glukocerebrosidase-Aktivität spricht dafür, dass die bereits nachgewiesene starke β -Glukocerebrosidase-Bindung, die vermutlich durch den Verbleib beider Interaktionspartner im pH-neutralen ER zustande kommt (Reczek et al, 2007), dazu führt, dass β -Glukocerebrosidase dem ER-Degradationsprozess der LIMP-2-defizienten Zellen entzogen wird. Passend dazu konnte auch im Westernblot beobachtet werden, dass die Gesamtmenge an β -Glukocerebrosidase in den LIMP-2-myc-ER transfizierten Zellen gegenüber den reinen LIMP-2-defizienten Zellen tatsächlich um fast das Doppelte gesteigert war (Abbildung 4.16).

Die im Vergleich zu LIMP-2-myc transfizierten Zellen dennoch reduzierte Enzymaktivität der β -Glukocerebrosidase in LIMP-2-myc-ER transfizierten Zellen ist eventuell darauf zurückzuführen, dass die unreife ER-Form des Enzyms möglicherweise nicht seine vollständige Aktivität entfalten kann. Denn eine andere Faltung oder Glykosylierung könnte dazu führen,

dass das Sphingolipidaktivatorprotein Saposin C, dessen Bindung an die β -Glukocerebrosidase für eine gesteigerte Enzymaktivität notwendig ist (Berent & Radin, 1981; Morimoto et al, 1990), nicht mehr in der Lage ist, ausreichend mit der β -Glukocerebrosidase zu interagieren. Eine Möglichkeit, diesen Aspekt näher zu untersuchen, könnte darin bestehen, sich einer kürzlich entwickelten Methode zu bedienen, die darauf basiert, dass ein sogenannter Inhibody, bestehend aus einem fluoreszenzgekoppelten β -Glukocerebrosidase-Inhibitor, nur an die aktive Form der β -Glukocerebrosidase bindet, welche dann im SDS-Gel sichtbar gemacht werden kann (Witte et al, 2010).

Eine, gegenüber LIMP-2-myc transfizierten LIMP-2-defizienten Zellen, reduzierte Aktivität der β -Glukocerebrosidase konnte auch in den Zellen festgestellt werden, die mit den LIMP-2-H171-Mutanten transfiziert wurden. In Anbetracht der vorherigen Interaktionsstudien war dieses Ergebnis zumindest für die LIMP-2-H171K-myc-Mutante zu erwarten, denn nach Überexpression dieser schwächer bindenden Mutante sollte weniger β -Glukocerebrosidase in die Lysosomen gelangen als in den LIMP-2-myc überexprimierenden Zellen. Der daraus resultierende vermehrte Verbleib der β -Glukocerebrosidase im ER würde vermutlich zu einem verstärkten proteasomalen Abbau führen und damit die verringerte Enzymaktivität erklären. Zumindest für ER-residente Morbus Gaucher assoziierte β -Glukocerebrosidase-Mutanten konnte gezeigt werden, dass sie vermehrt über den ER-Degradationsprozess abgebaut werden und in Folge dessen auch die Gesamtaktivität der β -Glukocerebrosidase innerhalb der Zelle reduziert ist (Meivar-Levy et al, 1994; Ron & Horowitz, 2005).

Dem gegenüber war es zunächst unverständlich, dass die stärker an die β -Glukocerebrosidase bindende LIMP-2-H171A-myc-Mutante nicht den gegenteiligen Effekt hervorrufen konnte, nämlich, die β -Glukocerebrosidase-Aktivität gegenüber LIMP-2-myc transfizierten LIMP-2-defizienten Zellen zu steigern.

Auch das Angleichen der Expressionsstärke der LIMP-2-H171A-myc-Mutante hatte im Vergleich zu LIMP-2-myc transfizierten LIMP-2-defizienten Zellen keinen verstärkt rettenden Effekt auf die β -Glukocerebrosidase-Aktivität (Abbildung 4.17). Da jedoch in den Expressionskontrollen auffiel, dass die LIMP-2-H171A-myc-Mutante auch eine sehr prominente Bande auf Höhe der LIMP-2-ER-Form ausbildete, wurde eine eingehendere Analyse der im ER verbleibenden Proteine durchgeführt.

5.1.6.4 Nach Expression der LIMP-2-H171-Mutanten in LIMP-2-defizienten Zellen erreicht die β -Glukocerebrosidase nicht vollständig die Lysosomen

Ein Verdau der Zelllysate mit Endoglykosidase H konnte tatsächlich zeigen, dass die LIMP-2-H171A-myc-Mutante vermehrt im ER aufzufinden war (Abbildung 4.18). Das lässt die Vermutung zu, dass möglicherweise diese anteilige ER-Retention gleichzeitig dafür verantwortlich war, dass auch der Anteil der β -Glukocerebrosidase im ER erhöht vorlag. Zudem spricht die, gegenüber den übrigen LIMP-2-Konstrukten, meist reduzierte Expressionsrate der LIMP-2-H171A-myc-Mutante für einen gesteigerten proteasomalen Abbau, der in der Regel auf eine Retention fehlgefalteter Proteine im ER folgt, die durch ER-Chaperone nicht mehr in ihren nativen Zustand überführt werden können (Denic et al, 2006). Damit wäre eine mögliche Erklärung für den, im Vergleich zu LIMP-2-myc transfizierten Zellen, verminderten Wiederherstellungseffekt der β -Glukocerebrosidase-Aktivität in den LIMP-2-H171A-myc exprimierenden Zellen gegeben.

Aus welchem Grund die murine LIMP-2-H171A-myc-Mutante im Vergleich zu der humanen LIMP-2-H171A-myc-Mutante offensichtlich eine veränderte Struktur aufweist und dadurch vermehrt im ER vorkommt, muss noch untersucht werden. Möglicherweise beeinflusst der Austausch des Histidins zu einem Alanin zu sehr die murine LIMP-2-Struktur, da sich im Gegensatz zum humanen LIMP-2 kein polarer Tyrosinrest, sondern ein unpolarer Isoleucinrest an Position 170 befindet (Abbildung 4.10). Die Alaninmutation des H171-Rests führt demnach zur Ausbildung einer verstärkt hydrophoben Region im murinen LIMP-2, die möglicherweise ursächlich für die anteilige Retention des Proteins im ER ist. Denn Chaperone erkennen bevorzugt freigelegte hydrophobe Regionen fehlgefalteter Proteine, um toxische Aggregatbildungen zu verhindern (Jahn & Radford, 2005).

Die anteilige Fehllokalisierung der LIMP-2-H171A-Mutante ließe sich möglicherweise dadurch vermeiden, dass man die Histidinsubstitution nicht mit einem Alanin, sondern mit einem Tyrosin vornimmt (Röttschke et al, 2002). Denn Tyrosin ist strukturell ähnlicher und außerdem polar.

Ein polarer, wenn nicht sogar geladener Rest in nächster Nähe zum Histidin 171 scheint für die Ausbildung der LIMP-2-Struktur erforderlich zu sein, denn im Gegensatz zur LIMP-2-H171A-Mutante war die geladene LIMP-2-H171K-myc-Mutante in den Lysosomen zu finden. Mit dieser, im Vergleich zu LIMP-2-myc ähnlich stark exprimierten und ausreichend lysoso-

mal lokalisierten, Mutante konnte auch die Vermutung unterstützt werden, dass der Histidinrest an Position 171 eine Rolle in der pH-sensitiven LIMP-2-/ β -Glukocerebrosidase-Interaktion spielt. Denn nicht nur die verstärkte Abstoßung der β -Glukocerebrosidase, sondern auch das reduzierte Vermögen, die gesamte β -Glukocerebrosidase in die Lysosomen zu transportieren, gepaart mit der daraus resultierenden verminderten β -Glukocerebrosidase-Aktivität, konnte zeigen, dass eine pH-Wert-regulierte Deprotonierung und Protonierung des Histidinrests 171 wahrscheinlich erforderlich ist, um den intrazellulären β -Glukocerebrosidase-Transport zu regulieren .

Diese Arbeit konnte also mit dem hier angewendeten Modell einen ersten Hinweis liefern, dass die pH-sensitive LIMP-2-/ β -Glukocerebrosidase-Interaktion durch den Histidinrest 171 im LIMP-2-Protein reguliert wird. Ein Modell zum pH-Wert-abhängigen Transport der β -Glukocerebrosidase durch LIMP-2 unter Berücksichtigung des Histidinrests 171 ist als Ergänzung zu Abbildung 1.9 in Abbildung 5.2 dargestellt.

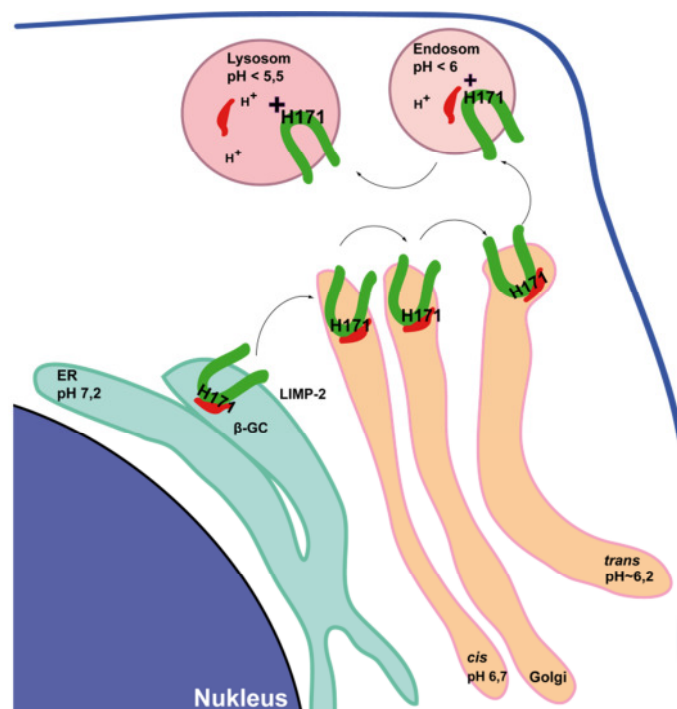


Abbildung 5.2: pH-Wert-regulierter β -Glukocerebrosidase-Transport durch LIMP-2. Im ER bindet die β -Glukocerebrosidase (β -GC) fest an die *coiled-coil*-Domäne ihres Transportrezeptors LIMP-2. Die Bindung beider Proteine bleibt vom pH-neutralen ER ausgehend bis hin zum *trans*-Golgi Netzwerk bei einem pH-Wert von knapp über 6,0 stabil. Innerhalb der Endosomen unterhalb eines pH-Wertes von 6,0 wird der nahe der LIMP-2-*coiled-coil*-Domäne befindliche Histidinrest 171 des LIMP-2-Proteins protoniert und führt zur-Dissoziation der β -Glukocerebrosidase von ihrem Rezeptor LIMP-2.

Ob noch weitere pH-sensitive Aminosäurereste im LIMP-2-Protein oder auch innerhalb der β -Glukocerebrosidase existieren, bedarf weiterer Untersuchungen. Dabei sollte in Zukunft auch ein besonderes Augenmerk auf Glutaminsäurereste innerhalb der Proteine geworfen werden. Proteineingebundene Glutaminsäure hat einen pKs-Wert von 4,3 und wurde bereits als regulatorischer Rest in der pH-Wert-abhängigen Dissoziation lysosomaler M6P-markierter Hydrolasen von ihrem kationenabhängigen M6P-Rezeptor vermutet. Denn unter sauren Bedingungen liegt der Hydroxylrest am γ -C-Atom der Glutaminsäure geladen vor, dadurch, so die Vermutung, wird möglicherweise die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Rezeptor und den Hydroxylgruppen am M6P-Rest der lysosomalen Hydrolasen unterbunden (Olson et al, 2008).

Im Fall der LIMP-2/ β -Glukocerebrosidase-Interaktion könnte dies bedeuten, dass die Protonierung eines, im LIMP-2 befindlichen, Glutaminsäurerests erst in den Lysosomen zu einer vollständigen Dissoziation der β -Glukocerebrosidase führen würde. So könnte auch erklärt werden, warum β -Glukocerebrosidase noch innerhalb später Endosomen anteilig an der Membran assoziiert vorkommt (Abbildung 4.3; (Blanz et al, 2010; Saftig & Klumperman, 2009) und die Bindung beider Proteine durch die ständige Ladung im LIMP-2-H171K-Protein nur reduziert und nicht vollständig unterbunden wurde. Würde man das in dieser Arbeit verwendete Modell auf Glutaminsäure anwenden, so könnte man die beiden Glutaminsäurereste 175 und 183 innerhalb der Binderegion des LIMP-2-Proteins näher untersuchen. Beide sind hoch konserviert und ein Austausch zu Asparaginsäure hätte zur Folge, dass die Protonierung der im Rest befindlichen OH-Gruppe unter zellulären pH-Wert-Bedingungen nicht mehr stattfinden könnte. β -Glukocerebrosidase müsste demnach also auch innerhalb der Lysosomen verstärkt an der Membran vorkommen.

Da LIMP-2, wie Studien unabhängig von der β -Glukocerebrosidase zeigen, auch andere Funktionen innerhalb und außerhalb der Zelle übernimmt und hier zum Beispiel die Stabilisierung der lysosomalen Membran, die Aufnahmen von Enteroviren und möglicherweise auch die Fusion von Vesikeln vermittelt (Kuronita et al, 2002; Kuronita et al, 2005; Yamayoshi et al, 2009), sollte in dieser Arbeit auch auf einen weiteren möglichen Interaktionspartner eingegangen werden: den (Pro)Renin Rezeptor.

5.2 LIMP-2, Wnt und der (Pro)Renin Rezeptor

Nachdem eine Hefe-2-Hybrid-Interaktionsstudie zwischen dem murinen LIMP-2 und einer murinen Gehirn-c-DNA-Bibliothek mehrere putative Interaktionspartner für LIMP-2 hervorbringen konnte (unpublizierte Daten), wurde nach eingehender Studie der Literatur der (Pro)Renin Rezeptor als ein Kandidat für detaillierte Untersuchungen in die engere Wahl genommen.

Als akzessorische Untereinheit der vesikulären H^+ -ATPase kommt er innerhalb saurer Organellen vor und als Rezeptor für (Pro)Renin auch an der Plasmamembran (Ludwig et al, 1998; Nguyen et al, 2002); Abschnitt 1.2.1.1). Kürzlich wurde er außerdem als essentieller Rezeptor im Wnt/ β -Catenin-Signalweg beschrieben, wo er als Interaktionspartner der vesikulären H^+ -ATPase zur Azidifizierung von Signalendosomen beiträgt (Cruciat et al, 2010). Da Nierenerkrankungen sowohl mit einer Überaktivierung des Wnt-Signalwegs als auch mit zu hohen Prorenin-Konzentrationen im Serum oder einer (Pro)Renin Rezeptor Überexpression in transgenen Ratten einhergehen können und Mutationen im (Pro)Renin Rezeptor eine X-chromosomal vererbte, neurodegenerative Erkrankung mit Ausbildung von Epilepsie verursachen können, scheint eine Verbindung zu LIMP-2 möglich (He et al, 2009b; Ichihara et al, 2006a; Kaneshiro et al, 2007; Ramser et al, 2005). Denn klinische Mutationen des LIMP-2-Proteins sind ursächlich für die Ausprägung von Glomerulosklerose und progressiver myoklonischer Epilepsie, und auch LIMP-2-defiziente Mäuse zeigen in erster Linie einen neurologischen und renalen Phänotyp (Berkovic et al, 2008; Gamp et al, 2003).

Während die myoklonische Epilepsie der Patienten mit dem *action myoclonus renal failure* Syndrom auch auf einen Verlust der lysosomalen β -Glukocerebrosidase-Aktivität zurückzuführen sein könnte (King, 1975; Park et al, 2003), sind Nierenerkrankungen bei Morbus Gaucher Patienten relativ selten (Smith et al, 1978). Daher stellt sich die Frage, ob die putative LIMP-2-/ (Pro)Renin Rezeptor-Interaktion möglicherweise eine Rolle bei der Ausprägung der klinischen Nierenmerkmale in Patienten mit dem AMRF-Syndrom spielt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten nun erstmals einen Überblick über eine mögliche funktionelle Verbindung von LIMP-2 und dem (Pro)Renin Rezeptor im Wnt/ β -Catenin-Signalweg herstellen und sollen im Folgenden diskutiert werden.

5.2.1 Das Fehlen von LIMP-2 erhöht das Vorkommen des (Pro)Renin Rezeptors an der Plasmamembran

Obwohl in der Immunfluoreszenz keine veränderte vesikuläre Lokalisation des (Pro)Renin Rezeptors in LIMP-2-defizienten Zellen entdeckt werden konnte, so war zumindest das C-terminale Fragment des (Pro)Renin Rezeptors vermehrt an der Plasmamembran dieser Zellen vertreten (Abbildung 4.21 A-4.22).

Da das C-terminale Fragment des Rezeptors bereits als Untereinheit der vesikulären H⁺-ATPase identifiziert werden konnte und beide gemeinsam für die Azidifizierung der Signalendosomen im Wnt-Signalweg sorgen (Cruciat et al, 2010; Ludwig et al, 1998), könnte die veränderte Lokalisation in LIMP-2-defizienten Zellen ein erster Hinweis auf eine mögliche Rolle von LIMP-2 im Wnt/ β -Catenin-Signalweg sein.

5.2.1.1 LIMP-2 als Rezeptor an der Plasmamembran

Eine Funktion von LIMP-2 als Membranrezeptor, gemeinsam mit dem (Pro)Renin Rezeptor, scheint nicht ausgeschlossen. So konnte LIMP-2 bisher in geringen Konzentrationen an Zelloberflächen von *chinese hamster ovary* Zellen detektiert werden (Eckhardt et al, 2004), und in dieser Arbeit wurde LIMP-2 an der Oberfläche der murinen Fibroblasten nachgewiesen. Gleichzeitig konnten Oberflächenbiotinylierungs-Experimente in HeLa-Zellen zeigen, dass diese ebenfalls plasmamembranständiges LIMP-2 vorzuweisen hatten (Abbildung 4.23). Da kürzlich entdeckt wurde, dass humanes LIMP-2 als Rezeptor für das Enterovirus 71 notwendig ist und sowohl dessen Eintritt in die Zelle als auch das virale *Uncoating* vermittelt (Chen et al, 2012; Yamayoshi et al, 2009), kann davon ausgegangen werden, dass auch geringe LIMP-2-Mengen an der Plasmamembran ausreichen, um ähnlich komplexe Funktionen auszuüben. Auch enthält LIMP-2 ein innerhalb der CD36-Familie konserviertes Bindungsmotiv, welches im CD-36-Protein die Bindung zu dem Adhäsionsprotein Thrombospondin-I an der Zelloberfläche von Thrombozyten vermittelt (Asch et al, 1992; Crombie & Silverstein, 1998) Abschnitt 1.3.2.1). Die Tatsache, dass LIMP-2 zusammen mit anderen lysosomalen Membranproteinen auch an der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten detektiert werden konnte, macht diverse, bisher unbekannte Funktionen von LIMP-2 an der Plasmamembran denkbar (Febbraio & Silverstein, 1990; Metzelaar & Clevers, 1992; Silverstein & Febbraio, 1992). Interessanterweise befinden sich die Bindungsmotive für Thrombospondin-I und das Enterovirus 71 zwischen Aminosäure 89-123 bzw. 144-151 im LIMP-2-Protein, also

noch vor der vermuteten LIMP-2-*coiled-coil*-Domäne (Chen et al, 2012; Crombie & Silverstein, 1998; Frieda et al, 1995). Somit scheint auch eine *coiled-coil*-Domänen-unabhängige Bindung des (Pro)Renin Rezeptors durch LIMP-2 möglich zu sein und würde nicht mit der β -Glukocerebrosidase-Interaktion konkurrieren.

Nachdem also möglich war LIMP-2 und den (Pro)Renin Rezeptor gemeinsam an der Plasmamembran zu detektieren und dabei eine unterschiedliche Oberflächenexpression des (Pro)Renin Rezeptors in LIMP-2-defizienten Zellen festgestellt werden konnte, wurde im folgenden Vorgehen zu klären versucht, ob die Interaktion von LIMP-2 und dem (Pro)Renin Rezeptor im Zusammenhang mit dem Wnt-Signalweg stehen könnte.

5.2.2 Der Verlust von LIMP-2 steigert die Sensitivität gegenüber Wnt-Stimulation

Der Wnt-Signalweg stellt eine Signaltransduktionskaskade dar, die Schlüsselfaktoren in vielen Bereichen außerhalb sowie innerhalb der Zelle benötigt. Ausschlaggebend ist die Bindung des Wnt-Signalproteins an einen Rezeptorkomplex an der Plasmamembran. Der Wnt-bindende Rezeptorkomplex konnte kürzlich um zwei weitere Komponenten erweitert werden, die vesikuläre H^+ -ATPase in Assoziation mit dem (Pro)Renin Rezeptor. Nach Aktivierung der Signalkaskade durch Wnt-Bindung an den Rezeptorkomplex wird weniger zytosolisches β -Catenin abgebaut und kann nach Translokation in den Zellkern Entwicklungsgene oder Proliferationsgene aktivieren und im Fall einer unkontrollierten Überaktivität zu fokaler Glomerulosklerose, Nierenfibrose oder Krebs führen (Guillen-Ahlers, 2008; Naves et al, 2011; Surendran et al, 2002); Abschnitt 1.2.1.1).

Nachweislich lässt sich eine Wnt-stimulierte β -Catenin-Anreicherung in der zytosolisch/ löslichen und in der nukleären Fraktion muriner embryonaler Fibroblasten bereits nach 2 Stunden feststellen (Hocevar et al, 2003). Dass besonders LIMP-2-defiziente Zellen auch noch nach 12-stündiger Wnt-Inkubation mit einer zytosolischen β -Catenin-Akkumulation ausgezeichnet waren, die in Wildtyp-Zellen nicht zu beobachten war, spricht für eine gesteigerte Sensitivität dieser Zellen gegenüber Wnt (Abbildung 4.24).

Nachdem zunächst also die Vermutung aufgestellt werden konnte, dass LIMP-2 das Vorkommen des (Pro)Renin Rezeptors an der Plasmamembran reduziert (Abschnitt 5.2.1), wird diese nun auch dadurch unterstützt, dass das Fehlen von LIMP-2 offensichtlich eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Wnt-Stimulation hervorruft.

5.2.3 LIMP-2-defiziente Zellen exprimieren vermehrt Wnt-Signal abhängige Gene

Die Vermutung, LIMP-2 könnte eine regulierende Funktion im kanonischen Wnt / β -Catenin-Signalweg übernehmen, konnte auch durch die, in dieser Arbeit durchgeführten Luciferase-Reporter-Experimente unterstützt werden. So reagierten auch hier nur die LIMP-2-defizienten Zellen mit einer erhöhten β -Catenin-abhängigen TCF/LEF-Promotor-Aktivität, die durch die Retransfektion von LIMP-2 in die LIMP-2-defizienten Zellen auch wieder aufgehoben werden konnte (Abbildung 4.25).

Eine interessante Möglichkeit, diesen Sachverhalt eingehender zu untersuchen, könnte die Verwendung einer konstant phosphorylierten LRP6-Mutante sein. Mit dieser Mutante konnte bereits gezeigt werden, dass der (Pro)Renin Rezeptor in Abhängigkeit von Wnt-Signalen aktiv ist und nicht erst nach der LRP6-Phosphorylierung an den Signalendosomen seine Aufgabe übernimmt (Cruciat et al, 2010). Übertragen auf LIMP-2 und die postulierte Funktion als Interaktionspartner und Regulator des (Pro)Renin Rezeptors an der Plasmamembran müsste dies also bedeuten, dass Wildtyp-Zellen und LIMP-2-defiziente Zellen nur eine unterschiedliche TCF/LEF-Promotor-Aktivität nach Wnt-Stimulation, nicht aber durch die Koexpression der immer aktivierten LRP6-Mutante zeigen. Vorläufige Ergebnisse, die mit dieser LRP6-Mutante durchgeführt wurden, konnten einen solchen Sachverhalt jedoch bisher nicht bestätigen.

5.2.4 Mögliche Konzepte zur regulierenden Funktion von LIMP-2 im Wnt-Signalweg

Die in dieser Arbeit zu LIMP-2 und dem (Pro)Renin Rezeptor durchgeführten Experimente deuten also darauf hin, dass LIMP-2 einen Einfluss auf die Lokalisation des (Pro)Renin Rezeptors an der Plasmamembran ausübt und dadurch auch auf den Wnt-Signalweg einwirkt.

Möglicherweise führt die Interaktion von LIMP-2 zum (Pro)Renin Rezeptor dazu, dass dieser vermehrt in Vesikeln und dort gebunden an LIMP-2 und somit nicht gehäuft an der Plasmamembran vorkommt. Fehlt nun LIMP-2, kann der (Pro)Renin Rezeptor ohne Regulationsmechanismus an die Plasmamembran gelangen und dort im Wnt-Signalweg verstärkt als Rezeptor für Wnt-Proteine agieren (Abbildung 5.3).

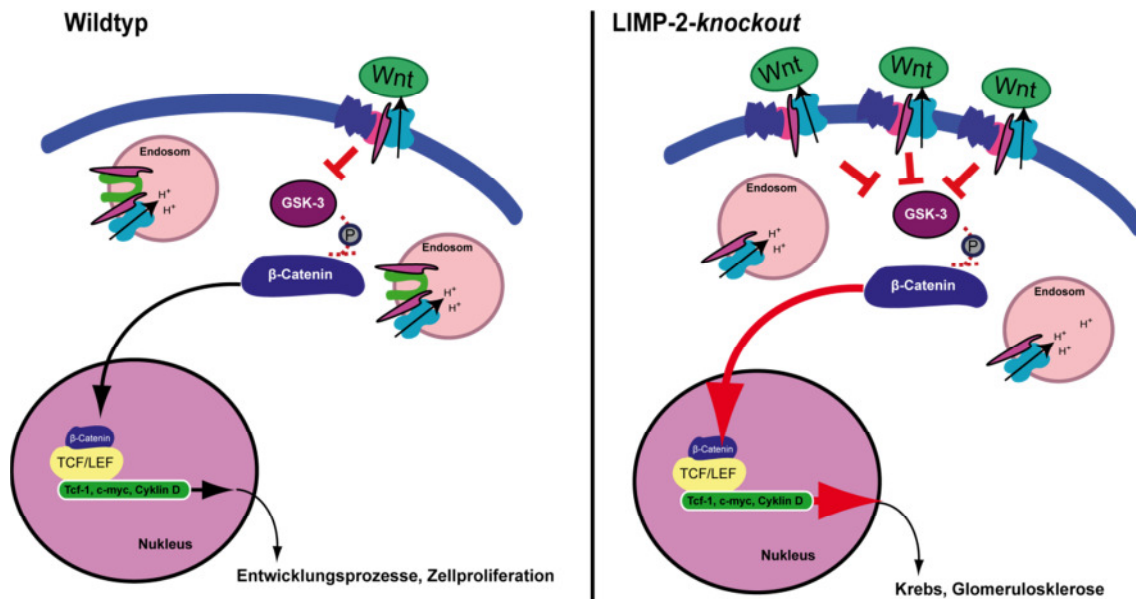


Abbildung 5.3: Putative Regulationsfunktion des LIMP-2-Proteins im Wnt-Signalweg durch Rückhalt des (Pro) Renin Rezeptors in den Endosomen. Wildtypzellen: LIMP-2 und der (Pro)Renin Rezeptor interagieren innerhalb vesikulärer Strukturen und verhindern dadurch ein Überangebot an (Pro)Renin Rezeptor an der Plasmamembran. Der Wnt-Signalweg wird moderat durch Wnt-Applikation aktiv, und Entwicklungsprozesse sowie Zellproliferationsprozesse laufen in geordneten Bahnen ab. LIMP-2-*knockout*: Das Fehlen von LIMP-2 in der LIMP-2-defizienten *knockout*-Zelllinie sorgt für ein Überangebot des (Pro)Renin Rezeptors an der Plasmamembran. Viele Rezeptorkomplexe können als Antwort auf eine Wnt-Stimulation den Wnt-Signalweg überaktivieren. Die verstärkte Expression an Zellproliferationsgenen kann zur Ausbildung von Tumoren oder zur Zerstörung der Nieren führen. Wnt-Rezeptor-Komplexe an der Plasmamembran bestehen aus Frizzled = blau, LRP6 = pink, (Pro)Renin Rezeptor = lila und der V-ATPase = Türkis.

Möglicherweise ist jedoch nicht bloß die erhöhte Konzentration des (Pro)Renin Rezeptors an der Plasmamembran LIMP-2-defizienter Zellen ein Grund für die gesteigerte Sensitivität der Zellen gegenüber Wnt, sondern viel mehr seine bessere Erreichbarkeit.

So konnte in dieser Arbeit untermauert werden, dass sich LIMP-2 an der Plasmamembran diverser Säugerzellen befindet, an der das Protein womöglich auch Interaktionen eingehen kann (Chen et al, 2012; Crombie & Silverstein, 1998; Eckhardt et al, 2004) Abschnitt 1.3.2.1, Abbildungen 4.22 und 4.23). Somit ist eine LIMP-2-Funktion als Negativregulator des Wnt-Signalweges auch als Interaktionspartner des (Pro)Renin Rezeptors an der Plasmamembran denkbar. Denn an der Plasmamembran findet die Aktivierung des kanonischen Wnt-/ β-Catenin-Signalweges erst durch die Bindung von Wnt an den weiterleitenden Rezeptorkomplex, bestehend aus Frizzled und LRP6 sowie der (Pro)Renin Rezeptor-/ V-ATPase-Einheit statt (Cong et al, 2004; Cruciat et al, 2010). Für die Internalisierung der Signalendosomen und der damit gewährleisteten Transduktion des Wnt-Signals in die Zelle ist die Azidifizierung durch die V-ATPase und dessen Interaktion mit dem (Pro)Renin Rezeptor nötig (Cruciat et al, 2010).

Es wäre also denkbar, dass LIMP-2 die postulierte Interaktion zwischen LRP6 und dem (Pro)Renin Rezeptor und die damit verbundene Ausbildung des Wnt-Rezeptorkomplexes unterbindet, indem es selber mit dem (Pro)Renin Rezeptor an der Plasmamembran interagiert (Cruciat et al, 2010; Sihm et al, 2010).

Ein bisher bekannter Negativregulator des Wnt-Signalweges, das Dickkopf-1-Protein, funktioniert zum Beispiel auch, indem es als Interaktionspartner von LRP6 an der Plasmamembran dessen Wnt-unabhängige Internalisierung hervorruft und die folgende Signalkaskade dadurch unterbindet (Mao et al, 2001; Sakane et al, 2010). Sollte eine LRP6/ (Pro)Renin Rezeptor-trennende LIMP-2/ (Pro)Renin Rezeptor-Interaktion an der Plasmamembran tatsächlich existieren, so könnte die fortschreitende fokale Glomerulosklerose von AMRF-Patienten möglicherweise auch durch das Fehlen von LIMP-2 an der Plasmamembran verursacht werden (Abbildung 5.4).

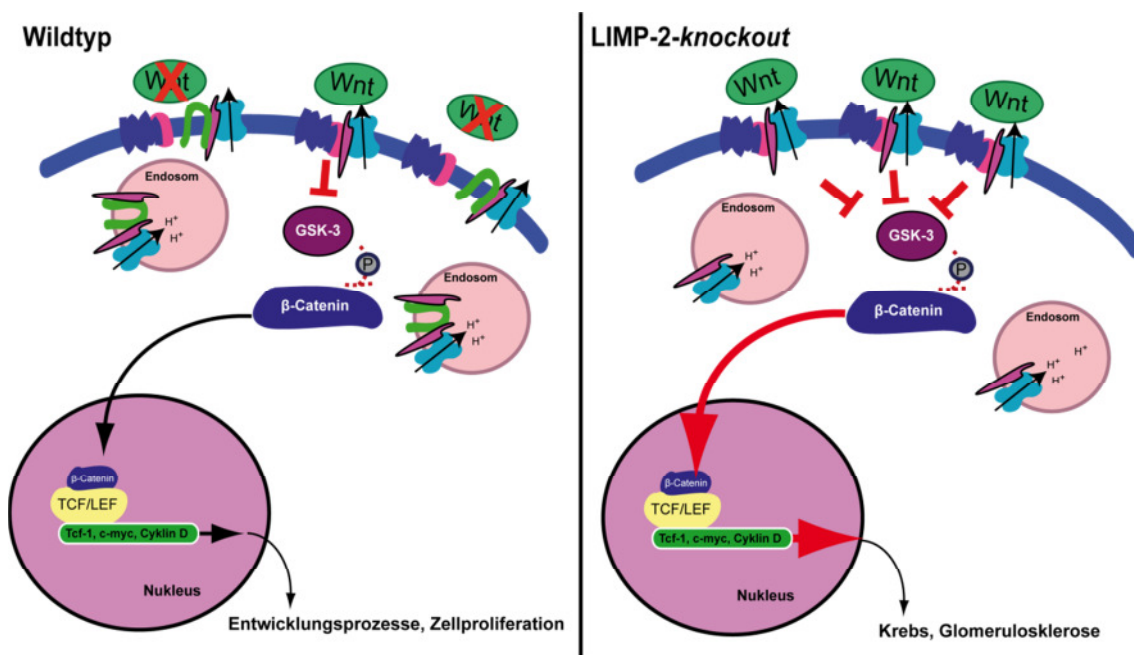


Abbildung 5.4: Putative Regulationsfunktion des LIMP-2-Proteins im Wnt-Signalweg durch Verhinderung der Wnt-Rezeptor-Komplex Bildung. Wildtypzellen: LIMP-2 und der (Pro)Renin Rezeptor interagieren innerhalb vesikulärer Strukturen und an der Plasmamembran. Durch die Interaktion an der Plasmamembran wird die Bindung des (Pro)Renin Rezeptors an LRP6 und damit die Bildung von Wnt-Rezeptor-Komplexen reguliert. Der Wnt-Signalweg wird moderat durch Wnt-Applikation aktiv und Entwicklungsprozesse sowie Zellproliferationsprozesse laufen in geordneten Bahnen ab. LIMP-2-knockout: Das Fehlen von LIMP-2 in der LIMP-2-defizienten *knockout*-Zelllinie sorgt für ein Überangebot von Wnt-Rezeptor-Komplexen an der Plasmamembran. Viele Rezeptor-Komplexe können als Antwort auf Wnt-Stimulation den Wnt-Signalweg überaktivieren. Die verstärkte Expression an Zellproliferationsgenen kann zur Ausbildung von Tumoren oder zur Zerstörung der Nieren führen. Wnt-Rezeptor-Komplexe an der Plasmamembran bestehen aus Frizzled = blau, LRP6 = pink, (Pro)Renin Rezeptor = lila und der V-ATPase = türkis.

Ein Vergleich der Stimulierbarkeit von LIMP-2-defizienten Zellen, die entweder mit Wildtyp-LIMP-2 oder AMRF-assoziierten LIMP-2-Mutanten transfiziert wurden, könnte also weitere Hinweise darauf geben, ob die mit einem LIMP-2-Verlust einhergehenden Nierenschäden möglicherweise auf den Wnt-/ β -Catenin-Signalwege zurückzuführen sind.

Auch könnten die in dieser Arbeit durchgeführten Membranpräparations-Experimente in Form einer Zeitreihe wiederholt werden. So wäre es interessant zu wissen, wie es sich mit der zytosolischen Akkumulation von β -Catenin in Wildtyp- und LIMP-2-defizienten Zellen nach lediglich 2-stündiger Wnt-Stimulation verhält. Zeigen beide Zelllinien erhöhte β -Catenin-Level nach zwei Stunden, die jedoch nur noch in den LIMP-2-defizienten nach 12 Stunden zu sehen sind, könnte dies ein weiterer Hinweis auf eine Regulationsfunktion durch LIMP-2 sein.

Abschließend kann also festgehalten werden, dass LIMP-2 möglicherweise indirekt auf den Wnt-Signalweg einwirkt, indem es das Vorkommen oder die Erreichbarkeit des (Pro)Renin Rezeptors und damit auch des Wnt-Rezeptor-Komplexes reguliert.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine eingehende Charakterisierung der pH-Wert-abhängigen Interaktion des lysosomalen integralen Membranproteins Typ 2 (LIMP-2) zu seinem Liganden β -Glukocerebrosidase auf zellulärer sowie molekularer Ebene vorgenommen. In Interaktions- und Immunfluoreszenzstudien konnte gezeigt werden, dass die beiden Interaktionspartner stärker aneinander binden, wenn der lysosomale pH-Wert zuvor erhöht wurde. Außerdem ließ sich zeigen, dass fehlsortierte LIMP-2-Mutanten im pH-neutralen Milieu des ERs vielfach stärker an die β -Glukocerebrosidase binden als lysosomal lokalisierte LIMP-2-Varianten. Zudem konnte nach erfolgreicher Eingrenzung der für die β -Glukocerebrosidase-Bindung nötigen LIMP-2-Region der LIMP-2-Histidinrest 171 als ein wichtiger Rest für die pH-sensitive Interaktion beider Proteine identifiziert werden. Histidinreste liegen nur unterhalb von pH 6,0 protoniert vor und eine Abstoßung der β -Glukocerebrosidase würde demnach nur in den Endosomen und Lysosomen stattfinden. Die Mutation des Histidins 171 zu einem nicht protonierten Alanin führte zu einer verstärkten Bindung der β -Glukocerebrosidase, während sein Austausch zu einem konstant protonierten Lysin eine verstärkte Abstoßung und eine damit verbundene anteilige ER-Retention sowie eine Verringerung der Enzymaktivität der β -Glukocerebrosidase zur Folge hatte. Demnach konnte auch auf zellulärer Ebene eine pH-Wert-Abhängigkeit der LIMP-2/ β -Glukocerebrosidase-Interaktion bestätigt werden und gleichzeitig ein möglicher Regulationsmechanismus durch den Histidinrest 171 gezeigt werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit war es möglich, eine Hypothese zur Funktionalität einer beobachteten LIMP-2/ (Pro)Renin Rezeptor-Interaktion aufzustellen. Der sowohl vesikulär sowie an der Plasmamembran lokalisierte (Pro)Renin Rezeptor ist als akzessorische Untereinheit der vesikulären H^+ -ATPase wichtig für die Azidifizierung Wnt-Signal-induzierter Endosomen und ist daher essentiell für die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass möglicherweise auch LIMP-2 eine regulatorische Rolle im Wnt-Signalweg spielt. So zeigte sich in durchgeführten Membranpräparations- und Luciferase-Reporter-Experimenten, dass LIMP-2-defiziente Zellen eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Wnt-Stimulation aufwiesen, die durch die Retransfektion von LIMP-2 wieder aufgehoben werden konnte.

7 Summary

In this study the pH-dependent interaction of the lysosomal integral membrane protein type 2 (LIMP-2) and its ligand β -glucocerebrosidase was characterised on a cellular and molecular level. Interaction and immunofluorescence studies revealed a stronger interaction of both binding partners when the lysosomal pH was increased. It could also be shown that all investigated ER-resident LIMP-2-mutants showed a stronger binding to the β -glucocerebrosidase under neutral ER conditions. After narrowing down the LIMP-2 region, important for its interaction with the β -glucocerebrosidase, the highly conserved histidine 171 was identified as a putative regulating residue in the pH-dependent interaction of both proteins. Histidines are only protonated under pH 6.0 and repulsion of the β -glucocerebrosidase would only take place in the endo-/ lysosomal compartment. The mutation of histidine 171 to a non-protonated alanine caused a strong interaction of LIMP-2 and the β -glucocerebrosidase whereas substitution to an instantly protonated lysine led to an early repulsion and a slight ER-retention of the enzyme. Thus, reduced binding capacity caused a partial mistargeting and reduced enzyme activity of β -glucocerebrosidase. In conclusion, this study revealed the pH-dependent interaction of LIMP-2 and the β -glucocerebrosidase on a cellular level and presented the histidine 171 within the LIMP-2 protein as a regulating amino acid in this regard.

The second part of this thesis presented a possible reason for an observed interaction of LIMP-2 and the (pro)renin receptor. The vesicular and plasma membrane localised (pro)renin receptor is an accessory binding partner of the vesicular H^+ -ATPase. Both are important for a wnt-induced acidification of signaling endosomes and thus are necessary for the activation of the wnt-/ β -Catenin signaling pathway. It could be shown that LIMP-2 might also play a regulatory role in the wnt-/ β -Catenin signaling pathway as membrane preparations and luciferase reporter gene experiments revealed that LIMP-2-deficient cells showed a high susceptibility to wnt-stimulation that could be diminished after retransfection of LIMP-2.

8 Literaturverzeichnis

Advani A, Kelly DJ, Cox AJ, White KE, Advani SL, Thai K, Connelly KA, Yuen D, Trogadis J, Herzenberg AM, Kuliszewski MA, Leong-Poi H, Gilbert RE (2009) The (Pro)renin receptor: site-specific and functional linkage to the vacuolar H⁺-ATPase in the kidney. *Hypertension* **54**: 261-269

Aerts JM, Schram AW, Strijland A, van Weely S, Jonsson LM, Tager JM, Sorrell SH, Ginns EI, Barranger JA, Murray GJ (1988) Glucocerebrosidase, a lysosomal enzyme that does not undergo oligosaccharide phosphorylation. *Biochimica et biophysica acta* **964**: 303-308

Al-Awqati Q (1996) Plasticity in epithelial polarity of renal intercalated cells: targeting of the H⁽⁺⁾-ATPase and band 3. *Am J Physiol* **270**: C1571-1580

Alberts B, Johnson A, Walter P (2007) *Molecular Biology of the Cell*, New York and London.

Altermann W, Kazmierczak J (2003) Archean microfossils: a reappraisal of early life on Earth. *Res Microbiol* **154**: 611-617

Andermann E, Andermann F, Carpenter S, Wolfe LS, Nelson R, Patry G, Boileau J (1986) Action myoclonus-renal failure syndrome: a previously unrecognized neurological disorder unmasked by advances in nephrology. *Advances in neurology* **43**: 87-103

Anderson RG, Pathak RK (1985) Vesicles and cisternae in the trans Golgi apparatus of human fibroblasts are acidic compartments. *Cell* **40**: 635-643

Andrejewski N, Punnonen EL, Guhde G, Tanaka Y, Lullmann-Rauch R, Hartmann D, von Figura K, Saftig P (1999) Normal lysosomal morphology and function in LAMP-1-deficient mice. *The Journal of biological chemistry* **274**: 12692-12701

Arai H, Terres G, Pink S, Forgac M (1988) Topography and subunit stoichiometry of the coated vesicle proton pump. *The Journal of biological chemistry* **263**: 8796-8802

Aridor M, Bannykh SI, Rowe T, Balch WE (1995) Sequential coupling between COPII and COPI vesicle coats in endoplasmic reticulum to Golgi transport. *The Journal of cell biology* **131**: 875-893

Asch AS, Silbiger S, Heimer E, Nachman RL (1992) Thrombospondin sequence motif (CSVTCG) is responsible for CD36 binding. *Biochemical and biophysical research communications* **182**: 1208-1217

Badhwar A, Berkovic SF, Dowling JP, Gonzales M, Narayanan S, Brodtmann A, Berzen L, Caviness J, Trenkwalder C, Winkelmann J, Rivest J, Lambert M, Hernandez-Cossio O, Carpenter S, Andermann F, Andermann E (2004) Action myoclonus-renal failure syndrome: characterization of a unique cerebro-renal disorder. *Brain* **127**: 2173-2182

- Balreira A, Gaspar P, Caiola D, Chaves J, Beirao I, Lima JL, Azevedo JE, Miranda MC (2008) A nonsense mutation in the LIMP-2 gene associated with progressive myoclonic epilepsy and nephrotic syndrome. *Human molecular genetics* **17**: 2238-2243
- Bandyopadhyay U, Cuervo AM (2007) Chaperone-mediated autophagy in aging and neurodegeneration: lessons from alpha-synuclein. *Experimental gerontology* **42**: 120-128
- Barriocanal JG, Bonifacino JS, Yuan L, Sandoval IV (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. *The Journal of biological chemistry* **261**: 16755-16763
- Bendikov-Bar I, Ron I, Filocamo M, Horowitz M (2010) Characterization of the ERAD process of the L444P mutant glucocerebrosidase variant. *Blood cells, molecules & diseases*
- Berent SL, Radin NS (1981) Mechanism of activation of glucocerebrosidase by co-beta-glucosidase (glucosidase activator protein). *Biochimica et biophysica acta* **664**: 572-582
- Berkovic SF, Andermann F, Carpenter S, Wolfe LS (1986) Progressive myoclonus epilepsies: specific causes and diagnosis. *The New England journal of medicine* **315**: 296-305
- Berkovic SF, Dibbens LM, Oshlack A, Silver JD, Katerelos M, Vears DF, Lullmann-Rauch R, Blanz J, Zhang KW, Stankovich J, Kalnins RM, Dowling JP, Andermann E, Andermann F, Faldini E, D'Hooge R, Vadlamudi L, Macdonell RA, Hodgson BL, Bayly MA, Savige J, Mulley JC, Smyth GK, Power DA, Saftig P, 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 (1988) Gaucher disease. *Blood Rev* **2**: 59-70
- Beutler E, Demina A, Gelbart T (1994) Glucocerebrosidase mutations in Gaucher disease. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)* **1**: 82-92
- Beyenbach KW, Wieczorek H (2006) The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *The Journal of experimental biology* **209**: 577-589
- Bilic J, Huang YL, Davidson G, Zimmermann T, Cruciat CM, Bienz M, Niehrs C (2007) Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science (New York, NY)* **316**: 1619-1622
- Birch CA (1973) Gaucher's disease. Phillipe Charles Ernest Gaucher (1854-1918). *The Practitioner* **210**: 580

- Blanz J, Groth J, Zachos C, Wehling C, Saftig P, Schwake M (2010) Disease-causing mutations within the lysosomal integral membrane protein type 2 (LIMP-2) reveal the nature of binding to its ligand beta-glucocerebrosidase. *Human molecular genetics* **19**: 563-572
- Blobel G, Sabatini DD (1971) Ribosome-membrane interaction in eukaryotic cells. *Biomembranes*
- Bond JS, Butler PE (1987) Intracellular proteases. *Annual review of biochemistry* **56**: 333-364
- Bonifacino JS, Suzuki CK, Lippincott-Schwartz J, Weissman AM, Klausner RD (1989) Pre-Golgi degradation of newly synthesized T-cell antigen receptor chains: intrinsic sensitivity and the role of subunit assembly. *The Journal of cell biology* **109**: 73-83
- Bowman BJ, Bowman EJ (1986) H⁺-ATPases from mitochondria, plasma membranes, and vacuoles of fungal cells. *J Membr Biol* **94**: 83-97
- Bowman EJ, Kendle R, Bowman BJ (2000) Disruption of vma-1, the gene encoding the catalytic subunit of the vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase, causes severe morphological changes in *Neurospora crassa*. *The Journal of biological chemistry* **275**: 167-176
- Bowman EJ, Siebers A, Altendorf K (1988) Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 7972-7976
- Brady RO, Kanfer JN, Shapiro D (1965) Metabolism of Glucocerebrosides. II. Evidence of an Enzymatic Deficiency in Gaucher's Disease. *Biochemical and biophysical research communications* **18**: 221-225
- Braulke T, Bonifacino JS (2009) Sorting of lysosomal proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1793**: 605-614
- Braulke T, Geuze HJ, Slot JW, Hasilik A, von Figura K (1987) On the effects of weak bases and monensin on sorting and processing of lysosomal enzymes in human cells. *European journal of cell biology* **43**: 316-321
- Brown D, Gluck S, Hartwig J (1987) Structure of the novel membrane-coating material in proton-secreting epithelial cells and identification as an H⁺ATPase. *The Journal of cell biology* **105**: 1637-1648
- Brown D, Orci L (1986) The "coat" of kidney intercalated cell tubulovesicles does not contain clathrin. *Am J Physiol* **250**: C605-608
- Brown WJ, Constantinescu E, Farquhar MG (1984) Redistribution of mannose-6-phosphate receptors induced by tunicamycin and chloroquine. *The Journal of cell biology* **99**: 320-326

Brown WJ, Goodhouse J, Farquhar MG (1986) Mannose-6-phosphate receptors for lysosomal enzymes cycle between the Golgi complex and endosomes. *The Journal of cell biology* **103**: 1235-1247

Busch GL, Lang H, Lang F (1995) Studies on the mechanism of swelling-induced lysosomal alkalization in vascular smooth muscle cells. *European Journal of Physiology* **431**: 7

Butor C, Griffiths G, Aronson NN, Jr., Varki A (1995) Co-localization of hydrolytic enzymes with widely disparate pH optima: implications for the regulation of lysosomal pH. *Journal of cell science* **108 (Pt 6)**: 2213-2219

Campbell CH, Fine RE, Squicciarini J, Rome LH (1983) Coated vesicles from rat liver and calf brain contain cryptic mannose 6-phosphate receptors. *The Journal of biological chemistry* **258**: 2628-2633

Canuel M, Korkidakis A, Konnyu K, Morales CR (2008) Sortilin mediates the lysosomal targeting of cathepsins D and H. *Biochemical and biophysical research communications* **373**: 292-297

Carlsson SR, Lycksell PO, Fukuda M (1993) Assignment of O-glycan attachment sites to the hinge-like regions of human lysosomal membrane glycoproteins lamp-1 and lamp-2. *Archives of biochemistry and biophysics* **304**: 65-73

Chaves J, Beirao I, Balreira A, Gaspar P, Caiola D, Sa-Miranda MC, Lima JL (2011) Progressive myoclonus epilepsy with nephropathy C1q due to SCARB2/LIMP-2 deficiency: clinical report of two siblings. *Seizure* **20**: 738-740

Chen P, Song Z, Qi Y, Feng X, Xu N, Sun Y, Wu X, Yao X, Mao Q, Li X, Dong W, Wan X, Huang N, Shen X, Liang Z, Li W (2012) Molecular determinants of enterovirus 71 viral entry: a cleft around Q172 on VP1 interacts with a variable region on scavenger receptor B 2. *The Journal of biological chemistry*

Chen W, ten Berge D, Brown J, Ahn S, Hu LA, Miller WE, Caron MG, Barak LS, Nusse R, Lefkowitz RJ (2003) Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4. *Science (New York, NY)* **301**: 1391-1394

Cheng YC, Hsueh CC, Lu SC, Liao TH (2006) Identification of three crucial histidine residues (His115, His132 and His297) in porcine deoxyribonuclease II. *The Biochemical journal* **398**: 177-185

Chou KC, Elrod DW (1999) Prediction of membrane protein types and subcellular locations. *Proteins* **34**: 137-153

Cohn ZA, Benson B (1965) The Differentiation of Mononuclear Phagocytes. Morphology, Cytochemistry, and Biochemistry. *The Journal of experimental medicine* **121**: 153-170

- Cong F, Schweizer L, Varmus H (2004) Wnt signals across the plasma membrane to activate the beta-catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP. *Development (Cambridge, England)* **131**: 5103-5115
- Crombie R, 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. *The Journal of biological chemistry* **273**: 4855-4863
- Cruciat CM, Ohkawara B, Acebron SP, Karaulanov E, Reinhard C, Ingelfinger D, Boutros M, Niehrs C (2010) Requirement of prorenin receptor and vacuolar H⁺-ATPase-mediated acidification for Wnt signaling. *Science (New York, NY)* **327**: 459-463
- Dahms NM, Lobel P, Kornfeld S (1989) Mannose 6-phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting. *The Journal of biological chemistry* **264**: 12115-12118
- Dang LT, Purvis AR, Huang RH, Westfield LA, Sadler JE (2011) Phylogenetic and functional analysis of histidine residues essential for pH-dependent multimerization of von Willebrand factor. *The Journal of biological chemistry* **286**: 25763-25769
- Danser AH, Derkx FH, Schalekamp MA, Hense HW, Riegger GA, Schunkert H (1998) Determinants of interindividual variation of renin and prorenin concentrations: evidence for a sexual dimorphism of (pro)renin levels in humans. *J Hypertens* **16**: 853-862
- Dardis A, Filocamo M, Grossi S, Ciana G, Franceschetti S, Dominissini S, Rubboli G, Di Rocco M, Bembi B (2009) Biochemical and molecular findings in a patient with myoclonic epilepsy due to a mistarget of the beta-glucosidase enzyme. *Molecular genetics and metabolism* **97**: 309-311
- Dell'Angelica EC, Klumperman J, Stoorvogel W, Bonifacino JS (1998) Association of the AP-3 adaptor complex with clathrin. *Science (New York, NY)* **280**: 431-434
- Denic V, Quan EM, Weissman JS (2006) A luminal surveillance complex that selects misfolded glycoproteins for ER-associated degradation. *Cell* **126**: 349-359
- Derkx FH, Tan-Tjong L, Wenting GJ, Boomsma F, Man in 't Veld AJ, Schalekamp MA (1983) Asynchronous changes in prorenin and renin secretion after captopril in patients with renal artery stenosis. *Hypertension* **5**: 244-256
- Derkx FH, von Gool JM, Wenting GJ, Verhoeven RP, Man in 't Veld AJ, Schalekamp MA (1976) Inactive renin in human plasma. *Lancet* **1**: 496-499
- Desmond MJ, Lee D, Fraser SA, Katerelos M, Gleich K, Martinello P, Li YQ, Thomas MC, Michelucci R, Cole AJ, Saftig P, Schwake M, Stapleton D, Berkovic SF, Power DA (2011) Tubular proteinuria in mice and humans lacking the intrinsic lysosomal protein SCARB2/Limp-2. *American journal of physiology* **300**: F1437-1447

Dibbens LM, Michelucci R, Gambardella A, Andermann F, Rubboli G, Bayly MA, Joensuu T, Vears DF, Franceschetti S, Canafoglia L, Wallace R, Bassuk AG, Power DA, Tassinari CA, Andermann E, Lehesjoki AE, Berkovic SF (2009) SCARB2 mutations in progressive myoclonus epilepsy (PME) without renal failure. *Annals of neurology* **66**: 532-536

Dietrich N, Thastrup J, Holmberg C, Gyrd-Hansen M, Fehrenbacher N, Lademann U, Lerdrup M, Herdegen T, Jaattela M, Kallunki T (2004) JNK2 mediates TNF-induced cell death in mouse embryonic fibroblasts via regulation of both caspase and cathepsin protease pathways. *Cell death and differentiation* **11**: 301-313

Dingle JT, Fell BH (eds) (1969) *Lysosomes in biology and pathology*: North-Holland Publishing Company

Dittmer F, Ulbrich EJ, Hafner A, Schmahl W, Meister T, Pohlmann R, 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 (Pt 10)**: 1591-1597

Duve d (1959) Lysosomes, a new group of cytoplasmic particles. in *Subcellular Particles*. *Ronald Press, New York, USA*: 128-159

Eckhardt ER, Cai L, Sun B, Webb NR, van der Westhuyzen DR (2004) High density lipoprotein uptake by scavenger receptor SR-BII. *The Journal of biological chemistry* **279**: 14372-14381

Ellgaard L, Molinari M, Helenius A (1999) Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science (New York, NY)* **286**: 1882-1888

Eskelinen EL, Illert AL, Tanaka Y, Schwarzmann G, Blanz J, Von Figura K, Saftig P (2002) Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Molecular biology of the cell* **13**: 3355-3368

Eskelinen EL, Tanaka Y, Saftig P (2003) At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends in cell biology* **13**: 137-145

Fabbro D, Grabowski GA (1991) Human acid beta-glucosidase. Use of inhibitory and activating monoclonal antibodies to investigate the enzyme's catalytic mechanism and saposin A and C binding sites. *The Journal of biological chemistry* **266**: 15021-15027

Febbraio M, Silverstein RL (1990) Identification and characterization of LAMP-1 as an activation-dependent platelet surface glycoprotein. *The Journal of biological chemistry* **265**: 18531-18537

Feldt S, Batenburg WW, Mazak I, Maschke U, Wellner M, Kvakan H, Dechend R, Fiebeler A, Burckle C, Contrepas A, Jan Danser AH, Bader M, Nguyen G, Luft FC, Muller DN (2008) Prorenin and renin-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in monocytes is not blocked by aliskiren or the handle-region peptide. *Hypertension* **51**: 682-688

Fernandez-Recio J, Vazquez A, Civera C, Sevilla P, Sancho J (1997) The tryptophan/histidine interaction in alpha-helices. *J Mol Biol* **267**: 184-197

Forgac M (1998) Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *FEBS letters* **440**: 258-263

Frieda S, Pearce A, Wu J, Silverstein RL (1995) Recombinant GST/CD36 fusion proteins define a thrombospondin binding domain. Evidence for a single calcium-dependent binding site on CD36. *The Journal of biological chemistry* **270**: 2981-2986

Fröhlich, Re (2006) *The Local Cardiac Renin Angiotensin-Aldosterone System*, Vol. 20: E.D. Frohlich R.N. Re.

Fukuda M (1991) Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *The Journal of biological chemistry* **266**: 21327-21330

Futerman AH, van Meer G (2004) The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature reviews* **5**: 554-565

Futter CE, Pearce A, Hewlett LJ, Hopkins CR (1996) Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *The Journal of cell biology* **132**: 1011-1023

Gamp AC, Tanaka Y, Lullmann-Rauch R, Wittke D, D'Hooge R, De Deyn PP, Moser T, Maier H, Hartmann D, Reiss K, Illert AL, von Figura K, Saftig P (2003) LIMP-2/LGP85 deficiency causes ureteric pelvic junction obstruction, deafness and peripheral neuropathy in mice. *Human molecular genetics* **12**: 631-646

Gassmann M, Grenacher B, Rohde B, Vogel J (2009) Quantifying Western blots: pitfalls of densitometry. *Electrophoresis* **30**: 1845-1855

Glaumann H, Ericsson JL, Marzella L (1981) Mechanisms of intralysosomal degradation with special reference to autophagocytosis and heterophagocytosis of cell organelles. *International review of cytology* **73**: 149-182

Gonzalez-Noriega A, Grubb JH, Talkad V, Sly WS (1980) Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhances lysosomal enzyme secretion by impairing receptor recycling. *The Journal of cell biology* **85**: 839-852

Graves AR, Curran PK, Smith CL, Mindell JA (2008) The Cl⁻/H⁺ antiporter ClC-7 is the primary chloride permeation pathway in lysosomes. *Nature* **453**: 788-792

Griffiths GM (2007) Gaucher disease: forging a new path to the lysosome. *Cell* **131**: 647-649

Guggenbuhl P, Grosbois B, Chales G (2008) Gaucher disease. *Joint Bone Spine* **75**: 116-124

Guillen-Ahlers H (2008) Wnt signaling in renal cancer. *Curr Drug Targets* **9**: 591-600

Hagen T, Sethi JK, Foxwell N, Vidal-Puig A (2004) Signalling activity of beta-catenin targeted to different subcellular compartments. *The Biochemical journal* **379**: 471-477

Halaby R, Zakeri Z, Lockshin RA (1994) Metabolic events during programmed cell death in insect labial glands. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* **72**: 597-601

Hammond C, Helenius A (1995) Quality control in the secretory pathway. *Current opinion in cell biology* **7**: 523-529

He M, Zhang L, Shao Y, Wang X, Huang Y, Yao T, Lu L (2009a) Inhibition of renin/prorenin receptor attenuated mesangial cell proliferation and reduced associated fibrotic factor release. *Eur J Pharmacol* **606**: 155-161

He W, Dai C, Li Y, Zeng G, Monga SP, Liu Y (2009b) Wnt/beta-catenin signaling promotes renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* **20**: 765-776

Hentze M, Hasilik A, von Figura K (1984) Enhanced degradation of cathepsin D synthesized in the presence of the threonine analog beta-hydroxynorvaline. *Archives of biochemistry and biophysics* **230**: 375-382

Hiraiwa M, Martin BM, Kishimoto Y, Conner GE, Tsuji S, O'Brien JS (1997) Lysosomal proteolysis of prosaposin, the precursor of saposins (sphingolipid activator proteins): its mechanism and inhibition by ganglioside. *Archives of biochemistry and biophysics* **341**: 17-24

Hiraiwa M, O'Brien JS, Kishimoto Y, Galdzicka M, Fluharty AL, Ginns EI, Martin BM (1993) Isolation, characterization, and proteolysis of human prosaposin, the precursor of saposins (sphingolipid activator proteins). *Archives of biochemistry and biophysics* **304**: 110-116

Ho MM, Vinson GP (1998) Transcription of (pro)renin mRNA in the rat adrenal cortex, and the effects of ACTH treatment and a low sodium diet. *J Endocrinol* **157**: 217-223

Hocevar BA, Mou F, Rennolds JL, Morris SM, Cooper JA, Howe PH (2003) Regulation of the Wnt signaling pathway by disabled-2 (Dab2). *The EMBO journal* **22**: 3084-3094

Höning S, Sandoval IV, von Figura K (1998) A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3. *The EMBO journal* **17**: 1304-1314

Hopfner F, Schormair B, Knauf F, Berthele A, Tolle TR, Baron R, Maier C, Treede RD, Binder A, Sommer C, Maihofner C, Kunz W, Zimprich F, Heemann U, Pfeufer A, Nabauer M, Kaab S, Nowak B, Gieger C, Lichtner P, Trenkwalder C, Oexle K, Winkelmann J (2011) Novel SCARB2 mutation in Action Myoclonus-Renal Failure syndrome and evaluation of SCARB2 mutations in isolated AMRF features. *BMC neurology* **11**: 134

Huang J, Siragy HM (2009) Glucose promotes the production of interleukine-1beta and cyclooxygenase-2 in mesangial cells via enhanced (Pro)renin receptor expression. *Endocrinology* **150**: 5557-5565

Huang Y, Noble NA, Zhang J, Xu C, Border WA (2007) Renin-stimulated TGF-beta1 expression is regulated by a mitogen-activated protein kinase in mesangial cells. *Kidney international* **72**: 45-52

Huang Y, Wongamorntham S, Kasting J, McQuillan D, Owens RT, Yu L, Noble NA, Border W (2006) Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms. *Kidney international* **69**: 105-113

Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrmann BG, Kemler R (1996) Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* **59**: 3-10

Huss M, Ingenhorst G, Konig S, Gassel M, Droese S, Zeeck A, Altendorf K, Wiczorek H (2002) Concanamycin A, the specific inhibitor of V-ATPases, binds to the V(o) subunit c. *The Journal of biological chemistry* **277**: 40544-40548

Huss M, Sasse F, Kunze B, Jansen R, Steinmetz H, Ingenhorst G, Zeeck A, Wiczorek H (2005) Archazolid and apicularen: novel specific V-ATPase inhibitors. *BMC Biochem* **6**: 13

Ichihara A, Hayashi M, Kaneshiro Y, Suzuki F, Nakagawa T, Tada Y, Koura Y, Nishiyama A, Okada H, Uddin MN, Nabi AH, Ishida Y, Inagami T, Saruta T (2004) Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the "handle" region for nonproteolytic activation of prorenin. *The Journal of clinical investigation* **114**: 1128-1135

Ichihara A, Kaneshiro Y, Takemitsu T, Sakoda M, Nakagawa T, Nishiyama A, Kawachi H, Shimizu F, Inagami T (2006a) Contribution of nonproteolytically activated prorenin in glomeruli to hypertensive renal damage. *J Am Soc Nephrol* **17**: 2495-2503

Ichihara A, Suzuki F, Nakagawa T, Kaneshiro Y, Takemitsu T, Sakoda M, Nabi AH, Nishiyama A, Sugaya T, Hayashi M, Inagami T (2006b) Prorenin receptor blockade inhibits development of glomerulosclerosis in diabetic angiotensin II type 1a receptor-deficient mice. *J Am Soc Nephrol* **17**: 1950-1961

Ioannou YA (2000) The structure and function of the Niemann-Pick C1 protein. *Molecular genetics and metabolism* **71**: 175-181

Jahn TR, Radford SE (2005) The Yin and Yang of protein folding. *FEBS J* **272**: 5962-5970

Kaneshiro Y, Ichihara A, Sakoda M, Takemitsu T, Nabi AH, Uddin MN, Nakagawa T, Nishiyama A, Suzuki F, Inagami T, Itoh H (2007) Slowly progressive, angiotensin II-

independent glomerulosclerosis in human (pro)renin receptor-transgenic rats. *J Am Soc Nephrol* **18**: 1789-1795

Kaneshiro Y, Ichihara A, Takemitsu T, Sakoda M, Suzuki F, Nakagawa T, Hayashi M, Inagami T (2006) Increased expression of cyclooxygenase-2 in the renal cortex of human prorenin receptor gene-transgenic rats. *Kidney international* **70**: 641-646

Kawasaki-Nishi S, Bowers K, Nishi T, Forgacs M, Stevens TH (2001) The amino-terminal domain of the vacuolar proton-translocating ATPase a subunit controls targeting and in vivo dissociation, and the carboxyl-terminal domain affects coupling of proton transport and ATP hydrolysis. *The Journal of biological chemistry* **276**: 47411-47420

Kelly JW (1998) The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways. *Curr Opin Struct Biol* **8**: 101-106

Ketteler R, Glaser S, Sandra O, Martens UM, Klingmuller U (2002) Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors. *Gene Ther* **9**: 477-487

Kim JH, Johannes L, Goud B, Antony C, Lingwood CA, Daneman R, Grinstein S (1998) Noninvasive measurement of the pH of the endoplasmic reticulum at rest and during calcium release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 2997-3002

King JO (1975) Progressive myoclonic epilepsy due to Gaucher's disease in an adult. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **38**: 849-854

Kinouchi K, Ichihara A, Sano M, Sun-Wada GH, Wada Y, Kurauchi-Mito A, Bokuda K, Narita T, Oshima Y, Sakoda M, Tamai Y, Sato H, Fukuda K, Itoh H (2010) The (pro)renin receptor/ATP6AP2 is essential for vacuolar H⁺-ATPase assembly in murine cardiomyocytes. *Circulation research* **107**: 30-34

Knipper M, Claussen C, Ruttiger L, Zimmermann U, Lullmann-Rauch R, Eskelinen EL, Schroder J, Schwake M, 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. *The Journal of physiology* **576**: 73-86

Kolter T, Sandhoff K (2006) Sphingolipid metabolism diseases. *Biochimica et biophysica acta* **1758**: 2057-2079

Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H (1997) Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science (New York, NY)* **275**: 1784-1787

Kornak U, Kasper D, Bosl MR, Kaiser E, Schweizer M, Schulz A, Friedrich W, Delling G, Jentsch TJ (2001) Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* **104**: 205-215

Kornfeld R, Bao M, Brewer K, Noll C, Canfield W (1999) Molecular cloning and functional expression of two splice forms of human N-acetylglucosamine-1-phosphodiester alpha-N-acetylglucosaminidase. *The Journal of biological chemistry* **274**: 32778-32785

Kornfeld S, Mellman I (1989) The biogenesis of lysosomes. *Annual review of cell biology* **5**: 483-525

Kraehenbuhl JP, Racine L, Jamieson JD (1977) Immunocytochemical localization of secretory proteins in bovine pancreatic exocrine cells. *The Journal of cell biology* **72**: 406-423

Krop M, Danser AH (2008) Circulating versus tissue renin-angiotensin system: on the origin of (pro)renin. *Curr Hypertens Rep* **10**: 112-118

Kulkarni MV, Tettamanzi MC, Murphy JW, Keeler C, Myszka DG, Chayen NE, Lolis EJ, Hodsdon ME (2010) Two independent histidines, one in human prolactin and one in its receptor, are critical for pH-dependent receptor recognition and activation. *The Journal of biological chemistry* **285**: 38524-38533

Kundra R, Kornfeld S (1999) Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. *The Journal of biological chemistry* **274**: 31039-31046

Kuronita T, Eskelinen EL, Fujita H, Saftig P, Himeno M, 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, Tanaka Y (2005) The NH(2)-terminal transmembrane and luminal domains of LGP85 are needed for the formation of enlarged endosomes/lysosomes. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **6**: 895-906

L'Huillier N, Sharp MGF, Dunbar DR, Mullins JJ. (2006) On the Relationship Between the Renin Receptor and the Vacuolar Proton-ATPase Membrane Sector-Associated Protein (M8-9) *The Local Cardiac Renin Angiotensin-Aldosterone System*. E.D. Frohlich R.N. Re, Vol. 20, pp. 17-34.

Lauffer L, Garcia PD, Harkins RN, Coussens L, Ullrich A, Walter P (1985) Topology of signal recognition particle receptor in endoplasmic reticulum membrane. *Nature* **318**: 334-338

Le Borgne R, Griffiths G, Hoflack B (1996) Mannose 6-phosphate receptors and ADP-ribosylation factors cooperate for high affinity interaction of the AP-1 Golgi assembly proteins with membranes. *The Journal of biological chemistry* **271**: 2162-2170

Leech RW, Shuman RM, Putnam WD, Rance F, Jewett TT (1985) Gaucher's disease: a case history with extensive lipid storage in the brain. *Am J Clin Pathol* **83**: 516-519

Lefrancois S, Zeng J, Hassan AJ, Canuel M, Morales CR (2003) The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *The EMBO journal* **22**: 6430-6437

Ludwig J, Kerscher S, Brandt U, Pfeiffer K, Getlawi F, Apps DK, Schagger H (1998) Identification and characterization of a novel 9.2-kDa membrane sector-associated protein of vacuolar proton-ATPase from chromaffin granules. *The Journal of biological chemistry* **273**: 10939-10947

Lupas AN, Gruber M (2005) The structure of alpha-helical coiled coils. *Adv Protein Chem* **70**: 37-78

Luzio JP, Pryor PR, Bright NA (2007) Lysosomes: fusion and function. *Nature reviews* **8**: 622-632

Maegawa GH, Tropak MB, Buttner JD, Rigat BA, Fuller M, Pandit D, Tang L, Kornhaber GJ, Hamuro Y, Clarke JT, Mahuran DJ (2009) Identification and characterization of ambroxol as an enzyme enhancement agent for Gaucher disease. *The Journal of biological chemistry* **284**: 23502-23516

Makrypidi G, Damme M, Muller-Loennies S, Trusch M, Schmidt B, Schluter H, Heeren J, Lubke T, Saftig P, Braulke T (2011) Mannose 6-dephosphorylation of lysosomal proteins mediated by acid phosphatases Acp2 and Acp5. *Mol Cell Biol*

Mao B, Wu W, Li Y, Hoppe D, Stannek P, Glinka A, Niehrs C (2001) LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* **411**: 321-325

Matavelli LC, Huang J, Siragy HM (2010) (Pro)renin receptor contributes to diabetic nephropathy by enhancing renal inflammation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **37**: 277-282

Mego JL, Farb RM, Barnes J (1972) An adenosine triphosphate-dependent stabilization of proteolytic activity in heterolysosomes. Evidence for a proton pump. *The Biochemical journal* **128**: 763-769

Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF (1999) Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* **281**: 249-254

Meivar-Levy I, Horowitz M, Futerman AH (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 (Pt 2)**: 377-382

Mellman I, Fuchs R, Helenius A (1986) Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annual review of biochemistry* **55**: 663-700

Melnyk RA, Tam J, Boie Y, Kennedy BP, Percival MD (2009) Renin and prorenin activate pathways implicated in organ damage in human mesangial cells independent of angiotensin II production. *Am J Nephrol* **30**: 232-243

Metzelaar MJ, Clevers HC (1992) Lysosomal membrane glycoproteins in platelets. *Thromb Haemost* **68**: 378-382

Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, Sommer T (2005) ERAD: the long road to destruction. *Nature cell biology* **7**: 766-772

Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destree O, Clevers H (1996) XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* **86**: 391-399

Morimoto S, Kishimoto Y, Tomich J, Weiler S, Ohashi T, Barranger JA, Kretz KA, O'Brien JS (1990) Interaction of saposins, acidic lipids, and glucosylceramidase. *The Journal of biological chemistry* **265**: 1933-1937

Morimoto S, Martin BM, Kishimoto Y, O'Brien JS (1988) Saposin D: a sphingomyelinase activator. *Biochemical and biophysical research communications* **156**: 403-410

Morimoto S, Martin BM, Yamamoto Y, Kretz KA, O'Brien JS, Kishimoto Y (1989) Saposin A: second cerebroside activator protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 3389-3393

Munro S, Pelham HR (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**: 899-907

Murphy RF, Powers S, Cantor CR (1984) Endosome pH measured in single cells by dual fluorescence flow cytometry: rapid acidification of insulin to pH 6. *The Journal of cell biology* **98**: 1757-1762

Nakamura T, Hamada F, Ishidate T, Anai K, Kawahara K, Toyoshima K, Akiyama T (1998) Axin, an inhibitor of the Wnt signalling pathway, interacts with beta-catenin, GSK-3beta and APC and reduces the beta-catenin level. *Genes Cells* **3**: 395-403

Naves MA, Requião-Moura LR, Soares MF, Silva-Junior JA, Mastroianni-Kirsztajn G, Teixeira VP (2011) Podocyte Wnt/ss-catenin pathway is activated by integrin-linked kinase in clinical and experimental focal segmental glomerulosclerosis. *Journal of nephrology*: 0

Neudorfer O, Giladi N, Elstein D, Abrahamov A, Turezkite T, Aghai E, Reches A, Bembi B, Zimran A (1996) Occurrence of Parkinson's syndrome in type I Gaucher disease. *Qjm* **89**: 691-694

Nguyen G (2006) Increased cyclooxygenase-2, hyperfiltration, glomerulosclerosis, and diabetic nephropathy: put the blame on the (pro)renin receptor? *Kidney international* **70**: 618-620

Nguyen G, Danser AH (2008) Prorenin and (pro)renin receptor: a review of available data from in vitro studies and experimental models in rodents. *Experimental physiology* **93**: 557-563

Nguyen G, Delarue F, Berrou J, Rondeau E, Sraer JD (1996) Specific receptor binding of renin on human mesangial cells in culture increases plasminogen activator inhibitor-1 antigen. *Kidney international* **50**: 1897-1903

Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD (2002) Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *The Journal of clinical investigation* **109**: 1417-1427

Ni X, Morales CR (2006) The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **7**: 889-902

O'Brien JS, Kishimoto Y (1991) Saposin proteins: structure, function, and role in human lysosomal storage disorders. *Faseb J* **5**: 301-308

Ohkuma S, Poole B (1978) Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**: 3327-3331

Olson LJ, Hindsgaul O, Dahms NM, Kim JJ (2008) Structural insights into the mechanism of pH-dependent ligand binding and release by the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. *The Journal of biological chemistry* **283**: 10124-10134

Oshima Y, Kinouchi K, Ichihara A, Sakoda M, Kurauchi-Mito A, Bokuda K, Narita T, Kurosawa H, Sun-Wada GH, Wada Y, Yamada T, Takemoto M, Saleem MA, Quaggin SE, Itoh H (2011) Prorenin Receptor Is Essential for Normal Podocyte Structure and Function. *J Am Soc Nephrol*

Palomares AJ, DeLuca MA, Helinski DR (1989) Firefly luciferase as a reporter enzyme for measuring gene expression in vegetative and symbiotic *Rhizobium meliloti* and other gram-negative bacteria. *Gene* **81**: 55-64

Park JK, Orvisky E, Tayebi N, Kaneski C, Lamarca ME, Stubblefield BK, Martin BM, Schiffmann R, Sidransky E (2003) Myoclonic epilepsy in Gaucher disease: genotype-phenotype insights from a rare patient subgroup. *Pediatric research* **53**: 387-395

Paroutis P, Touret N, Grinstein S (2004) The pH of the secretory pathway: measurement, determinants, and regulation. *Physiology (Bethesda)* **19**: 207-215

Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D (1993) Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 8392-8396

Petersen CM, Nielsen MS, Nykjaer A, Jacobsen L, Tommerup N, Rasmussen HH, Roigaard H, Gliemann J, Madsen P, Moestrup SK (1997) Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *The Journal of biological chemistry* **272**: 3599-3605

Pohl FM, Jovin TM, Baehr W, Holbrook JJ (1972) Ethidium bromide as a cooperative effector of a DNA structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**: 3805-3809

Pool MR (2005) Signal recognition particles in chloroplasts, bacteria, yeast and mammals (review). *Mol Membr Biol* **22**: 3-15

Puertollano R, Aguilar RC, Gorshkova I, Crouch RJ, Bonifacino JS (2001) Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs. *Science (New York, NY)* **292**: 1712-1716

Qian ZM, Li H, Sun H, Ho K (2002) Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol Rev* **54**: 561-587

Rafi MA, de Gala G, Zhang XL, Wenger DA (1993) Mutational analysis in a patient with a variant form of Gaucher disease caused by SAP-2 deficiency. *Somatic cell and molecular genetics* **19**: 1-7

Ramser J, Abidi FE, Burckle CA, Lenski C, Toriello H, Wen G, Lubs HA, Engert S, Stevenson RE, Meindl A, Schwartz CE, Nguyen G (2005) A unique exonic splice enhancer mutation in a family with X-linked mental retardation and epilepsy points to a novel role of the renin receptor. *Human molecular genetics* **14**: 1019-1027

Rapoport TA (1986) Protein translocation across and integration into membranes. *CRC Crit Rev Biochem* **20**: 73-137

Rawadi G, Dussurget O (1995) Advances in PCR-based detection of mycoplasmas contaminating cell cultures. *PCR Methods Appl* **4**: 199-208

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

Reitman ML, Kornfeld S (1981) UDP-N-acetylglucosamine:glycoprotein N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. Proposed enzyme for the phosphorylation of the high mannose oligosaccharide units of lysosomal enzymes. *The Journal of biological chemistry* **256**: 4275-4281

Rijnboutt S, Aerts HM, Geuze HJ, Tager JM, Strous GJ (1991) Mannose 6-phosphate-independent membrane association of cathepsin D, glucocerebrosidase, and sphingolipid-activating protein in HepG2 cells. *The Journal of biological chemistry* **266**: 4862-4868

Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL (1994) Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* **78**: 761-771

Rohl CA, Fiori W, Baldwin RL (1999) Alanine is helix-stabilizing in both template-nucleated and standard peptide helices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 3682-3687

- Ron I, Horowitz M (2005) ER retention and degradation as the molecular basis underlying Gaucher disease heterogeneity. *Human molecular genetics* **14**: 2387-2398
- Ron I, Rapaport D, Horowitz M (2010) Interaction between parkin and mutant glucocerebrosidase variants: a possible link between Parkinson disease and Gaucher disease. *Human molecular genetics* **19**: 3771-3781
- Rothman JE, Katz FN, Lodish HF (1978) Glycosylation of a membrane protein is restricted to the growing polypeptide chain but is not necessary for insertion as a transmembrane protein. *Cell* **15**: 1447-1454
- Rötzschke O, Lau JM, Hofstatter M, Falk K, Strominger JL (2002) A pH-sensitive histidine residue as control element for ligand release from HLA-DR molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 16946-16950
- Rubattu S, Quimby FW, Sealey JE (1991) Tissue renin and prorenin increase in female cats during the reproductive cycle without commensurate changes in plasma, amniotic or ovarian follicular fluid. *J Hypertens* **9**: 525-535
- Saftig P, Klumperman J (2009) Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nature reviews* **10**: 623-635
- Sakane H, Yamamoto H, Kikuchi A (2010) LRP6 is internalized by Dkk1 to suppress its phosphorylation in the lipid raft and is recycled for reuse. *Journal of cell science* **123**: 360-368
- Sakoda M, Ichihara A, Kaneshiro Y, Takemitsu T, Nakazato Y, Nabi AH, Nakagawa T, Suzuki F, Inagami T, Itoh H (2007) (Pro)renin receptor-mediated activation of mitogen-activated protein kinases in human vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res* **30**: 1139-1146
- Sandhoff K, van Echten G, Schroder M, Schnabel D, Suzuki K (1992) Metabolism of glycolipids: the role of glycolipid-binding proteins in the function and pathobiochemistry of lysosomes. *Biochemical Society transactions* **20**: 695-699
- Sandoval IV, Arredondo JJ, Alcalde J, Gonzalez Noriega A, Vandekerckhove J, Jimenez MA, 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. *The Journal of biological chemistry* **269**: 6622-6631
- Saris JJ, t Hoen PA, Garrelds IM, Dekkers DH, den Dunnen JT, Lamers JM, Jan Danser AH (2006) Prorenin induces intracellular signaling in cardiomyocytes independently of angiotensin II. *Hypertension* **48**: 564-571

Sawkar AR, D'Haese W, Kelly JW (2006) Therapeutic strategies to ameliorate lysosomal storage disorders--a focus on Gaucher disease. *Cell Mol Life Sci* **63**: 1179-1192

Schachter H (1974) Glycosylation of glycoproteins during intracellular transport of secretory products. *Advances in cytopharmacology* **2**: 207-218

Schaffenburg CA, Haase, Goldblatt H (1960) Concentration of renin in kidneys and angiotensinogen in serum of various species. *Am J Physiol* **199**: 788-792

Schlesinger PH, Blair HC, Teitelbaum SL, Edwards JC (1997) Characterization of the osteoclast ruffled border chloride channel and its role in bone resorption. *The Journal of biological chemistry* **272**: 18636-18643

Schmid SL, McNiven MA, De Camilli P (1998) Dynamin and its partners: a progress report. *Current opinion in cell biology* **10**: 504-512

Schnabel D, Schroder M, Sandhoff K (1991) Mutation in the sphingolipid activator protein 2 in a patient with a variant of Gaucher disease. *FEBS letters* **284**: 57-59

Schneider DL (1981) ATP-dependent acidification of intact and disrupted lysosomes. Evidence for an ATP-driven proton pump. *The Journal of biological chemistry* **256**: 3858-3864

Schröder J (2008) Funktionelle Analyse der lysosomalen integralen Membranproteine LIMP-1 und LIMP-2. 210

Schröder J, Lullmann-Rauch R, Himmerkus N, Pleines I, Nieswandt B, Orinska Z, Koch-Nolte F, Schroder B, Bleich M, Saftig P (2009) Deficiency of the tetraspanin CD63 associated with kidney pathology but normal lysosomal function. *Mol Cell Biol* **29**: 1083-1094

Schweizer A, Fransen JA, Matter K, Kreis TE, Ginsel L, Hauri HP (1990) Identification of an intermediate compartment involved in protein transport from endoplasmic reticulum to Golgi apparatus. *European journal of cell biology* **53**: 185-196

Selkoe DJ (2003) Folding proteins in fatal ways. *Nature* **426**: 900-904

Shan Z, Cuadra AE, Sumners C, Raizada MK (2008) Characterization of a functional (pro)renin receptor in rat brain neurons. *Experimental physiology* **93**: 701-708

Sherf BA (1996) Dual-Luciferase® reporter assay: An advanced coreporter technology integrating firefly and Renilla luciferase assays. 8

Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A (1999) The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 5522-5527

Sihn G, Rousselle A, Vilianovitch L, Burckle C, Bader M (2010) Physiology of the (pro)renin receptor: Wnt of change? *Kidney international* **78**: 246-256

Silverstein RL, Asch AS, Nachman RL (1989) Glycoprotein IV mediates thrombospondin-dependent platelet-monocyte and platelet-U937 cell adhesion. *The Journal of clinical investigation* **84**: 546-552

Silverstein RL, Febbraio M (1992) Identification of lysosome-associated membrane protein-2 as an activation-dependent platelet surface glycoprotein. *Blood* **80**: 1470-1475

Sly WS (1985) Receptor-mediated transport of acid hydrolases to lysosomes. *Curr Top Cell Regul* **26**: 27-38

Smith RL, Hutchins GM, Sack GH, Jr., Ridolfi RL (1978) Unusual cardiac, renal and pulmonary involvement in Gaucher's disease. Intersitial glucocerebroside accumulation, pulmonary hypertension and fatal bone marrow embolization. *The American journal of medicine* **65**: 352-360

Somlo M, Avner PR, Cosson J, Dujon B, Krupa M (1974) Oligomycin sensitivity of ATPase studied as a function of mitochondrial biogenesis, using mitochondrially determined oligomycin-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *European journal of biochemistry / FEBS* **42**: 439-445

Stevens TH, Forgac M (1997) Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase. *Annual review of cell and developmental biology* **13**: 779-808

Sun Y, Qi X, Grabowski GA (2003) Saposin C is required for normal resistance of acid beta-glucosidase to proteolytic degradation. *The Journal of biological chemistry* **278**: 31918-31923

Surendran K, McCaul SP, Simon TC (2002) A role for Wnt-4 in renal fibrosis. *American journal of physiology* **282**: F431-441

Suzuki F, Hayakawa M, Nakagawa T, Nasir UM, Ebihara A, Iwasawa A, Ishida Y, Nakamura Y, Murakami K (2003) Human prorenin has "gate and handle" regions for its non-proteolytic activation. *The Journal of biological chemistry* **278**: 22217-22222

Szilagyi A, Mukhopadhyay AK, Werling J, Szabo I (1995) Regulation of placental prorenin secretion from the early human placenta in vitro. *Early Pregnancy* **1**: 119-123

Tanaka Y, Guhde G, Suter A, Eskelinen EL, Hartmann D, Lullmann-Rauch R, Janssen PM, Blanz J, von Figura K, Saftig P (2000) Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* **406**: 902-906

Tandon NN, Kralisz U, Jamieson GA (1989) Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *The Journal of biological chemistry* **264**: 7576-7583

- Tikkanen R, Peltola M, Oinonen C, Rouvinen J, Peltonen L (1997) Several cooperating binding sites mediate the interaction of a lysosomal enzyme with phosphotransferase. *The EMBO journal* **16**: 6684-6693
- Tomashek JJ, Brusilow WS (2000) Stoichiometry of energy coupling by proton-translocating ATPases: a history of variability. *J Bioenerg Biomembr* **32**: 493-500
- Trimble RB, Tarentino AL, Plummer TH, Jr., Maley F (1978) Asparaginyglycopeptides with a low mannose content are hydrolyzed by endo-beta-N-acetylglucosaminidase H. *The Journal of biological chemistry* **253**: 4508-4511
- Tsuji S, Choudary PV, Martin BM, Stubblefield BK, Mayor JA, Barranger JA, Ginns EI (1987) A mutation in the human glucocerebrosidase gene in neuronopathic Gaucher's disease. *The New England journal of medicine* **316**: 570-575
- Tyedmers J, Mogk A, Bukau B (2010) Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nature reviews* **11**: 777-788
- Tylki-Szymanska A, Czartoryska B, Vanier MT, Poorthuis BJ, Groener JA, Lugowska A, Millat G, Vaccaro AM, Jurkiewicz E (2007) Non-neuronopathic Gaucher disease due to saposin C deficiency. *Clinical genetics* **72**: 538-542
- Uemori T, Asada K, Kato I (1992) Amplification of the 16–23S spacer region in rRNA operons of mycoplasmas by the polymerase chain reaction. *System Appl Microbiol* **15**: 6
- van Dongen JM, Willemsen R, Ginns EI, Sips HJ, Tager JM, Barranger JA, Reuser AJ (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
- Varki A, Kornfeld S (1980) Identification of a rat liver alpha-N-acetylglucosaminyl phosphodiesterase capable of removing "blocking" alpha-N-acetylglucosamine residues from phosphorylated high mannose oligosaccharides of lysosomal enzymes. *The Journal of biological chemistry* **255**: 8398-8401
- Varki A, Reitman ML, Vannier A, Kornfeld S, Grubb JH, Sly WS (1982) Demonstration of the heterozygous state for I-cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy by assay of N-acetylglucosaminylphosphotransferase in white blood cells and fibroblasts. *American journal of human genetics* **34**: 717-729
- Vega MA, Rodriguez F, Segui B, Cales C, Alcalde J, Sandoval IV (1991b) Targeting of lysosomal integral membrane protein LIMP II. The tyrosine-lacking carboxyl cytoplasmic tail of LIMP II is sufficient for direct targeting to lysosomes. *The Journal of biological chemistry* **266**: 16269-16272
- Vega MA, Segui-Real B, Garcia JA, Cales C, Rodriguez F, Vanderkerckhove J, Sandoval IV (1991a) Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat LIMP II, a novel 74-kDa lysosomal membrane protein related to the surface adhesion protein CD36. *The Journal of biological chemistry* **266**: 16818-16824

Walter P, Blobel G (1981) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *The Journal of cell biology* **91**: 551-556

Walter P, Ibrahimi I, Blobel G (1981) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *The Journal of cell biology* **91**: 545-550

Weinert S, Jabs S, Supanchart C, Schweizer M, Gimber N, Richter M, Rademann J, Stauber T, Kornak U, Jentsch TJ (2010) Lysosomal pathology and osteopetrosis upon loss of H⁺-driven lysosomal Cl⁻ accumulation. *Science (New York, NY)* **328**: 1401-1403

Wendland M, Waheed A, von Figura K, Pohlmann R (1991) Mr 46,000 mannose 6-phosphate receptor. The role of histidine and arginine residues for binding of ligand. *The Journal of biological chemistry* **266**: 2917-2923

Wilson DM, Luetscher JA (1990) Plasma prorenin activity and complications in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England journal of medicine* **323**: 1101-1106

Witte MD, Kallemeijn WW, Aten J, Li KY, Strijland A, Donker-Koopman WE, van den Nieuwendijk AM, Bleijlevens B, Kramer G, Florea BI, Hooibrink B, Hollak CE, Ottenhoff R, Boot RG, van der Marel GA, Overkleeft HS, Aerts JM (2010) Ultrasensitive in situ visualization of active glucocerebrosidase molecules. *Nature chemical biology* **6**: 907-913

Yamamoto H, Komekado H, Kikuchi A (2006) Caveolin is necessary for Wnt-3a-dependent internalization of LRP6 and accumulation of beta-catenin. *Dev Cell* **11**: 213-223

Yamayoshi S, Yamashita Y, Li J, Hanagata N, Minowa T, Takemura T, Koike S (2009) Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. *Nature medicine* **15**: 798-801

Yan Y, Deneff N, Schupbach T (2009) The vacuolar proton pump, V-ATPase, is required for notch signaling and endosomal trafficking in *Drosophila*. *Dev Cell* **17**: 387-402

Yokota S, Atsumi S (1983) Immunoelectron microscopic localization of cathepsin D in lysosomes of rat nerve cells. *Histochemistry* **79**: 345-352

Yoshimori T, Yamamoto A, Moriyama Y, Futai M, Tashiro Y (1991) Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H⁽⁺⁾-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *The Journal of biological chemistry* **266**: 17707-17712

Yu YB (2002) Coiled-coils: stability, specificity, and drug delivery potential. *Adv Drug Deliv Rev* **54**: 1113-1129

Yuan L, Morales CR (2010) A stretch of 17 amino acids in the prosaposin C terminus is critical for its binding to sortilin and targeting to lysosomes. *J Histochem Cytochem* **58**: 287-300

Zeng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R, Okamura H, Woodgett J, He X (2005) A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* **438**: 873-877

Zhang J, Noble NA, Border WA, Owens RT, Huang Y (2008) Receptor-dependent prorenin activation and induction of PAI-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**: E810-819

9 Lebenslauf

| | |
|----------------------------|------------------|
| <u>Name</u> | Christina Zachos |
| <u>Geburtsdatum</u> | 01. März 1980 |
| <u>Geburtsort</u> | Kiel |
| <u>Familienstand</u> | ledig |
| <u>Staatsangehörigkeit</u> | deutsch |

Promotion

seit 09/ 2008

Lehrstuhl für Biochemie, Arbeitsgruppe Professor Paul Saftig, CAU Kiel

DFG-gefördertes Stipendium durch Mitgliedschaft in einem Graduiertenkolleg (GRK 1459)

Studium

WS 2001 – SS 2008

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Erstes Semester Chemie:

anorganisch, qualitative Analytik

Studium der Biologie

Hauptfach: Zellbiologie/ Molekularbiologie

Nebenfächer: Zoologie und Toxikologie

Thema der Diplomarbeit:

Die LIMP-2-abhängige Prozessierung und Zielsteuerung von Prosaposin (Note 1,3)

Abitur

1998 – 2001

Gymnasiale Oberstufe Integrierte Gesamtschule Friedrichs-ort Kiel

Abitur (Note 1,6)

Publikationsliste

Wissenschaftliche Artikel

- 2010 Blanz, J, J. Groth, **C. Zachos**, C. Wehling, P. Saftig, M. Schwake. "Disease-causing mutations within the lysosomal integral membrane protein type 2 (LIMP-2) reveal the nature of binding to its ligand beta-glucocerebrosidase." Hum Mol Genet **19**(4): 563-72. (2010)

Kongresse / Meetings

- 11/2011 **Evaluation des Graduiertenkollegs 1459 UKE, Hamburg**
Characterisation of β -Glucocerebrosidase/ LIMP-2 Binding and Novel LIMP-2 Interaction Partners (Posterpräsentation).
- 05/ 2010 **Internationales Symposium UKE, Hamburg**
Proteintrafficking in Health and Disease (Symposiumsorganisation und Posterpräsentation)
- 04/ 2010 **Progress Meeting CAU Kiel und UKE Hamburg Lysosomal Research, Westerland**
(Scientific Talk)
- 2008 - 2011 **Jährliches Progress Meeting des GRK 1459**
Sorting and Interactions Between Proteins of Subcellular Compartments (Scientific Talk)

10 Danksagung

Ich bedanke mich von ganzem Herzen bei allen, die mir diese Arbeit ermöglicht haben und die mich bei deren Anfertigung unterstützt haben.

- Ich bedanke mich bei Professor Dr. Paul Saftig, der mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat und dessen Tür stets offen stand, wenn ich Rat und Hilfestellung brauchte.
- Ich bedanke mich bei PD Dr. Michael Schwake für seine direkte Betreuung und die vielen guten Vorschläge und die kreativen Ideen.
- Den beiden Betreuern danke ich besonders, dass sie viel Zeit und Energie für ausgiebige Doktoranden- und Literaturseminare investiert haben, in denen ich regelmäßig üben konnte Präsentationen zu verfassen, zu halten und mit Hilfe der anregenden Kritik zu verbessern.
- Ich bedanke mich beim Graduiertenkolleg 1459 und bei Professor Dr. Thomas Braulke natürlich für die finanzielle, vor allem aber für die ideelle Förderung während meiner Promotion. Besonders die Möglichkeit, viele hoch angesehene Wissenschaftler persönlich kennenzulernen und ihren interessanten Vorträgen beizuwohnen sowie die Möglichkeit, an Tagungen und regelmäßigen Forschertreffen teilnehmen zu können, hat mich sehr begeistert.
- Ganz herzlich möchte ich mich auch bei allen meinen Kollegen bedanken, von denen so einige zu Freunden geworden sind. Das Arbeitsklima war über die gesamte Zeit meiner Promotion wirklich ausgesprochen positiv.
- Aber am allermeisten danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meinem Bruder, die mich mein ganzes Leben lang immer tatkräftig unterstützt haben. Sie haben auch in schwierigen Zeiten an mich geglaubt und nie aufgegeben, mir wieder Mut zu machen. Ohne sie wäre ich niemals an den Punkt gekommen, an dem ich jetzt stehe.

11 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt,

- dass diese Abhandlung, abgesehen von der Beratung durch Herrn Professor Dr. Paul Saftig, Herrn PD Dr. Michael Schwake und anteilig Frau Dr. Judith Blanz, nach Inhalt und Form die eigene Arbeit ist, die selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel durch mich verfasst wurde,
- dass diese Dissertation noch nicht an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde, jedoch anteilig und in Koautorenschaft mit den angegebenen Betreuern zur Veröffentlichung bei einem wissenschaftlichen Magazin (Traffic, Wiley online library) eingereicht worden ist,
- dass diese Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist

Kiel, den 13. März 2012

Christina Zachos