

Aus dem Institut für Biochemie,  
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Stefan Rose-John)  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

LIMP2-DEFIZIENZ UND DAS  
ACTION MYOCLONUS AND RENAL FAILURE (AMRF) SYNDROM



Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen  
Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel vorgelegt von

MIRIAM OELBE, geb. Wagner aus Sindelfingen  
Kiel, 2012

1. Berichterstatter: PD Dr. Michael Schwake

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Lucius

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2013

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 24.04.2013

gez. Prof. Dr. Johann Roider  
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Die Kompartimentierung der Zelle	1
1.2	Das Lysosom	1
1.3	Lysosomale Speichererkrankungen	3
1.4	Das Action Myoclonus and Renal Failure (AMRF) Syndrom	5
1.5	Das lysosomale integrale Membranprotein 2 (LIMP2)	7
1.6	Die vakuoläre H <sup>+</sup> -ATPase	9
1.7	Der (Pro-)Reninrezeptor und das Renin-Angiotensin-System	10
<b>2</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>16</b>
<b>3.1</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>16</b>
3.1.1	Polymerase-Kettenreaktion	16
3.1.2	Fusions-PCR	17
3.1.3	Kolonie-PCR	18
3.1.4	Agarosegelelektrophorese	19
3.1.5	Restriktionsverdau	19
3.1.6	Dephosphorylierung	20
3.1.7	Ligation	20
3.1.8	Elektroporation	20
3.1.9	Plasmidamplifikation und -aufreinigung	21
3.1.10	Konzentrationsbestimmung von DNA	21
3.1.11	DNA-Sequenzierung	21
3.1.12	Herstellung elektrokompenter Bakterien	22
<b>3.2</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>23</b>
3.2.1	Zellkulturbedingungen	23
3.2.2	Auftauen und Revitalisieren von Zellen	23
3.2.3	Zellen passagieren	23
3.2.4	Zellzahlbestimmung	24
3.2.5	Kryokonservierung von Zellen	24
3.2.6	Transfektion	25
3.2.6.1	Transiente Transfektion	25
3.2.6.2	Stabile Transfektion von Hek-Zellen	25
3.2.7	Retrovirale Transduktion von MEF-Zellen	26
3.2.8	Zellernte/-pelletierung	28
3.2.9	Herstellung von Zellysaten	29
3.2.10	Membranpräparation	29
3.2.11	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	30
3.2.12	SDS-Probenvorbereitung	30

3.2.13	Polyacrylamidgelelektrophorese	30
3.2.14	Fixierung von Zellen	31
<b>3.3</b>	<b>Immunologische Methoden</b>	<b>32</b>
3.3.1	<i>Western Blot</i>	32
3.3.1.1	<i>Semidry-Blot-Verfahren</i>	32
3.3.1.2	<i>Tank-Blot-Verfahren</i>	32
3.3.1.3	Immundetektion	33
3.3.1.4	<i>Strippen</i>	33
3.3.2	Ko-Immunpräzipitation	34
<b>3.4</b>	<b>Lichtmikroskopische Methoden</b>	<b>35</b>
3.4.1	Mikroskop	35
3.4.2	Direkte Immunfluoreszenzmikroskopie	35
3.4.3	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie	35
3.4.4	Immunhistologie	36
<b>3.5</b>	<b>Elektronenmikroskopische Methoden</b>	<b>38</b>
3.5.1	Fixierung der Zellen	38
3.5.2	Einbettung der Proben	38
3.5.3	Herstellung von <i>grids</i> (Formvar carbonummantelt)	39
3.5.4	Herstellung von Glasmessern	40
3.5.5	Trimmen des Zellblocks	40
3.5.6	Schneiden von Ultradünnschnitten	41
3.5.6	Immunogoldfärbung	41
3.5.7	Elektronenmikroskopie	42
<b>3.6</b>	<b>Hefesysteme</b>	<b>43</b>
3.6.1	<i>Yeast Two-Hybrid Split-Ubiquitin System</i>	43
3.6.2	Herstellung kompetenter Hefen	44
3.6.3	Transformation von Hefen	44
3.6.4	Herstellung von Hefelysaten	45
3.6.5	Verdünnungsreihe	45
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>46</b>
<b>4.1</b>	<b>Interaktion zwischen LIMP2 und dem (Pro-)Reninrezeptor (<i>in vitro</i>)</b>	<b>46</b>
<b>4.1.1</b>	<b><i>Yeast Two-Hybrid (Y2H)</i></b>	<b>46</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Interaktion des (Pro-)Reninrezeptors mit LIMP2 in Säugetierzellen</b>	<b>51</b>
4.1.2.1	Ko-Immunpräzipitation	51
4.1.2.2	Kolokalisation von LIMP2 mit dem (Pro-)Reninrezeptor	52
4.1.2.3	Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptors in der Zelle	54
4.1.2.4	Expressionsoptimierung des (Pro-)Reninrezeptors	57
<b>4.1.3</b>	<b>Elektronenmikroskopie</b>	<b>59</b>
4.1.3.1	Lokalisation von endogenem LIMP2 in MEF-Zellen	59
4.1.3.2	Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptors in MEF-Zellen	61
4.1.3.3	Kolokalisation von LIMP2 und (Pro-)Reninrezeptor in MEF-Zellen	63

## Inhaltsverzeichnis | III

4.1.3.4	Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptors in LIMP2-defizienten Zellen	64
4.1.3.5	Quantifizierung der Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptors im Vergleich von Wildtyp- und LIMP2-defizienten Zellen	65
<b>4.1.4</b>	<b>Charakterisierung einer putativen Interaktionsstelle</b>	<b>67</b>
4.1.4.1	Überprüfung der <i>Coiled-Coil</i> -Domäne als putative Bindungsstelle	67
4.1.4.2	Einfluss von LIMP2-Mutationen (AMRF Syndrom) auf die Interaktion	68
4.1.4.3	Untersuchung der Spaltfragmente des (Pro-)Reninrezeptors auf ihre Interaktionsfähigkeit mit LIMP2	70
<b>4.2</b>	<b>Interaktion von LIMP2 und (Pro-)Reninrezeptor (<i>in vivo</i>)</b>	<b>71</b>
4.2.1	Lokalisation von endogenem LIMP2 im Kleinhirn	71
4.2.2	Lokalisation von endogenem LIMP2 in der Niere	71
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>74</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>84</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>90</b>
<b>8.1</b>	<b>Material</b>	<b>90</b>
8.1.1	Geräte	90
8.1.2	Verbrauchsmaterialien	91
8.1.3	Chemikalien	91
8.1.4	Detergenzien	92
8.1.5	Enzyme, Nukleotiden und DNA-Standards	92
8.1.6	Kits zur Bearbeitung von DNA und Proteinen	92
8.1.7	Vektoren	92
8.1.8	Primer	93
8.1.9	Antikörper	94
8.1.9.1	Primärantikörper	94
8.1.9.2	Sekundärantikörper	95
8.1.10	Bakterien und Hefestämme	95
8.1.11	Zelllinien	95
8.1.12	Mausstämme	96
8.1.13	Antibiotika	96
8.1.14	Puffer und Stammlösungen	96
8.1.15	Zellkulturmedien und Lösungen zur Arbeit mit eukaryoten Zellen	98
8.1.16	EDV	99
<b>8.2</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>100</b>
<b>8.3</b>	<b>Tabellen</b>	<b>102</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>103</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>104</b>
<b>11</b>	<b>Veröffentlichungen und Kongresse</b>	<b>105</b>

### Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	<i>Angiotensin converting enzyme</i>
AMRF	Action Myoclonus and Renal Failure Syndrom
Ap-3	Adaptorprotein 3
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
β-GC	beta-Glucocerebrosidase
CD36	<i>Cluster of Differentiation 36</i>
COX-2	Cyclooxygenase 2
CuB	C-terminaler Hälfte eines Ubiquitins
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
ddNTPs	Didesoxynukleotide
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
EBC	<i>Emulated Buffer Computer</i>
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
GA	Glutaraldehyd
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
GS	<i>goat serum</i>
h	Stunde
HA	<i>Hemagglutinin</i>
HRP	<i>handle region peptide</i> oder <i>horseradish peroxidase</i>
IMEM	<i>Improved modified Eagle Medium</i>
Kb	Kilobase(n)
kDA	Kilodalton
KO	<i>knock-out</i> , z. Bsp. LIMP2-defiziente Mäuse
LAMP	<i>lysosome-associated membrane protein</i>
LIMP	<i>lysosomal integral membrane protein</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
LBPA	<i>lysobisphosphatidic acid</i>
LGP85	Lysosomales Sialoglycoprotein
LRP6	<i>Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 6</i>

## Abkürzungsverzeichnis | V

---

M6P	Mannose-6-Phosphat
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MBP	Myelin basic protein
MEFs	<i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute
mRNA	messenger ribonucleic acid
MVB	<i>multivesicular body</i>
MW	Mittelwert
NubG	N-terminale Hälfte eines Ubiquitins
OD	Optische Dichte
PAG	Protein-A-Gold
PAS	Periodic Acid Schiff
PB	Phosphatbuffer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PFA	Paraformaldehyd
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
P0	<i>Protein zero</i>
PM	Plasmamembran
PME	progressiv myoklonischen Epilepsie
PMP22	<i>peripheral myelin protein-22</i>
PLZF	Promyelozytischer Finger
PRR	(Pro-)Reninrezeptor
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SCARB2	<i>Scavenger Receptor Class B, member 2</i>
SD	Standardabweichung
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SV	<i>small vesicles</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tag	<i>Thermus aquaticus</i>
TBST	<i>Tris-Buffered Saline Tween-20</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
USP	Ubiquitin-spezifische Protease
Wnt	<i>Wingless Int-1</i>
XMRE	<i>X-linked mental retardation and epilepsy</i>
Y2H	<i>Yeast Two-Hybrid</i>
YPAD	<i>Yeast Extract - Peptone - Dextrose plus Adenine medium</i>

## 1 Einleitung

### 1.1 Die Kompartimentierung der Zelle

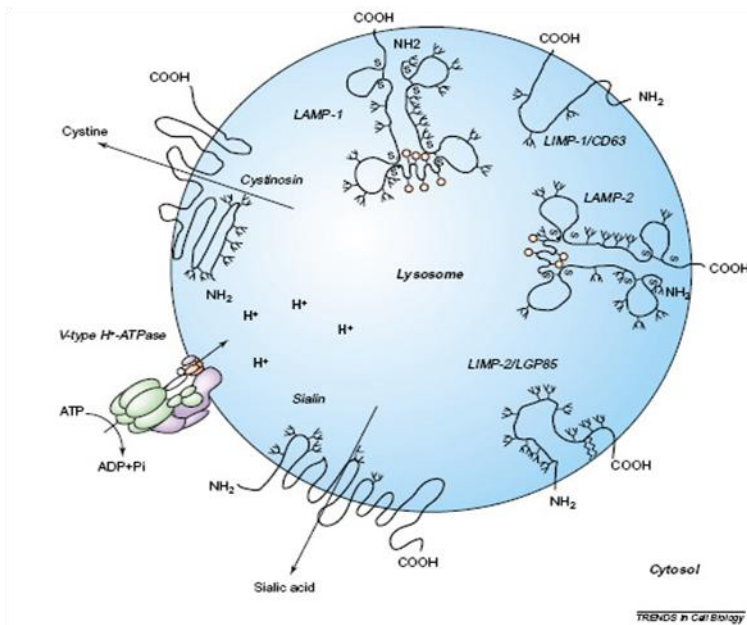
Die kleinste Einheit des Lebens ist die Zelle. Damit in ihr gleichzeitig verschiedene chemische Prozesse stattfinden können, ist die eukaryote Zelle in mehrere von Membranen umschlossene Kompartimente unterteilt.

Der Zellkern enthält die Erbinformation des gesamten Organismus, welche in Form von DNA (**d**eoxyribonucleic **a**cid) gespeichert wird. Wird nun die Erbinformation für die Synthese eines Proteins benötigt, werden im Rahmen der Transkription einzelne Gene abgelesen und in mRNA (**m**essenger ribonucleic **a**cid) übertragen und weiter im Zytosol durch Translation in das gewünschte Protein übersetzt. Sekretorische Proteine und solche, die ihre Bestimmung im Lysosom, ER (Endoplasmatisches Retikulum), Golgi-Apparat, Endosom oder an der Plasmamembran haben, werden bereits während der Proteinbiosynthese zum rauhen ER gebracht. Als Erkennung dient hier die N-terminale Signalsequenz (Walter et al. 1994). Im ER findet die Faltung der Proteine sowie ihre posttranslationale Prozessierung statt. Vom ER werden die Proteine in Vesikeln zum Golgi-Apparat transportiert. Der Golgi-Apparat ist das „Versandzentrum“ der Zelle. Hier werden die Eiweiße weiter modifiziert und an ihren Empfänger adressiert (Caro et al. 1964). Proteine, die ins Lysosom gelangen sollen, werden mit einem Mannose-6-Phosphat(M6P)-Rest markiert und über einen M6P-Rezeptor zu spät-endosomalen Kompartimenten gebracht. Dort zerfällt der Komplex aufgrund des niedrigen pH-Wertes wieder in seine Einzelbausteine und die M6P-Rezeptoren werden zurück zum Trans-Golgi-Netzwerk transportiert (Braulke et al. 2009). Jedoch gibt es auch M6P-unabhängige Transportwege zum Lysosom. Einer davon ist der LIMP2-abhängige Transport der  $\beta$ -Glukozerebrosidase ( $\beta$ -GC) zum Lysosom (Reczek et al. 2007).

### 1.2 Das Lysosom

Das Lysosom bildet den Verdauungsapparat der Zelle (De Duve 1963). Es setzt sich aus hydrolytischen Enzymen und lysosomalen Membranproteinen zusammen. Im Inneren des Lysosoms herrscht ein saures Milieu. Zuständig für die Ansäuerung des Lysosoms ist die vakuoläre  $H^+$ -ATPase, die unter ATP-Verbrauch Protonen entgegen ihres chemischen Gradienten ins Lumen pumpt (Forgac 1999).





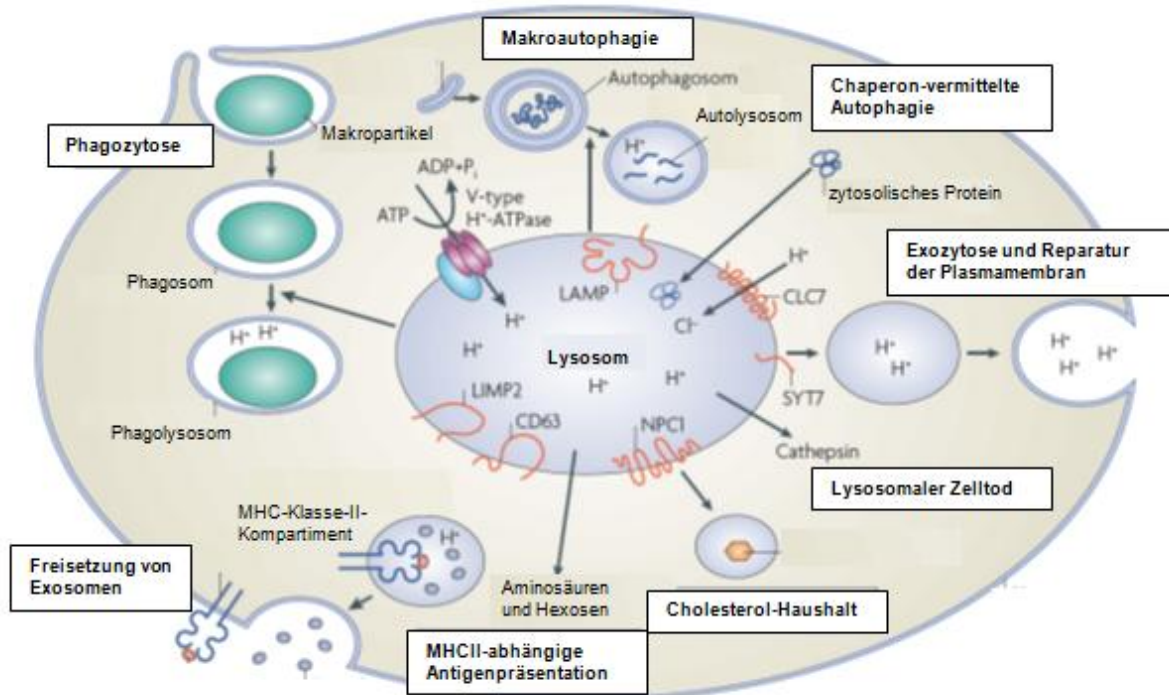
**Abb. 1.1 Schematische Darstellung lysosomaler Membranproteine**

In der lysosomalen Membran befinden sich viele verschiedene Membranproteine. Die V-ATPase säuert das Lumen des Lysosoms an. Cystinosin und Sialin sind für den Transport von Stoffen aus dem Lysosom zuständig. Des Weiteren sind die häufigsten lysosomalen Membranproteine LAMP1, LAMP2, LIMP1 und LIMP2 dargestellt. (Abb. aus Eskelinen, Tanaka et al. 2003)

Die Hydrolasen sind für den Abbau von zellfremdem und zelleigenem Material in wiederverwertbare Einzelteile zuständig. Zusätzlich kommen ihnen Funktionen bei der Proteinreifung und der Antigenpräsentation zu. Die lysosomalen Membranproteine sind stark glykosyliert und schützen so die umgebende Lipidmembran vor dem sauren Milieu. Ihre Aufgaben liegen in der Ansäuerung des Organells, dem

Proteintransport über die Membran und der Vermittlung der Membranfusion mit anderen Organellen. Die vier häufigsten lysosomalen Membranproteine sind LAMP1, LAMP2 (*lysosome-associated membrane protein*), LIMP1 und LIMP2 (*lysosomal integral membrane protein*) (Eskelinen et al. 2003).

Das Lysosom ist ein sehr vielfältiges Organell und nimmt ganz unterschiedliche Aufgaben wahr. So ist es grundsätzlich verantwortlich für den Verdau von extrazellulärem Material, das durch Endozytose aufgenommen wurde (Steinman et al. 1983; Hare 1990; Funato et al. 1997) oder intrazellulärem Material, das durch Chaperon-vermittelte Autophagozytose oder Makroautophagozytose ins Lysosom gelangt (Cuervo et al. 1998). Die beim Abbau entstehenden Einzelbausteine - das heißt Aminosäuren, Zucker und Nukleotide - können über Transporter aus dem Lysosom gebracht und im Zytosol wiederverwertet oder in den extrazellulären Raum ausgeschüttet werden (Forster et al. 1988). Des Weiteren übernimmt das Lysosom aber auch eine wichtig Rolle in der Ausführung des programmierten Zelltods sowie bei der Beladung der MHC-II-Moleküle zur Antigenpräsentation (Cresswell 1994).



**Abb. 1.2 Die vielfältigen Funktionen des Lysosoms**

Das Lysosom ist beteiligt am Verdau von intrazellulärem Material, das durch Makroautophagie oder Chaperon-vermittelte Autophagie ins Lysosom gelangt. Des Weiteren ist es aber auch am Verdau extrazellulären Materials beteiligt, das durch Phagozytose aufgenommen wurde. Es spielt eine Rolle bei der Freisetzung von Exosomen, sowie der Exozytose von Stoffen. Gesonderte Aufgaben übernimmt das Lysosom im Rahmen des programmierten Zelltods und des Cholesterol-Haushalts (modifiziert nach Saftig und Klumperman 2009).

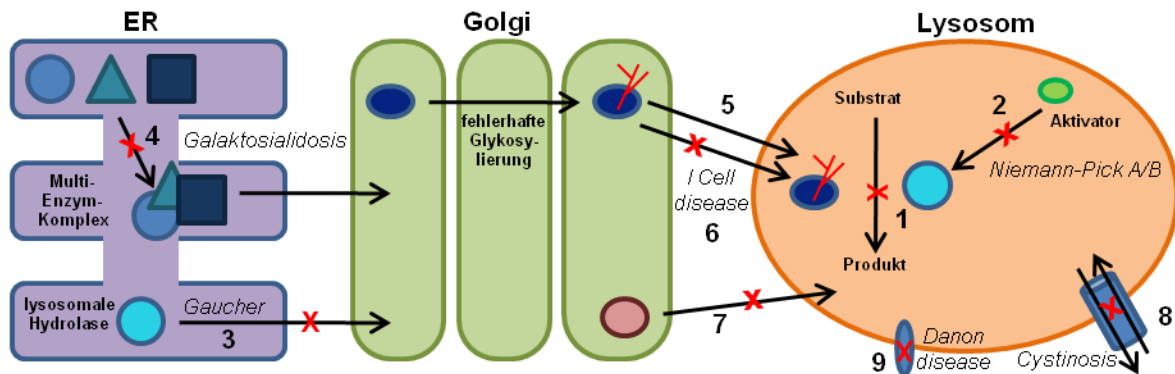
Die physiologische Bedeutung des Lysosoms wird durch eine Vielzahl an bekannten lysosomalen Speichererkrankungen unterstrichen. Häufig kommt es durch den Defekt eines hydrolytischen Enzyms zu einer Akkumulation seines Substrats im Lysosom (Ballabio et al. 2009).

### 1.3 Lysosomale Speichererkrankungen

Zurzeit sind ungefähr 50 lysosomale Speicherkrankungen bekannt. Meist liegt die Ursache in einem fehlenden oder nicht funktionsfähigen, löslichen lysosomalen Enzym, was zu einer Ansammlung des betreffenden Substrats in den Lysosomen der Patienten führt. Diese Akkumulation beeinträchtigt verschiedenste Organe und führt zu schwerwiegenden Symptomen mit nachfolgendem verfrühten Tod. Die lysosomalen Speichererkrankungen werden nach den Substraten klassifiziert, die durch die Defizienz akkumulieren. Häufig lagert sich jedoch mehr als eine Komponente ab, was durch die Substratvielfalt vieler Enzyme sowie sekundäre Effekte erklärt wird (Ballabio et al. 2009).

Mögliche Ursachen einer lysosomalen Speicherkrankung können eine fehlende Umsetzung der Substrate oder auch ein gestörter Transport der benötigten Hydrolasen zum Lysosom sein.

Zum Beispiel kann das Enzym durch Mutationen nicht mehr korrekt gefaltet werden und verbleibt im Endoplasmatischen Retikulum. Des Weiteren kann es zu einer fehlerhaften Phosphorylierung im Golgi-Apparat kommen, so dass der M6P-Rezeptor das Enzym nicht mehr erkennen kann und kein Weitertransport zum Lysosom erfolgt. Diese Erkrankung wird durch ihre *inclusion bodies* (Einschlusskörper) auch als *I-cell-disease* beschrieben (Futerman et al. 2004).



**Abb. 1.3 Die zelluläre Grundlage ausgewählter lysosomaler Speichererkrankungen**

Häufig kommt es bei lysosomalen Speichererkrankungen zu einer verminderten Enzymaktivität der lysosomalen Hydrolase (1). In anderen Fällen ist ein Protein defekt, das die Aktivität des Enzyms moduliert (2). Des Weiteren kann es aufgrund von Mutationen im Protein zu einer fehlerhaften Faltung mit Akkumulation im ER kommen (3). Auch kann der Transport der lysosomalen Enzyme aus dem ER aufgrund eines fehlenden Multi-Enzymkomplexes eingeschränkt sein (4). Im Golgi-Apparat kann eine fehlende Glykosylierung den Transport behindern (5,6). Auch lysosomale Membranproteine können Ursache diverser lysosomaler Speichererkrankungen sein (8,9) (Abb. modifiziert nach Futerman und van Meer 2004).

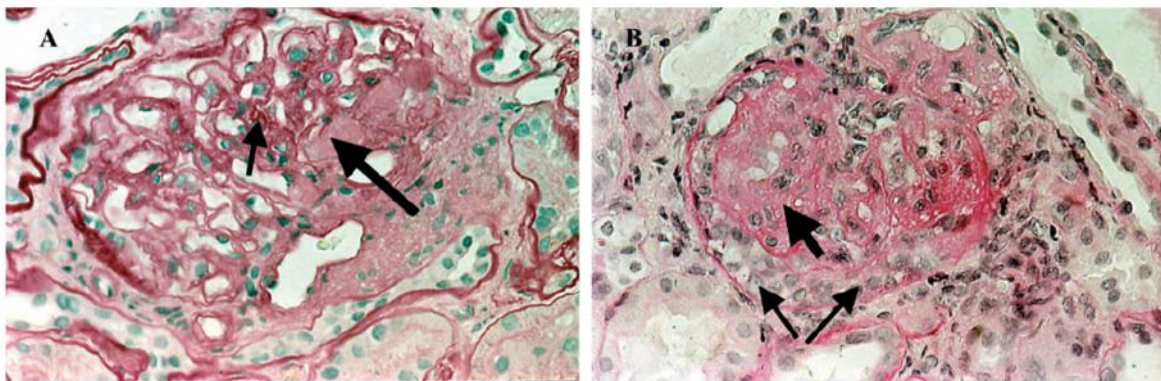
Die häufigste vererbte lysosomale Speichererkrankung ist der Morbus Gaucher mit einer Häufigkeit von 1:50.000-1:200.000. Charakteristisch ist eine Akkumulation des Sphingolipids Glukosylzeramid aufgrund von Mutationen im Enzym  $\beta$ -Glukozerebrosidase. Das Kennzeichen dieser Erkrankung sind die sogenannten "Gaucher-Zellen". Dies sind Makrophagen mit enormer Ansammlung an Glukosylzeramid. Es werden drei Formen des Morbus Gaucher unterschieden, die ganz unterschiedliche Ausprägungen der Erkrankung widerspiegeln. Hierbei korreliert der Schweregrade der Krankheit umgekehrt mit der noch vorhandenen Rest-Enzymaktivität (Meivar-Levy et al. 1994). Der mildere Typ I ist die häufigste Form des Morbus Gaucher. Im klinischen Befund zeigen sich eine Hepato- und Splenomegalie, Anämie und Thrombozytopenie. Zusätzlich sind Beeinträchtigungen der Knochen und der Lunge mit pulmonalem Bluthochdruck beschrieben. Bei dem sehr seltenen akut-neuronopathisch-infantilen Typ II ist zusätzlich das Nervensystem betroffen, was zu einer stark verkürzten Lebenserwartung auf 2-3 Jahren führt. Der Typ III unterscheidet sich von Typ II durch ein verspätetes Einsetzen der neurologischen Symptome, so dass die Patienten das Erwachsenenalter erreichen (Jmoudiak et al. 2005).

Es wurden jedoch nicht nur lysosomale Speichererkrankungen für hydrolytische Enzyme beschrieben, auch Defekte in lysosomalen Membranproteinen können Ursache gravierender Krankheitsbilder sein. So führt ein Defekt von LAMP2 zur Danon-Erkrankung und Mutationen in LIMP2 zum Action Myoclonus and Renal Failure (AMRF) Syndrom.

## 1.4 Das Action Myoclonus and Renal Failure (AMRF) Syndrom

Erstmals wurde das Krankheitsbild des Action Myoclonus and Renal Failure (AMRF) Syndroms 1986 bei Patienten im französischen Teil Kanadas beschrieben (Andermann et al. 1986). Mittlerweile sind auch in anderen Ländern Fälle bekannt, unter anderem in Australien, Kanada und Deutschland. Das klinische Bild des autosomal-rezessiv vererbten AMRF Syndroms zeigt sich in neurologischen und renalen Symptomen.

Die Erstmanifestation der neurologischen Symptome tritt meist zwischen dem 15. und 25. Lebensjahr auf. Die Patienten leiden zu Beginn an einem Tremor, im Verlauf der Erkrankung kommt es danach rasch zu einem progressiven Myoklonus, generalisierten Krampfanfällen und später zu einer Ataxie. In postmortalen Gehirnbiopsien konnte eine extraneuronale Pigmentansammlung festgestellt werden. Bemerkenswert ist jedoch, dass die Patienten keinerlei kognitive Defizite aufweisen (Badhwar et al. 2004).

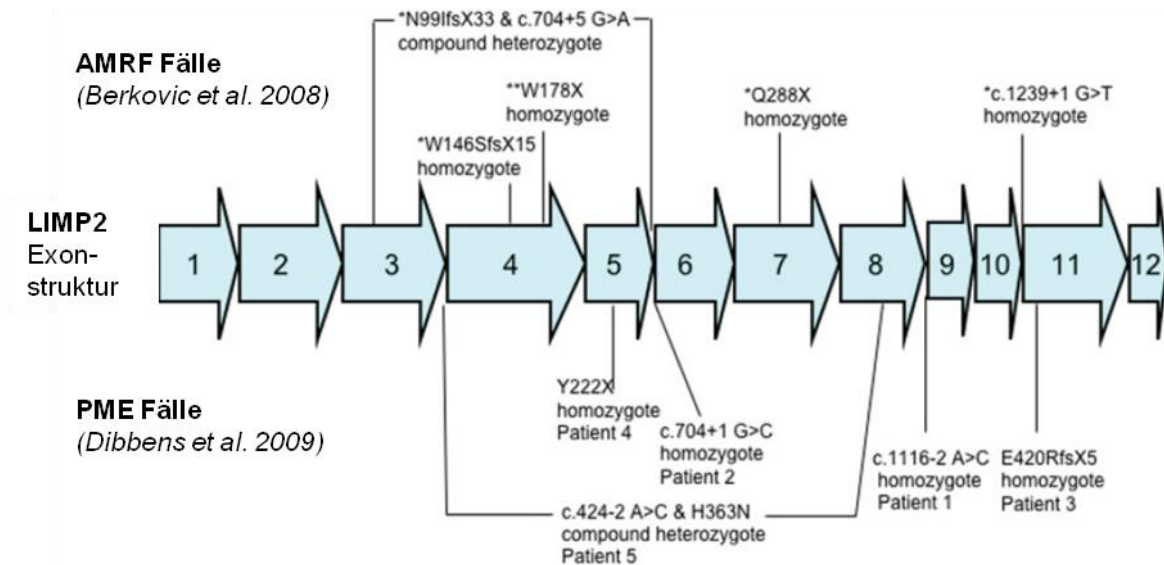


**Abb. 1.4 Die Glomerulosklerose bei einem Patienten mit AMRF Syndrom**

Histologisch sichtbare Veränderungen in den Glomeruli der Niere eines deutschen AMRF Patienten. Gefärbt wurde mit PAS (Periodic Acid Schiff). A: Erkennbar sind die Kennzeichen einer Glomerulosklerose (dicker Pfeil: hyalines Material, dünner Pfeil: sklerotischen Bereiche). B: Es sind kollabierte Kapillaren (dicker Pfeil) und geschwollene Epithelzellen (dünne Pfeile) sichtbar. (Abb. aus Badhwar, Berkovic et al. 2004)

Die Nierenschädigung zeigt sich zu Beginn mit einer Proteinurie, mündet aber zügig in einer schweren Form der fokalen Glomerulosklerose, der kollabierenden Glomerulopathie. Die Therapie der renalen Beeinträchtigung erfolgt durch Dialyse oder Nierentransplantation. Zur Behandlung der Epilepsie werden Antikonvulsiva eingesetzt. Die Patienten versterben durchschnittlich 12 Jahren nach Beginn der ersten Symptome.

Im Jahr 2008 wurden Mutationen im lysosomalen Membranprotein LIMP2 identifiziert, auch SCARB2 genannt, welche den Ursprung dieser Erkrankung darstellen und zu einem Verlust des Proteins führen. Die  $\beta$ -Glukozerebrosidase wird durch LIMP2 M6P-unabhängig zum Lysosom transportiert (Reczek et al. 2007). Durch Mutationen in LIMP2 verbleibt das Enzym im Endoplasmatischen Retikulum (Balreira et al. 2008). Zusätzlich konnte eine Veränderungen der enzymatischen Aktivität der  $\beta$ -Glukozerebrosidase in Fibroblasten (Balreira et al. 2008) und im Plasma der Patienten festgestellt werden (Dardis et al. 2009).



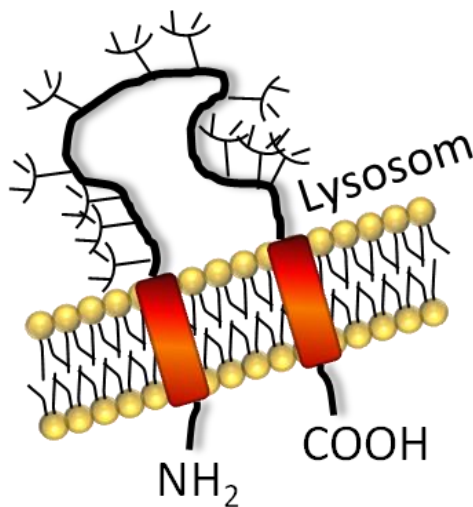
**Abb. 1.5 Schematische Darstellung der Mutationen in LIMP2, die zum AMRF Syndrom führen**

Das LIMP2-Gen setzt sich aus 12 Exons zusammen. Sowohl die Mutationen, die im Rahmen des AMRF Syndroms auftreten, als auch diejenigen bei Patienten mit PME (progressiver myoklonische Epilepsie) ohne Nierenbeteiligung, befinden sich in ähnlichen Abschnitten des Gens (Abb. modifiziert nach Dibbens, Michelucci et al. 2009).

Seit 2009 wurden auch Patienten beschrieben, die Mutationen im LIMP2-Gen aufweisen und keinerlei renale Beeinträchtigung haben. Sie wurden in einer Studie zur Identifikation ungeklärter Ursachen einer PME (progressive myoklonische Epilepsie) entdeckt. Die Mutationen dieser Patienten finden sich jedoch an ähnlichen Positionen im LIMP2-Gen wie die bereits im Rahmen des AMRF Syndroms beschriebenen (siehe Abb.1.5), so dass daraus keine Erklärung für die fehlende renale Beteiligung besteht (Dibbens et al. 2009).

Aufgrund der beobachteten Auffälligkeiten bei Patienten mit AMRF Syndrom wurden LIMP2-*knock-out*-Mäuse (LIMP2-KO-Mäuse) auf ähnliche Symptome untersucht und es konnte dort ebenfalls eine glomeruläre Veränderung sowie intrazelluläre Einschlusskörper im zerebralen und zerebellären Cortex gefunden werden (Berkovic et al. 2008).

### 1.5 Das lysosomale integrale Membranprotein 2 (LIMP2)



**Abb. 1.6 Schematische Darstellung von LIMP2**  
LIMP2 ist ein Typ III Transmembranprotein, C- und N-Terminus des Proteins finden sich im Zytosol. Des Weiteren besitzt LIMP2 viele N-Glykosylierungsstellen (Abb. modifiziert nach Eskelinen, Tanaka et al. 2003).

Das lysosomale Membranprotein LIMP2 ist ein Typ III Transmembranprotein, das heißt N- und C-Terminus befinden sich im Zytosol und das Protein durchspannt zweimal die Membran. Weitere Namen des Proteins sind LGP85<sup>1</sup> und SCARB2<sup>2</sup>. LIMP2 setzt sich aus 478 Aminosäuren zusammen und enthält viele putative N-Glykosylierungsstellen, so dass sich eine Größe von 72-85 kDa ergibt (Eskelinen et al. 2003). Im carboxyterminalen Bereich befindet sich ein Dileucin- Motiv, das den Transport von LIMP2 durch das Adaptorprotein 3 (Ap-3) zum Lysosom gewährleistet (Honing et

al. 1998). Das Protein gehört zur Familie der CD36 Scavenger Rezeptor Proteine. Diese Familie ist evolutionär konserviert und beinhaltet Zelladhäsionsmoleküle, Lipidrezeptoren und lysosomale Membranproteine (Calvo et al. 1995).

LIMP2 werden viele verschiedene Funktionen zugeordnet. Eine Überexpression in COS<sup>3</sup>-Zellen führt zur Vergrößerung von frühen und späten Endosomen sowie Lysosomen und zu einem verminderten endozytotischen Membranfluss aus den vergrößerten Vakuolen. Deshalb wird LIMP2 eine Rolle bei der Organisation der endo-lysosomalen Kompartimente und der Verschmelzung sowie der Abschnürung von Vesikeln beigemessen (Kuronita et al. 2002).

Darüber hinaus konnte das lysosomale Membranprotein LIMP2 als M6P-unabhängiges Transportprotein identifiziert werden. Es transportiert die lysosomale Hydrolase  $\beta$ -Glukozerebrosidase vom ER zum Lysosom. Die Interaktion der beiden Proteine findet prälysosomal statt, wobei der Transportkomplex bei neutralem pH-Wert deutlich stabiler ist und es im sauren Milieu zu einer Dissoziation kommt. Liegt eine LIMP2-Defizienz vor, wird die  $\beta$ -Glukozerebrosidase fehlsortiert und gelangt mit den sekretorischen Proteinen aus der Zelle. Bei einer Überexpression der  $\beta$ -Glukozerebrosidase in LIMP2-defizienten MEFs (Mouse Embryonic Fibroblasts) kommt es zur Akkumulation von  $\beta$ -Glukozerebrosidase im

<sup>1</sup> LGP85: Lysosomales Sialoglycoprotein mit einer Größe von 85 kDa

<sup>2</sup> SCARB2: SCAVENGER RECEPTOR CLASS B, MEMBER 2

<sup>3</sup> COS-Zellen: Fibroblasten, die aus Affen gewonnen wurden und mit dem viralen Vektor SV40 transfiziert wurden (Gluzman 1981).

ER (Reczek et al. 2007). Dabei scheint die luminaire *Coiled-Coil* Domäne<sup>4</sup> von LIMP2 entscheidend für die Interaktion der beiden Proteine zu sein (Blanz et al. 2010).

Zur weiteren Charakterisierung des lysosomalen Membranproteins wurden LIMP2-defiziente Mäuse (LIMP2-KO-Mäuse) generiert. Die Mäuse entwickelten eine Symptomtrias bestehend aus Hydronephrose, Taubheit und peripherer Neuropathie. Die Hydronephrose wird mit einer veränderten Lokalisation von Uroplakinen innerhalb der Deckzellen des Urothels erklärt, wodurch das Epithel nicht mehr gegenüber dem sauren Milieu des Harns geschützt ist. Es kommt zur Hyperproliferation des Gewebes, was eine Stenose des Ureters und einen Rückstau des Harns in die Nieren verursacht. Die Taubheit wird mit einer Fehlverteilung von KCNQ1<sup>5</sup> und dessen  $\beta$ -Untereinheit KCNE1 sowie des Proteins Megalin in der Stria vascularis des Innenohrs begründet. Dadurch kommt es zu einer Atrophie der Stria vascularis und das endochochleare Potential bricht zusammen. Eine mögliche Erklärung könnte die fehlende Rezirkulation des Rezeptors an die Plasmamembran nach endozytotischer Aufnahme sein, da die lysosomalen Kompartimente in Aktivität und Größe erhöht sind. Des Weiteren ist eine verstärkte Degradierung der zellulären Proteine durch den erhöhten Anteil der lysosomalen Enzyme denkbar. Zusätzlich lässt sich eine Reduktion der Neurone im Spiralganglion des Innenohrs nachweisen (Knipper et al. 2006). Auch die Expressionen von PMP22, P0 und MBP<sup>6</sup> sind erniedrigt, wodurch die Membranlamellen, welche für die Myelinisierung verantwortlich sind, den Kontakt zueinander verlieren. Dies lässt auf eine bedeutende Rolle von LIMP2 in der korrekten Oberflächenexpression von Ionenkanälen und Rezeptorproteinen schließen (Gamp et al. 2003).

Eine weitere Funktion wird LIMP2 am Herzen zugeschrieben. Dort findet sich LIMP2 in den Glanzstreifen (Discus intercalaris) und interagiert mit Komponenten der Adhärenskontakte ( $\beta$ -Catenin und N-Cadherin). LIMP2 wird verstärkt im Rahmen einer Herzhypertrophie sowie einer Herzinsuffizienz exprimiert. Bei Überexpression von LIMP2 wurde die Affinität der Adhäsionsmoleküle verbessert, so dass erhöhtes LIMP2 einen gewissen protektiven Effekt auf das schon geschädigte Herz hat. Das Fehlen von LIMP2 in LIMP2-defizienten Mäusen führt zu keinerlei hypertropher Antwort auf erhöhten Blutdruck, der durch AngiotensinII induziert wurde. Stattdessen entwickeln die Mäuse primär eine Herzinsuffizienz und sekundär eine starke Fibrose. In den LIMP2-defizienten Mäusen verteilen sich die N-Cadherine diffus

---

<sup>4</sup> *Coiled-Coil* Domäne: Strukturmotiv bei Proteinen, 2 bis 5  $\alpha$ -Helices winden sich umeinander und bilden einen *Supercoil* (Mason et al. 2004), beteiligt an Protein-Protein Interaktionen (Lupas et al. 1991).

<sup>5</sup> KCNQ1: ist ein spannungsabhängiger Kalium-Ionenkanal (Peroz et al. 2008)

<sup>6</sup> Myelin basic protein (MBP) ist für die Integrität der Myelinlamellen zuständig (Harauz et al. 2009). Protein zero (P0) und peripheral myelin protein-22 (PMP-22) sind Komponenten des kompakten Myelins des Peripheren Nervensystems (PNS) (Quarles 2002).

und die Affinität zu  $\beta$ -Catenin nimmt ab, was auf einen Defekt im Adhärenskontakt schließen lässt. Aufgrund dieser Ergebnisse wird LIMP2 eine Bedeutung bei der Entwicklung von adaptiver Herzhypertrophie beigemessen (Schroen et al. 2007).

In den letzten Jahren wurde LIMP2 auch eine immunologische Funktion bei der Infektion von Zellen eingeräumt. Es konnte gezeigt werden, dass LIMP2 direkt den Enterovirus 71 (EV71) bindet und dadurch eine Infektion der betroffenen Zelle mit der Hand-Fuß-Mund-Krankheit erleichtert. Die Infektion konnte durch eine Inkubation der Zellen mit Antikörpern gegen LIMP2 verhindert werden (Yamayoshi et al. 2009). In einem weiteren Schritt konnte die Region um die Aminosäuren 142 bis 204 des humanen LIMP2 als Bindungsstelle des Enterovirus 71 identifiziert werden (Yamayoshi et al. 2011). Zusätzlich zeigte sich, dass LIMP2 zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems bei einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* beiträgt, indem es den Transport des Bakteriums zum Phagosom beeinflusst (Carrasco-Marin et al. 2011).

Doch es gibt auch andere lysosomale Membranproteine, die bedeutende Funktionen in der Zelle übernehmen. So ist zum Beispiel die vakuoläre  $H^+$ -ATPase (V-ATPase) für die Aufrechterhaltung des sauren Milieus im Lysosom verantwortlich.

### 1.6 Die vakuoläre $H^+$ -ATPase

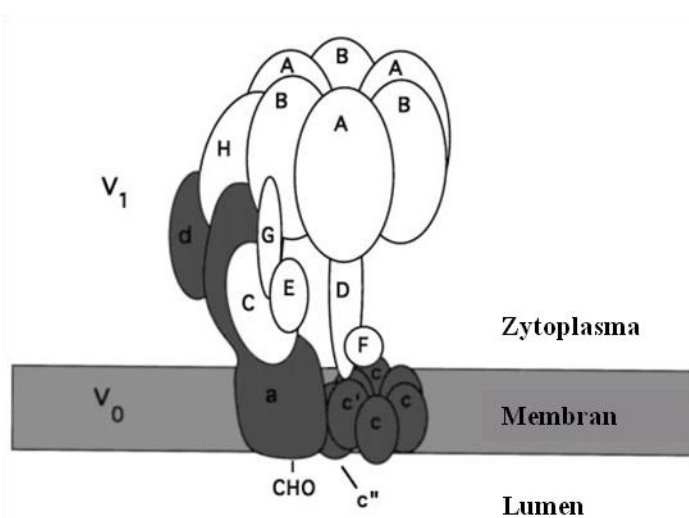
Die vakuoläre  $H^+$ -ATPase (V-ATPase) gehört zu den ATP-abhängigen Protonenpumpen, welche für die Ansäuerung intrazellulärer Kompartimente zuständig sind (Forgac 1998). Die V-ATPase baut einen Protonengradienten auf, der für den intrazellulären Transport von neu synthetisierten lysosomalen Hydrolasen genutzt wird. Das saure Milieu führt dazu, dass der M6P-Rezeptor und die Hydrolasen dissoziieren und die Enzyme ihre volle Aktivität entfalten können (Kornfeld et al. 1989). Des Weiteren wird dieser Protonengradient genutzt, um sekundär einen gekoppelten Transport von Neurotransmittern und Hormonen in sekretorische Vesikel zu ermöglichen (Moriyama et al. 1992). Im sauren Milieu kommt es bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose zu einem Zerfall des Komplexes in Rezeptor und Ligand. Der Rezeptor kann dann zur Plasmamembran rezirkulieren, während der Ligand im Lysosom degradiert wird (Stevens et al. 1997). Zusätzlich spielt die V-ATPase eine Rolle bei der Formierung von endosomalen Transportvesikeln (Clague et al. 1994) sowie beim Eintritt von Bakterien und Viren in die Zelle (White 1992).

Die V-ATPase ist mit der F-ATPase evolutionär verwandt, jedoch unterscheiden sich ihr Lokalisation und Funktion deutlich. Während die V-ATPase ein weites Wirkungsspektrum und eine vielfältige Verteilung hat, befindet sich die F-ATPase speziell in der inneren



mitochondrialen Membran und ist für die ATP-Bildung durch Protonentranslokation zuständig (Forgac 1999).

In spezialisierten Zellen übernimmt die V-ATPase gesonderte Rollen. In Osteoklasten und Tumorzellen wird sie an der Plasmamembran exprimiert um eine saure Umgebung zu erzeugen, die zur Knochenresorption oder zur Tumormetastasis benutzt werden kann (Chatterjee et al. 1992; Martinez-Zaguilan et al. 1993). Zusätzlich befindet sich die V-ATPase an der apikalen Plasmamembran in Schaltzellen der Sammelrohre der Niere und trägt zur Ansäuerung des Urins bei (Blake-Palmer et al. 2009).



**Abb. 1.7 Aufbau der vakuolären  $H^+$ -ATPase**

Die V-ATPase setzt sich aus zwei Teilen zusammen: der  $V_0$ -Domäne (dunkelgrau), welche für den Protonentransport verantwortlich ist und der  $V_1$ -Domäne (weiß), die durch ATP-Hydrolyse Energie bereitstellt (Abb. modifiziert nach Forgac 1999).

Die V-ATPase ist in zwei Domänen unterteilt: die  $V_0$  und die  $V_1$ -Domäne. Die  $V_0$ -Domäne besteht aus sechs Untereinheiten und bildet den integralen Teil, welcher für die Protonentranslokation zuständig ist. Die  $V_1$ -Domäne baut sich aus acht Untereinheiten auf und übernimmt die ATP-Hydrolyse. Es gibt zell- und gewebespezifische Isoformen der Untereinheiten. Die Untereinheit B1 wird zum Beispiel nur in der Niere und im Innenohr exprimiert, während B2 ubiquitär vorkommt.

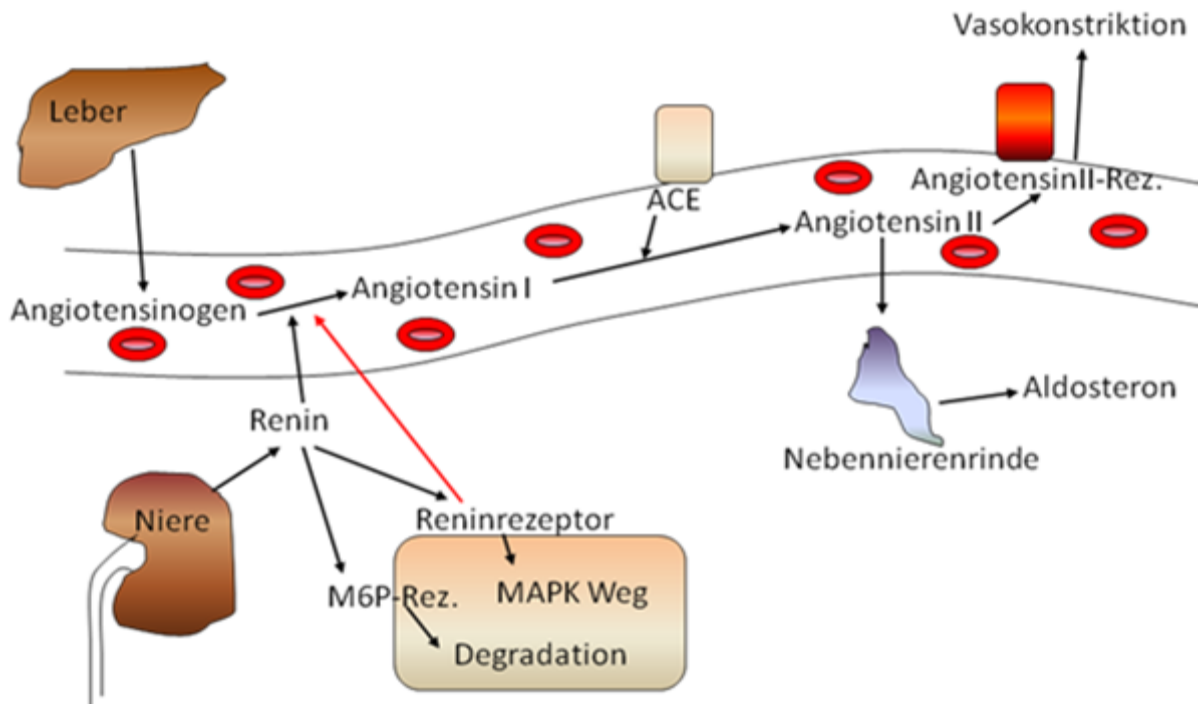
Die V-ATPase funktioniert nach einem Rotor-Stator-Prinzip. Der zentrale Strunk rotiert im Verhältnis zum peripheren Teil (Marshansky et al. 2008).

Als eine akzessorische Untereinheit der  $V_0$ -Domäne konnte ein Teil des (Pro-)Reninrezeptors identifiziert werden (Ludwig et al. 1998). Dieser Rezeptor zeigt jedoch noch ganz andere Aufgabenbereiche, wie zum Beispiel eine Rolle im Renin-Angiotensin-System, das Blutdruck und -volumen reguliert.

## 1.7 Der (Pro-)Reninrezeptor und das Renin-Angiotensin-System

Die längerfristige Regulation des Blutvolumens wird hormonell über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) gesteuert. Bei Volumenmangel kommt es zu einer Aktivierung des Nierensympathikus, welcher ein starker Stimulus für die Reninfreisetzung aus dem juxtaglomerulären Apparat der Niere ist. Renin spaltet Angiotensinogen im Plasma zu

Angiotensin I. An den Endothelzellen wird Angiotensin I nun durch das ACE (*angiotensin converting enzyme*) zu Angiotensin II verändert. Dieses Hormon wirkt stark vasokonstriktorisch und fördert die Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde. Das Steroidhormon Aldosteron wiederum ist für die Natrium-Rückresorption in den Hauptzellen des Sammelrohrs verantwortlich (Hilgers 2009) (Re 1984). Erst vor einigen Jahren wurde ein Rezeptor für Prorenin und Renin identifiziert (Nguyen et al. 2002).



**Abb. 1.8 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)**

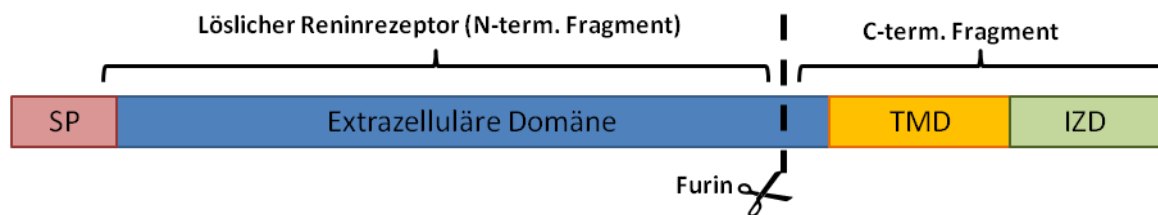
Das RAAS reguliert als Hormonsystem den Blutdruck und das Blutvolumen. Aus der Leber wird Angiotensinogen ins Blut freigesetzt. Dieses kann durch Renin, welches im juxtaglomerulären Apparat der Niere bei geringem Blutfluss sekretiert wird, in Angiotensin I umgesetzt werden. Durch einen weiteren Schritt wird daraus Angiotensin II. Diese Reaktion wird unter anderem durch das *angiotensin converting enzyme* (ACE) katalysiert. Angiotensin II (AT) kann über AT-Rezeptoren eine Vasokonstriktion hervorrufen und in der Nebennierenrinde eine Freisetzung von Aldosteron stimulieren, welches für die Natrium-Retention in der Niere verantwortlich ist und damit ebenfalls Blutdruck und -volumen beeinflusst.

Der (Pro-)Reninrezeptor kann die Aktivität von Renin erhöhen, sowie Prorenin nicht-enzymatisch aktivieren. Zusätzlich wird bei einer Bindung von Renin / Prorenin an den Rezeptor eine intrazelluläre Kaskade (MAP-Kinase-Signalweg) in Gang gesetzt, was zur Stimulation von profibrotischen Faktoren führt.

Der (Pro-)Reninrezeptor (PRR) ist ein 350 Aminosäuren großes Typ I Transmembranprotein. Das Gen liegt auf dem X-Chromosom und besteht aus neun Exons. Weitere Namen, die in der Literatur genannt werden, sind ATP6AP2 und CAPER. Der PRR wird in Gehirn, Herz und Plazenta stark sowie in Leber, Niere und Pankreas durchschnittlich exprimiert. Er bindet Prorenin und Renin, zeigt aber eine erhöhte Affinität zu Prorenin (Nabi et al. 2006). Nach der Bindung von Renin an den PRR wird die katalytische Wirkung des Hormons verstärkt. Im Fall von Prorenin findet eine nicht-enzymatische Konformationsänderung statt (Nguyen et al.

2002). Dieser nicht-proteolytischen Aktivierung kommt eine bedeutende Rolle in der Entwicklung der kardialen Fibrose im Rahmen eines Bluthochdrucks zu (Ichihara et al. 2006). Des Weiteren kommt es nach der Bindung von (Pro-)Renin an den Rezeptor zu einer intrazellulären Aktivierung des MAP-Kinase-Wegs, was zu einer Stimulation von profibrotischen Faktoren, einer Proliferation von Gewebe und einer Akkumulation von extrazellulärer Matrix führt (He et al. 2009).

Der (Pro-)Reninrezeptor kann durch Furin im Trans-Golgi-Netzwerk in ein N- und ein C-terminales Fragment gespalten werden. Das N-terminale lösliche Fragment wird ins Plasma ausgeschüttet und ist weiterhin fähig Renin zu binden (Cousin et al. 2009; Nguyen et al. 2010)



**Abb. 1.9 Schematische Darstellung des Reninrezeptors und seiner Schnittstelle**

Der (Pro-)Reninrezeptor wird in seiner extrazellulären Domäne durch die Protease Furin in ein lösliches N-terminales Fragment und ein membranständiges C-terminales Fragment gespalten (SP= Signalpeptid, TMD= Transmembrandomäne, IZD= intrazelluläre Domäne) (Abb. modifiziert nach Nguyen und Muller 2010)

Ursprünglich war nur ein Teil des PRR als akzessorische Untereinheit der V-ATPase bekannt (Ludwig et al. 1998). Später konnte dann die Interaktion des PRR mit der B1/2-Untereinheit der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase in Schaltzellen des Typs A im Sammelrohr der Niere gezeigt werden. Eine Hemmung der V-ATPase mit Bafilomycin<sup>7</sup> führte zu einer verminderten ERK1/2 Phosphorylierung (Advani et al. 2009).

Bei Patienten die an XMRE (*X-linked mental retardation and epilepsy*) leiden, konnte eine Mutation im PRR entdeckt werden. Symptome dieser Erkrankung sind Epilepsie, mentale Retardierung, Ataxie, Sprachverzögerung und Hyperaktivität. Die gefundene Mutation führt zu einer veränderten Splice Stelle, so dass das Exon 4, welches evolutionär konserviert ist, nur noch partiell im Protein enthalten ist. Durch diese Veränderung kommt es zu einer leichten Abschwächung des MAPK-Wegs. Der MAPK-Weg spielt eine Rolle beim Abrufen von Gedächtnisinformationen sowie bei der Langzeitpotenzierung. Dieser Phänotyp spricht für eine Bedeutung des (Pro-)Reninrezeptors in kognitiven Funktionen und in der Entwicklung des Gehirns (Ramser et al. 2005).

Ratten, in denen der humane (Pro-)Reninrezeptor überexprimiert wurde, entwickelten durch

<sup>7</sup> Bafilomycin ist ein selektiver Inhibitor der V-ATPase (Marshansky et al. 2008)

die Aktivierung des MAP-Kinase-Wegs eine Glomerulosklerose und eine Proteinurie. Die Tiere hatten jedoch keinen Bluthochdruck und der Plasmaspiegel von AngiotensinII verhielt sich normal. Der (Pro-)Reninrezeptor-Blocker HRP<sup>8</sup> konnte die Erkrankung verhindern, aber eine Behandlung der Tiere mit ACE-Hemmern hatte keinen Erfolg. Das systemische RAAS konnte in den Ratten insoweit ausgeschaltet werden, als dass das Prorenin der Ratten zwar an den humanen (Pro-)Reninrezeptor binden und den MAPK-Weg aktivieren konnte, selbst jedoch nicht aktiviert wurde. Das Transgen konnte in den Tubuluszellen und glomerulären Epithelzellen der Nieren nachgewiesen werden (Kaneshiro et al. 2007). Zusätzlich findet sich in den transgenen Ratten eine erhöhte Expression von COX-2 (Cyclooxygenase-2). Auch der Anteil an phosphoryliertem ERK1/2 war in den transgenen Tieren erhöht im Vergleich zum Wildtyp. Dies führte zu der Annahme, dass der (Pro-)Reninrezeptor über die Aktivierung des MAPK-Wegs die Expression von COX-2 beeinflusst. Eine erhöhte COX-2 Aktivität induziert im lokalen RAAS der Niere einen verminderten Widerstand in den afferenten Arteriolen, was zu erhöhtem Druck im Glomerulus und einer geringeren Natriumausscheidung führt. Somit hat COX-2 über die Produktion der Prostaglandine einen Einfluss auf die tubuläre Feedback-Konstriktion. Wurde COX-2 bei Ratten inhibiert, führte dies zu einem geringeren Blutfluss in der Nierenrinde (Kaneshiro et al. 2006).

Diskutiert wird außerdem eine Rolle des PRR an der glomerulären Filtrationsbarriere. Er soll nicht nur im Mesangium sondern auch in den Podozyten der Niere zu finden sein. Außerdem ist die Expression des PRR in Tieren, die an Bluthochdruck leiden, erhöht (Ichihara et al. 2008).

Eine Überexpression des humanen PRR in glatten Muskelzellen transgener Ratten führte zu einer Erhöhung des Blutdrucks, der Herzfrequenz und des Aldosteronspiegels im Plasma. Die Veränderung wurde mit zunehmendem Alter verstärkt (Burckle et al. 2006).

Der (Pro-)Reninrezeptor spielt ebenfalls eine interessante Rolle im Gehirn. Er konnte in kultivierten Zellen des Hypothalamus und des Hirnstamms nachgewiesen werden, vornehmlich im Soma der Nervenzellen und diskret im Axon. Die Stimulation des PRR durch Renin führte zu einer Aktivierung des MAPK-Wegs sowie einer stabilen Verminderung der Frequenz der Aktionspotentiale im Gehirn (Shan et al. 2008).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor *promyelozinc finger* (PLZF) ein direkter Interaktionspartner des C-terminalen Teils des PRR ist. Nach Aktivierung des PRR durch Renin kommt es zu einer Translokation des Transkriptionsfaktors aus dem

---

<sup>8</sup> HRP =handle region peptide, ist ein Protein, das spezifisch an den "Griff" des Prorenins bindet, und damit seine nicht-enzymatische Aktivierung verhindert (Kaneshiro et al. 2007).

Zytoplasma in den Kern, wo er die Transkription des PRR unterdrückt. Zudem konnte in diesem Zusammenhang eine Homodimerisierung des (Pro-)Reninrezeptors nachgewiesen werden (Scheffe et al. 2006).

Eine ganz neue Bedeutung kommt dem PRR im Zusammenhang mit dem Wnt-Signalweg zu, welcher eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung, in der Stammzellbiologie sowie in der Tumorgenese spielt. Der PRR bildet einen Teil des Rezeptorkomplexes an der Zelloberfläche und vermittelt als eine Art Adapter die Bindung zur V-ATPase. Bei einer Aktivierung des Komplexes kommt es zur Endozytose desselben. Der durch die V-ATPase erzeugte Protonengradient ist für die Phosphorylierung des LRP6-Rezeptors wichtig (Cruciat et al. 2010).

Zusammenfassend zeichnet sich das Action Myoclonus and Renal Failure (AMRF) Syndrom durch eine Beeinträchtigung zweier Organsystem aus. Die Patienten entwickeln in ihrer Adoleszenz eine progressive myoklonische Epilepsie. Zusätzlich manifestiert sich ein chronisches Nierenversagen auf dem Boden einer fokalen Glomerulosklerose. Als Ursache dieser hereditären Erkrankung konnte eine Mutation im lysosomalen Transportprotein LIMP2 identifiziert werden. Eine mögliche Erklärung der Pathophysiologie dieser genetischen Erkrankung könnte der (Pro-)Reninrezeptor durch seine vielfältigen Funktionen in Bezug auf die Regulation von Blutdruck und Wasserhaushalt, sowie seine intrazelluläre Aktivierung verschiedenster Signalkaskaden liefern.

### 2 Fragestellung

Die bekannteste und häufigste lysosomale Speichererkrankung ist der Morbus Gaucher. Ihm liegt ein Defekt der lysosomalen Hydrolase  $\beta$ -Glukozerebrosidase zugrunde. Das lysosomale integrale Membranprotein 2 (LIMP2) konnte als Mannose-6-Phosphat-unabhängiges Transportprotein der  $\beta$ -Glukozerebrosidase zum Lysosom identifiziert werden. Ein Defekt von LIMP2 führt zum Action Myoclonus and Renal Failure (AMRF) Syndrom, das durch Glomerulosklerose und myoklonische Epilepsie gekennzeichnet ist. Die Symptome des AMRF Syndroms lassen sich jedoch nicht aus der Transportfunktion von LIMP2 für  $\beta$ -Glukozerebrosidase erklären. Denn Patienten mit Morbus Gaucher leiden hauptsächlich an einer Hepatosplenomegalie, sowie Knochen- und Gelenkschmerzen, zeigen jedoch keinerlei Nierenbeteiligung. Des Weiteren findet sich bei Morbus Gaucher Patienten häufig eine geistige Retardierung, die bei AMRF Syndrom Patienten trotz des Krampfleidens ausbleibt.

Daraus ergeben sich folgende Fragen:

- Gibt es andere Proteine die mit LIMP2 interagieren und die Pathophysiologie des AMRF Syndroms erklären können?
- Kann eine Protein-Protein-Interaktion von LIMP2 und dem putativen Interaktor in vitro und in vivo nachgewiesen werden?
- Übernimmt LIMP2 erneut eine Transportfunktion ähnlich wie für die  $\beta$ -Glukozerebrosidase? Wenn ja, wo befindet sich die Interaktionsstelle?

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* = PCR) ist eine der wichtigsten Methoden der Molekularbiologie und dient der gezielten Vervielfältigung von DNA-Abschnitten *in vitro*. Dieses Verfahren wurde 1985 von Kary Mullis entwickelt (Mullis et al. 1987). Die zyklisch ablaufende Reaktion gliedert sich in drei Abschnitte: Denaturierung, Primerhybridisierung (*annealing*) und Elongation.

Durch ein mehrminütiges Erhitzen auf 95°C zu Beginn des Prozesses wird die Sekundärstruktur der DNA aufgebrochen und denaturiert. Im nachfolgenden Schritt lagern sich komplementäre Oligonukleotide, sogenannte Primer, an die DNA-Einzelstränge an. Sie binden an entgegengesetzte Enden des zu amplifizierenden Genabschnitts der beiden DNA-Einzelstränge und werden als *forward* und *reverse* Primer bezeichnet. Durch die Primerhybridisierung mit den DNA-Einzelsträngen wird das Andocken einer hitzestabilen Polymerase an die DNA ermöglicht. Die DNA-Polymerase ist als Enzym für die Herstellung eines komplementären DNA-Einzelstrangs anhand der vorliegenden Matrizen in der Elongationsphase zuständig.

Es wurde die *Pfu*-Polymerase verwendet, welche aus dem Organismus *Pyrococcus furiosus* stammt. Sie zeichnet sich dadurch aus, dass sie glatte DNA-Enden generiert, eine hohe Thermostabilität zeigt (optimale Temperaturbedingungen 72°C) und aufgrund ihrer 3'→5'-Exonukleaseaktivität eine geringe Fehlerrate besitzt (Lundberg et al. 1991).

Im Laufe von mehreren Zyklen kommt es zu einem exponentiellen Anstieg an Kopien des gewünschten DNA-Abschnitts. Zum Abschluss der Reaktion wird in einer mehrminütigen terminalen Elongations-Phase eine Vervollständigung aller DNA-Stränge ermöglicht.

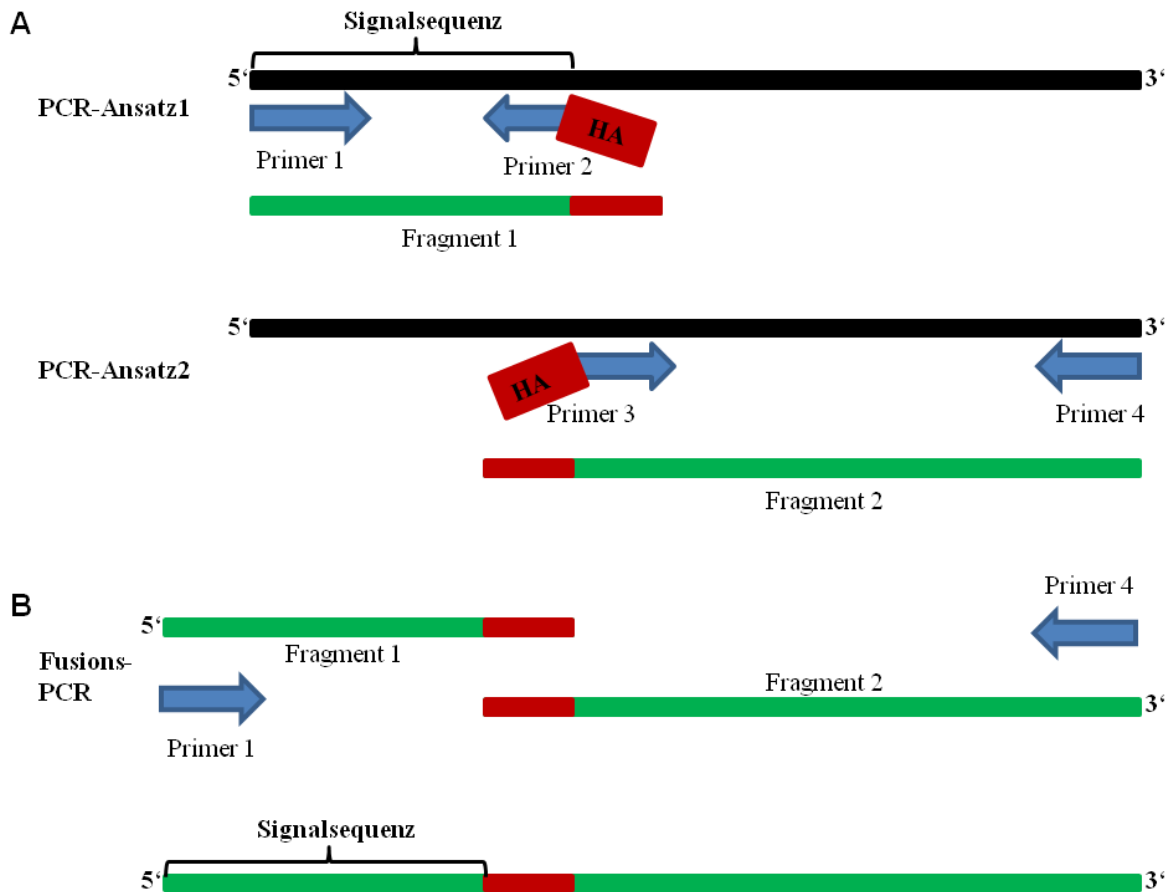
<p>29 µl Wasser 2,5 µl DMSO 5 µl <i>Pfu</i>-Puffer 4 µl dNTPs 5 µl Template 10ng/µl 2 µl <i>forward</i> Primer 10 pM 2 µl <i>reverse</i> Primer 10 pM 0,5 µl <i>Pfu</i>-Polymerase</p>	<b>A</b>	<p><b>PCR-Programm:</b></p> <table border="1"> <tr> <td>Initiale Denaturierung</td> <td>95°C</td> <td>5min</td> <td rowspan="5" style="font-size: 2em; vertical-align: middle;">} 40 Zyklen</td> </tr> <tr> <td>Denaturierung</td> <td>95°C</td> <td>30sec</td> </tr> <tr> <td><i>annealing</i></td> <td>56°C</td> <td>30sec</td> </tr> <tr> <td>Elongation</td> <td>72°C</td> <td>1,5 min</td> </tr> <tr> <td>Terminale Elongation</td> <td>72°C</td> <td>5min</td> </tr> <tr> <td>Kühlung</td> <td>10°C</td> <td>∞</td> <td></td> </tr> </table>	Initiale Denaturierung	95°C	5min	} 40 Zyklen	Denaturierung	95°C	30sec	<i>annealing</i>	56°C	30sec	Elongation	72°C	1,5 min	Terminale Elongation	72°C	5min	Kühlung	10°C	∞		<b>B</b>
Initiale Denaturierung	95°C	5min	} 40 Zyklen																				
Denaturierung	95°C	30sec																					
<i>annealing</i>	56°C	30sec																					
Elongation	72°C	1,5 min																					
Terminale Elongation	72°C	5min																					
Kühlung	10°C	∞																					

**Abb. 3.1 Die Polymerase-Kettenreaktion**

**A:** Die Klonierungs-PCRs wurden nach einem standardisierten Pipettierschema durchgeführt. **B:** Dies ist ein Beispiel für ein häufig verwendetes Programm zur Amplifikation in einem PCR-Cycler.

### 3.1.2 Fusions-PCR

Für aufwändigere Modifikationen der DNA-Sequenz, wie Einfügen oder Entfernen von ganzen Abschnitten, eignet sich eine besondere Form der PCR: die Fusions-PCR (Szewczyk et al. 2006). Die Reaktion verläuft in zwei Amplifikationsschritten:



**Abb. 3.2 Schematische Darstellung einer Fusions-PCR**

Als Beispiel wird das Einfügen eines HA-tags nach der Signalsequenz des (Pro-)Reninrezeptors verwendet.

**A:** Erster Schritt: Hier werden zwei DNA-Fragmente unabhängig voneinander hergestellt, welche jeweils an einem Ende die Sequenz des eingefügten tags enthalten. Primer 2 und 3 enthalten in ihrer Oligonukleotidsequenz das HA-tag. Dieser Bereich des Primers ist nicht komplementär zur Template-DNA und kann deshalb nicht binden. **B:** Im zweiten Schritt kommt es zur Fusion der beiden PCR-Fragmente. Fragment 1 und 2 werden als DNA-Template verwendet. Während der *annealing*-Phase kommt es zu einer Anlagerung der Primer 1 und 4 an den Enden der Sequenz und zusätzlich ist eine Zusammenlagerung der beiden Fragmente aufgrund ihrer komplementären DNA-Sequenz im Bereich des HA-tags möglich.

1. Zuerst werden zwei Primer entworfen (*forward* und *reverse*), die die DNA-Modifikation und gleichzeitig noch mindestens 15 Basenpaare (bp) Überlappung mit der ursprünglichen Sequenz beinhalten. Dann werden zwei getrennte PCR-Ansätze pipettiert. Jeder Ansatz enthält einen neu synthetisierten Primer mit der Mutation und einen weiteren Primer, der am anderen Ende der Sequenz bindet. Nach einem normalen PCR-Durchlauf gewinnt man so pro Ansatz ein DNA-Fragment.



2. Im folgenden Schritt werden die beiden DNA-Fragmente als *template* in einem gemeinsamen Ansatz verwendet. Zusätzlich befinden sich im Fusions-PCR-Ansatz noch Primer, die jeweils an den 3' und 5' Enden der kompletten Sequenz binden. Dabei kann es während der Annealingphase nicht nur zur Anlagerung von Primern kommen, sondern auch zur Hybridisierung der einzelsträngigen DNA-Fragmente aufgrund der überlappenden Sequenzanteile. So kann die DNA-Polymerase die fehlenden Nukleotide auffüllen und einen kompletten DNA-Doppelstrang herstellen.

### 3.1.3 Kolonie-PCR

Eine weitere Sonderform der PCR ist die Kolonie-PCR. Sie wird verwendet, um während einer Klonierung diejenigen Bakterien-Klone zu selektionieren, die die mutierte Sequenz in der richtigen Orientierung im Plasmid enthalten.

Dazu wird die thermostabile *Taq*-Polymerase verwendet, welche aus dem Organismus *Thermus aquaticus* gewonnen wurde. Sie synthetisiert etwa 1kb pro Minute und ist damit schneller als die Pfu-Polymerase, besitzt jedoch eine höhere Fehlerrate aufgrund einer fehlenden Exonukleaseaktivität (Tindall et al. 1988). Als Template der PCR werden hier transformierte Bakterien-Klone mithilfe eines sterilen Stäbchens von einer Agarplatte gewonnen. Bevor die gepickten Klone in einer Bakterienlösung inkubiert werden, wird das Stäbchen kurz in die fertige PCR-Lösung getaucht. Anhand der Ergebnisse der Kolonie-PCR kann dann entschieden werden, welche Klone für eine Minipräparation verwendet und welche verworfen werden.

<p><b>A</b></p> <p>17 µl Wasser                  1 µl DMSO                  2,5 µl <i>Dream-Taq</i>-Puffer                  2 µl dNTPs                  1 µl <i>forward</i> Primer 10 pM                  1 µl <i>reverse</i> Primer 10 pM                  0,5 µl <i>Taq</i>-Polymerase                  + gepickter Klon</p>	<p><b>PCR-Programm:</b></p> <table border="1"> <tr> <td>Initiale Denaturierung</td> <td>94°C</td> <td>5min</td> <td rowspan="5" style="font-size: 3em; vertical-align: middle;">} 25 Zyklen</td> </tr> <tr> <td>Denaturierung</td> <td>94°C</td> <td>30sec</td> </tr> <tr> <td><i>annealing</i></td> <td>55°C</td> <td>30sec</td> </tr> <tr> <td>Elongation</td> <td>72°C</td> <td>1 min</td> </tr> <tr> <td>Terminale Elongation</td> <td>72°C</td> <td>5min</td> </tr> <tr> <td>Kühlung</td> <td>10°C</td> <td>∞</td> <td></td> </tr> </table>	Initiale Denaturierung	94°C	5min	} 25 Zyklen	Denaturierung	94°C	30sec	<i>annealing</i>	55°C	30sec	Elongation	72°C	1 min	Terminale Elongation	72°C	5min	Kühlung	10°C	∞		<p><b>B</b></p>
Initiale Denaturierung	94°C	5min	} 25 Zyklen																			
Denaturierung	94°C	30sec																				
<i>annealing</i>	55°C	30sec																				
Elongation	72°C	1 min																				
Terminale Elongation	72°C	5min																				
Kühlung	10°C	∞																				

**Abb. 3.3 Reaktionsansatz einer Kolonie-PCR**

**A:** Im Vergleich zur Standard-PCR liegt bei der Kolonie-PCR nur ein Reaktionsvolumen von 25µl vor. Außerdem wird die *Taq*-Polymerase mit ihrem optimalen Puffer verwendet. Als Template verwendet man einen gepickten Bakterien-Klon. **B:** Das PCR-Programm unterscheidet sich durch eine um 1°C erniedrigte Denaturierungs- und *Annealing*-Temperatur und durch die geringe Zyklenanzahl.

### 3.1.4 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese werden DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt. Dazu wird ein Agarosegel benötigt, das aus 3g Agarose (1%) und 300ml TAE-Puffer besteht. Das Gemisch wird erhitzt, so dass sich die Agarose löst und danach mit 10µl Ethidiumbromid versehen. Die Lösung wird in einer Kammer ausgehärtet, in der Kämme angebracht sind, damit Taschen für das spätere Auftragen der Proben entstehen. Die Auftrennung der DNA erfolgt unter anderem in Abhängigkeit von der Agarosekonzentration. Bei einem 1% Agarosegel können Fragmente zwischen 0,5 und 7kb aufgetrennt werden.

Die DNA-Proben werden mit 6x Ladepuffer versehen. Das führt zu einer Blaufärbung und Gewichtszunahme der Proben, was das Pipettieren in die Geltaschen erleichtert. Als Kontroll-DNA dient ein 1kb-Marker (Roche).

Die DNA-Auftrennung erfolgt bei einer Spannung von 100-150V in 15-30 Minuten. Die Auswertung der Proben wird an einer UV-Dokumentationsanlage (Intas) durchgeführt. Dadurch, dass Ethidiumbromid in die DNA-Helix interkaliert und dieser Komplex durch UV-Licht anregbar ist, können die DNA-Proben detektiert werden. Zur Weiterverarbeitung der DNA im Rahmen einer Klonierung werden die benötigten DNA-Banden unter einer UV-Lampe bei 366nm ausgeschnitten. Zum Schluss muss die gewünschte DNA mithilfe des *High Pure PCR Product Purification Kits* (Roche) aus dem Gel eluiert und aufgereinigt werden.

### 3.1.5 Restriktionsverdau

Im Rahmen einer Klonierung muss das hergestellte DNA-Fragment durch spezielle Restriktionsenzyme geschnitten werden. Dabei handelt es sich um Endonukleasen, welche spezifische Nukleotidsequenzen von 4-8 Basen erkennen und die Phosphodiesterbindungen zwischen den Nukleotiden spalten. So entstehen überhängende Enden (*sticky ends*) oder glatte Enden (*blunt ends*). Eine Einheit eines Enzyms (*unit*) ist definiert als die Menge an Enzym, die benötigt wird, um 1µg Lambda-DNA in einer Stunde bei 37°C zu verdauen.

Die Restriktionsenzyme (Fermentas) werden mit ihrem spezifischen Reaktionspuffer zur aufgereinigten DNA (50µl) gegeben und je nach Enzym bei 37°C oder 50°C für eine Dauer von zwei bis zwölf Stunden inkubiert. Zum gleichen Zeitpunkt werden 2µg Vektor mit dem gleichen Verhältnis von Puffer und Enzym geschnitten. Bei einem Doppelverdau mit zwei unterschiedlichen Enzymen wird ein Puffer verwendet, indem beiden Enzyme aktiv sind. In Abhängigkeit von der jeweiligen Aktivität müssen die Enzyme in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen zugegeben werden.

Der Restriktionsverdau wird auch zur Überprüfung der korrekten Klonierung im Rahmen eines Kontrollverdaus eingesetzt. Hier wird 1 µg des hergestellten Plasmids mit 3 µl Puffer und 1-2 µl Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 2h bei 37°C oder 50°C inkubiert.

Nach dem Restriktionsverdau werden die Ansätze mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die gewünschte DNA aus dem Gel ausgeschnitten, eluiert und aufgereinigt.

### 3.1.6 Dephosphorylierung

Damit eine Ligation zwischen dem verdauten DNA-Fragment und dem gewünschten Vektor funktionieren kann, muss der Vektor nach dem Restriktionsverdau noch dephosphoryliert werden. Durch die Dephosphorylierung können die hergestellten DNA-Enden des Vektors nicht mehr miteinander oder mit sich selbst ligieren, was die Ausbeute an gewünschtem Ligationsprodukt erhöht. Für diesen Schritt wird die Alkalische Phosphatase (*Fast-AP*, Fermentas) benötigt, die am Ende des Restriktionsverdaus zum Reaktionsansatz gegeben wird und 30 Minuten bei 37°C inkubieren muss.

### 3.1.7 Ligation

Für die Ligation werden 7 µl des aufgereinigten PCR-Fragments (*insert*) mit 1 µl verdautem und dephosphoryliertem Vektor vermischt. Des Weiteren werden 1 µl der T4-DNA-Ligase (Fermentas) und des dazugehörigen Ligase-Puffers hinzugegeben. Dieser Ansatz wird entweder vier Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht in einem 17°C Wasserbad inkubiert. Danach muss die Ligase 10min bei 65°C inaktiviert werden, um die Transformationseffizienz zu erhöhen. Als Negativkontrolle wird anstelle des *inserts* Wasser zum Ligationsansatz gegeben. Damit kann die Religationsquote des Vektors abgeschätzt werden.

### 3.1.8 Elektroporation

Die Elektroporation wird für Transformationen von Ligationsansätzen in *E.coli* sowie für die Gewinnung von größeren Mengen an Plasmid, sogenannte Retransformationen eingesetzt (Dower et al. 1988).

Zuerst werden die *E.coli*-Bakterien, welche bei -80°C gelagert werden, auf Eis aufgetaut. Gleichzeitig werden die Elektroporationsküvetten gekühlt. Dann werden 1 µl des ligierten Plasmids zu 50 µl elektrokompenten Bakterien pipettiert und bei 2,5kV Spannung transformiert (Gene Pulser: 400 Ω Widerstand, 25 µF Kapazität). Anschließend werden die

elektroporierten Bakterien schnellstmöglich in 1ml erwärmtes LB-Medium überführt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zum Schluss werden die Bakterien bei 5.000rpm herunterzentrifugiert und in einem kleinen Restvolumen von 50-100µl resuspendiert. Die Resuspension wird unter sterilen Bedingungen auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Die Platten enthalten ein Selektionsantibiotikum (50µg/ml Ampicillin oder 30µg/ml Kanamycin) und das transformierte Plasmid trägt ein Resistenzgen gegen das entsprechende Antibiotikum. Auf diese Weise ist es nur denjenigen Bakterien möglich zu wachsen, die das Plasmid aufgenommen haben. Die LB-Agarplatten werden 12-16 Stunden bei 37°C inkubiert. Bis zur Weiterverarbeitung werden die Platten mit Parafilm verschlossen und bei 4°C gelagert. Für die Retransformationen wird der Bakterienansatz anstelle der Agarplatten direkt in einen Erlenmeyer-Kolben mit 100ml LB-Selektions-Medium gegeben und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert.

### 3.1.9 Plasmidamplifikation und -aufreinigung

Von den über Nacht gewachsenen Klonen auf den LB-Agarplatten werden am folgenden Tag mithilfe von sterilen Stäbchen einzelne Klone gepickt und in 3ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum eine weitere Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert.

Bei den kleinen 3ml Klonierungs-Ansätzen wurden die Plasmide mithilfe des *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas) nach Vorschrift des Herstellers aufgereinigt. Bei Retransformationen wurde das *Pure Yield Plasmid Midiprep System* (Promega) verwendet.

### 3.1.10 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration der DNA wurde mit einem Photometer (GeneQuant pro) anhand der optischen Dichte (OD) bei 260nm in einer 10mm-Quarzküvette (Amersham) bestimmt. Eine OD von 1,0 entspricht bei dieser Wellenlänge einem Doppelstrang-DNA-Gehalt von 50µg/ml. Aus dem Verhältnis der optischen Dichte bei 260 und 280nm ( $OD_{260}/OD_{280}$ ) kann die Reinheit der DNA abgeschätzt werden. Als Richtwert wurde ein Verhältnis von 1,8 bis 2,0 als rein bezeichnet. Alle Werte außerhalb dieser Spanne deuten auf eine Verunreinigung hin, die meist durch Proteine verursacht ist.

### 3.1.11 DNA-Sequenzierung

Nach der erfolgreichen Klonierung eines Plasmids wurde dieses zur Firma GATC Biotech (Konstanz) geschickt und sequenziert. Mit der DNA-Sequenzierung sollte sichergestellt

werden, dass während der Klonierungsprozedur keine ungewünschte Mutation entstanden ist. Die erhaltenen Sequenzen wurden anhand des Programms DNASTAR (Lasergene) ausgewertet. GATC Biotech verwendet unter anderem die 1975 von Sanger entwickelte Didesoxy-Methoden zur Sequenzierung von DNA (Sanger et al. 1977). Aufgrund des Einbaus von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden (ddNTPs) in die DNA im Rahmen einer PCR kommt es zum gezielten Kettenabbruch. Die entstandenen Fragmente werden durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mithilfe eines Lasers zur Fluoreszenz angeregt. Die ddNTPs am Ende jedes DNA-Fragments zeigen unterschiedlich farbige Fluoreszenzen und können so von einem Detektor erkannt und unterschieden werden.

#### **3.1.12 Herstellung elektrokompetenter Bakterien**

Zur Herstellung von elektrokompetenten Bakterien wird der *E.coli*-Stamm XL1-blue verwendet, welcher eine natürliche Tetrazyklin-Resistenz besitzt. Zuerst werden die Bakterien fraktioniert auf einer LB-Agarplatte, die zuvor mit 50µl Tetrazyklin versehen wurde, mithilfe einer Impföse ausgestrichen. Die Agarplatte wird über Nacht bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wird ein Bakterienklon gepickt und mit 50ml LB-Medium und 50µl Tetrazyklin als Vorkultur eine weitere Nacht bei 37°C geschüttelt. Am dritten Tag wird je 1l vorgewärmtes LB-Medium mit 20ml Bakterien-Vorkultur versetzt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,6 herangezüchtet.

Die gewachsenen Bakterienkulturen werden auf 250ml Zentrifugationsbecher verteilt und 15min bei 5000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgekippt, die Bakterienpellets werden mit 20ml eiskaltem *aqua bidest.* resuspendiert, auf zwei Becher gepoolt, mit *aqua bidest.* aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Der Waschschrift mit *aqua bidest.* wird ein weiteres Mal wiederholt. Danach werden die Pellets mit 20ml eiskalter steril filtrierter 10% Glycerin-Lösung resuspendiert und in zwei 50ml Sarstedtröhrchen überführt. Die großen Zentrifugationsbecher werden mit 30ml Glycerin-Lösung nochmals gespült und ebenfalls in die 50ml Sarstedtröhrchen überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 0°C und 3200rpm für 20 Minuten. Zum Schluss wird der Überstand vorsichtig abgekippt und das Pellet in 4 ml eiskalter 10% Glycerin-Lösung resuspendiert. Aus dieser Resuspension werden 50µl *aliquots* hergestellt, welche direkt auf Trockeneis gelagert und danach bei -80°C eingefroren werden.

### 3.2 Zellbiologische Methoden

#### 3.2.1 Zellkulturbedingungen

Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich um adhärenente Zellen. Sie werden alle unter den gleichen sterilen Bedingungen gehalten. Das Standard-Zellkulturmedium besteht aus dem Grundmedium *DMEM High Glucose* (PAA Laboratories), das mit 10% fetalem Kälberserum (FCS, 30 min hitzeinaktiviert bei 56° C, PAA Laboratories) und 100U/ml Penicillin sowie 0,1mg/ml Streptomycin versehen wird. Die Inkubation der Zellen erfolgt in 10cm Zellkulturschalen in einem Brutschrank bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> und gesättigter Wasserdampfatmosphäre. Jegliche Behandlung der Zellen erfolgt unter einer Sterilbank. Alle Materialien, die im Rahmen der Zellkultur zum Einsatz kommen, werden entweder vor Gebrauch autoklaviert oder mit *Pursept-A* (Merz Pharma) desinfiziert. Die Lagerung des Mediums, des Trypsins, der Transfektionsreagenzien und der Selektionsantibiotika erfolgt bei 4°C. Vor der Benutzung werden Medium und Trypsin in einem 37°C Wasserbad erwärmt. Zum Waschen der Zellen wird autoklavierte PBS verwendet, welche bei Raumtemperatur gelagert wird.

#### 3.2.2 Auftauen und Revitalisieren von Zellen

Eukaryotische Zelllinien können längerfristig in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Möchte man die Zellen wieder in Kultur aufnehmen, müssen sie aufgetaut werden. Sie müssen ihre volle Vitalität erhalten, bevor sie einsatzfähig sind.

Die Zellen werden aus dem Stickstofftank genommen. Danach wird unter der Sterilbank die Kappe des Kryoröhrchens vorsichtig geöffnet, um eventuellen Druck abzulassen, der sich beim Einfrieren gebildet hat. Die Zellen werden dann im verschlossenen Röhrchen langsam in der Hand erwärmt. Anschließend werden sie in 5ml erwärmtem Medium aufgenommen und vorsichtig vermischt. Die Suspension wird in einem 15ml Sarstedtröhrchen für 3min bei 600rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Mediums wird das Zellpellet in 10ml erwärmtem Vollmedium resuspendiert. Zum Schluss werden die aufgetauten und gewaschenen Zellen in eine 10cm Zellkulturschale überführt. Zu Anfang muss täglich das Medium gewechselt werden, um das Zellwachstum durch tote Zellen und Zelldetritus nicht zu behindern.

#### 3.2.3 Zellen passagieren

Erreichen die Zellen eine Konfluenz von 80-100%, werden sie in eine neue Zellkulturschale umgesetzt. Dazu muss das alte Medium mit einer sterilen Glaspipette abgesaugt und die Zellen zweimal mit 3ml PBS gewaschen werden. Danach löst man die adhärenenten Zellen vom

Boden der Schale mit 1ml Trypsin/EDTA (0,25% Trypsin in 0,03% EDTA, PAA Laboratories) für einige Minuten bei 37°C. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1ml Standard-Zellkulturmedium gestoppt. Nun können die Zellen sorgfältig in Suspension aufgenommen werden. Je nach Wachstumseigenschaften müssen die Zellen in einer 5-40x Verdünnung ausgesät werden.

Die Zellen werden normalerweise in 10cm Schalen mit 10ml Medium gehalten. Für einzelne Versuche werden die Zellen jedoch in 6cm-Schalen mit 4ml Medium und 6-Well-Formaten mit 3ml Medium ausgesät.

### 3.2.4 Zellzahlbestimmung

Um ein möglichst gleichmäßiges und reproduzierbares Aussäen von MEF-Zellen zu ermöglichen wird ein Zellzählgerät benutzt (CASY Model DT).

Die Vorbereitung der Zellen erfolgt durch Abnahme des Mediums und einmaliges Waschen der Zellen mit PBS. Dann werden sie mit 1ml Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale abgelöst, in 9ml Standard-Zellkulturmedium resuspendiert und in 15ml Sarstedt-Röhrchen überführt. Von dieser Zellsuspension werden 100µl zur Zellzählung verwendet und in 10ml *CASY TON-Lösung* (innovatis AG) pipettiert. Das Gemisch wird von der Maschine angesaugt und die Zellzahl wird anhand einer elektrischen Impuls-Messung bestimmt. Dazu wird ein erstellter Datensatz verwendet, der spezifisch auf MEFs optimiert ist und der die Grenzen zwischen lebenden und toten Zellen klar definiert.

Die restliche Zellsuspension wird 5 Minuten bei 200rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet wird in  $k$  ml Standard-Zellkulturmedium resuspendiert (Berechnung von  $k$ : gezählte lebende Zellmenge  $\times 10 = 1 \times 10^7 \times k$ ). Das ergibt eine Konzentration der Suspensionslösung von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml. Nun werden je nach Anwendung unterschiedliche Zellmengen ausgesät.

### 3.2.5 Kryokonservierung von Zellen

Die längerfristige Lagerung von Zellen erfolgt in flüssigem Stickstoff. Dazu werden 80-100% konfluente Zellschalen verwendet. Das Medium wird verworfen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann trypsinisiert. Danach werden die Zellen in 5ml Standard-Zellkulturmedium resuspendiert und in einem 15ml Sarstedröhrchen für 5min bei 600rpm zentrifugiert. Das Medium wird abgesaugt und das Zellpellet in 1ml Einfriermedium (*DMEM High Glucose*, 20% FCS, 10% DMSO, 100U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin) resuspendiert und in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Zellen werden direkt vor Ort auf

Trockeneis eingefroren und über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Am nächsten Tag werden die Zellen in einen Stickstofftank überführt.

### 3.2.6 Transfektion

Die Transfektion dient der Einbringung von Fremd-DNA als Plasmid in Säugetierzellen. Dabei kann unterschieden werden, ob es sich um zeitweiliges Einbringen des Plasmids handelt (transiente Transfektion) oder eine dauerhafte Aufnahme (stabile Transfektion). Hierzu können verschiedene Methoden verwendet werden, wie zum Beispiel das Nutzen von kationischen Polymeren. Diese bilden kompakte, positiv geladene Komplexe mit der DNA und erleichtern damit die Aufnahme in die Zelle (*TurboFect*, Fermentas). Eine andere Methode ist die Lipofektion, bei der die Fremd-DNA in Liposomen verpackt wird, die mit der Zellmembran fusionieren können.

#### 3.2.6.1 Transiente Transfektion

Die Zellen werden 6–24 Stunden vor der eigentlichen Transfektion passagiert, so dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 30% (für Immunfluoreszenz) oder 50% (für Proteindetektion im Western Blot) erreicht haben. Zur Transfektion werden 100–300  $\mu\text{l}$  reines Grundmedium *DMEM High Glucose* (PAA Laboratories) verwendet. Dazu werden 1–3  $\mu\text{g}$  DNA zu 2–6  $\mu\text{l}$  *TurboFect* (Fermentas) pipettiert. Das Gemisch wird vorsichtig resuspendiert und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird es nochmals resuspendiert und anschließend auf die Zellen gegeben. Für Immunfluoreszenz-Untersuchungen werden die Zellen auf sterilen Coverslips in 6-Well-Zellkulturschalen ausgesät und mit 1  $\mu\text{g}$  DNA transfiziert. Für einfache Expressionsanalysen werden die Zellen in 6cm-Schalen herangezogen und 1,5  $\mu\text{g}$  DNA zur Transfektion verwendet. Bei Ko-Immunpräzipitationen werden 10cm-Schalen sowie 2,5  $\mu\text{g}$  DNA benötigt.

#### 3.2.6.2 Stabile Transfektion von Hek-Zellen

Die stabile Transfektion wurde genutzt um Hek293T Zellen herzustellen, die längerfristig das Plasmid pFROG-Renrez-HA exprimieren, welches die Sequenz des (Pro-)Reninrezeptors mit einem C-terminalen HA-tag trägt. Dadurch sollte die schlechte Expression des (Pro-)Reninrezeptors in transienten Transfektionen verbessert werden.

Zuerst wurde eine gewöhnliche Transfektion mit *TurboFect* (Fermentas) durchgeführt, jedoch wurde zusätzlich ein Vektor mit Antibiotikaresistenz gegen Hygromycin pGK-Hyg in einem Verhältnis von 5:1 und 10:1 (pFROG-Renrez-HA: pGK-Hyg) transfiziert. Als Kontrolle



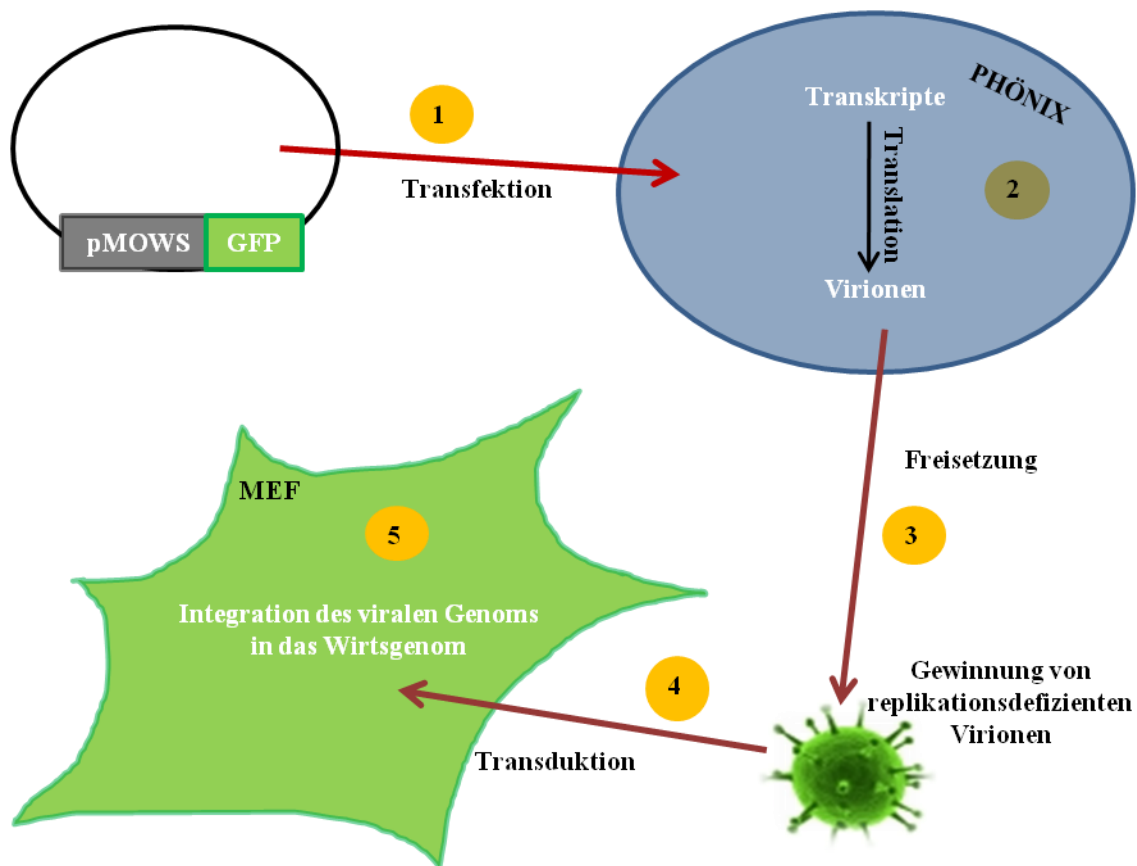
diente eine Zellkulturschale, die nur mit dem Plasmid pFROG-Renrez-HA transfiziert wurde. In den darauffolgenden Wochen wurde täglich das Medium der Zellkulturschalen gewechselt. 48 Stunden nach der initialen Transfektion wurde das Antibiotikum Hygromycin dem Standard-Zellkulturmedium in einer Konzentration von 100µg/ml zugesetzt. Diese Antibiotikakonzentration wurde täglich um 100µg/ml erhöht, bis eine finale Hygromycin-Konzentration von 500µg/ml erreicht war. Bei dieser Konzentration waren alle Zellen in der Kontrollschale verstorben, jedoch lebten noch einzelne Zellen in den doppeltransfizierten Schalen. Diese Zellen wurden weitere zwei Wochen mit dem Hygromycin-haltigen Medium (500µg/ml) inkubiert, bis sich größere Zellkolonien gebildet hatten. Dann wurden die Zellen in zwei neue Zellkulturschalen passagiert. Eine Schale davon wurde für eine Expressionskontrolle genutzt, bei der das Vorhandensein des (Pro-)Reninrezeptors überprüft wurde. Nachdem die Expressionskontrolle positiv ausgefallen war, wurde die verbleibende Zellkulturschale nochmals passagiert und Aliquots mit der stabilen Zelllinie HEK293T+pFROG-mRenrez-HA oder HEK293T+pFROG-hRenrez-HA eingefroren. Die stabilen Zelllinien wurden danach immer unter Selektionsbedingungen gehalten, damit es zu keinem Verlust des aufgenommenen Plasmids kommen konnte.

#### 3.2.7 Retrovirale Transduktion von MEF-Zellen

Ein Retrovirus besteht aus einer Doppellipidschicht mit Hüllproteinen sowie einem hexagonalen Kapsid, das zwei RNA-Kopien des viralen Genoms enthält. Der Retrovirus vermehrt sich, indem er über rezeptorvermittelte Membranfusion in eine Wirtszelle aufgenommen wird. Dort kommt es zu einer Auflösung der Hüllprotein und des Kapsids sowie zur Freisetzung der viralen RNA. Nach der Infektion schreibt die reverse Transkriptase die virale RNA in doppelsträngige DNA um. Anschließend kann während der Zellteilung der Wirtszelle durch die fehlende Kernmembran die retrovirale DNA in das Genom der Wirtszelle integriert werden. Im weiteren Verlauf werden die viralen Proteine durch die Proteinmaschinerie der Wirtszelle hergestellt und es kommt zu einer Abknospung des Virus aus der Wirtszelle.

Das Prinzip der retroviralen Transduktion basiert auf einer doppelt gesicherten viralen Infektion von MEF-Zellen. Die Verpackungszelllinie PHÖNIX besitzt zwar die Information für die Verpackungsproteine eines Virus - das sind die reverse Transkriptase (*pol = polymerase*), das Oberflächenprotein (*env = envelope*) und das Kapsid sowie die Kernproteine (*gag = group-specific antigen*) - jedoch fehlt ihr das Signal zur Verpackungsinitiation. Der Vektor pMOWS, der in die PHÖNIX-Zellen transfiziert wird, enthält hingegen das

Initiationssignal sowie die Sequenz des zu amplifizierenden Proteins und ein Resistenzgen gegen Puromycin. Wurden die PHÖNIX-Zellen transfiziert, können sie Viren herstellen und ausschütten, die den Vektor pMOWS enthalten. Die Viren können zwar MEF-Zellen infizieren, jedoch können sie sich nicht weitervermehren, da die Information für die Verpackungsproteine des Virus auf dem Vektor pMOWS nicht kodiert ist (Ketteler et al. 2002) (Lang 2004).



**Abb. 3.4 Schematische Darstellung der retroviralen Transduktion von MEF-Zellen**

Zuerst wird die PHÖNIX-Verpackungszelllinie mit dem Vektor pMOWS transfiziert (1). Durch die Transfektion sind in der PHÖNIX-Zelle nun Verpackungssignal und die virusspezifischen Proteine vereint, welche für die Verpackung verantwortlich sind. Dadurch kann die PHÖNIX-Zelle Viren herstellen (2), die ins Medium ausgeschüttet werden (3). Durch Zentrifugation und Zugabe von Polybren, wird die Aufnahme der Viren in die MEFs erleichtert (4). So kann die Integration des viralen Genoms in das Wirtsgenom erfolgen (5).

Die PHÖNIX-Zellen wurden am ersten Tag ausgesät und am zweiten transient mit *TurboFect* transfiziert. Bereits 6 Stunden nach Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt: das Medium wurde abgesaugt, die Zellen einmalig mit PBS gewaschen und in 2ml IMEM-Medium (15ml FCS, 500µl Penicillin / Streptomycin, 25µl β-Mercaptoethanol, 34,5ml DMEM High Glucose) über Nacht im Inkubator bei 37 °C gehalten. Am gleichen Tag wurden  $1 \times 10^5$  Zellen/ml (583-2, LIMP2-KO-MEF) und  $3 \times 10^5$  Zellen/ml (583-3, WT-MEF) pro 12-Well in 1ml Standard-Zellkulturmedium ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am

dritten Tag erfolgte die eigentliche retrovirale Transduktion. Nachdem die PHÖNIX-Zellen etwa 18h in IMEM gewachsen waren, wurde das Medium, welches die produzierten Viren enthielt, von den Zellen abgenommen. Der virale Überstand wurde entweder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren, kurzfristig bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert oder direkt weiter verwendet. Dazu wurde zum viralen Überstand  $8\mu\text{g/ml}$  Polybren pipettiert, ein positiv geladenes Polymer, welches an die Oberfläche der Zellen binden und die Oberflächenspannung neutralisieren kann. Dadurch können virale Glykoproteine effektiver binden. Die MEF-Zellen wurden vorbereitet, indem das Medium abgenommen wurde und sie einmal mit PBS gewaschen wurden. Der virale Überstand (1ml) wurde auf die MEF-Zellen gegeben und die Zellkulturplatten wurden für 2 Stunden bei 1800rpm zentrifugiert, um die Viren in die Zellen zu pressen. Anschließend wurde pro well 1ml Standard-Zellkulturmedium hinzugegeben und die Zellen über Nacht im Inkubator bei  $37^{\circ}\text{C}$  gehalten. Nach 24h konnte eine erste Kontrolle der Fluoreszenz von GFP (grün fluoreszierendes Protein) am Mikroskop durchgeführt werden. Außerdem wurde ein Mediumwechsel durchgeführt: der retrovirale Überstand wurde abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in frischem Standard-Zellkulturmedium 24 Stunden im Inkubator gehalten. Die zweite GFP-Kontrolle erfolgte nach 48 Stunden. Danach wurden die Zellen entweder geerntet, fixiert oder selektioniert. Die MEF-Zellen wurden mit  $2,5\mu\text{g/ml}$  Puromycin selektioniert um stabile Zelllinien zu erhalten, die den (Pro-)Reninrezeptor exprimieren. Eine Woche lang wurde täglich das Medium gewechselt, und frisch mit  $2,5\mu\text{g/ml}$  Puromycin versehen. Es kam zu einem Absterben der Kontrollzellen, welche mit dem virenleeren Überstand transduziert worden waren. Gleichzeitig bildeten sich Kolonien von stabil transduzierten MEF-Zellen, welche im Weiteren auf ihre Expression des (Pro-)Reninrezeptor überprüft wurden.

#### **3.2.8 Zellernte/-pelletierung**

Die Zellen werden 24 bis 48 Stunden nach der Transfektion geerntet. Zu Beginn wird die Transfektionseffizienz unter dem Fluoreszenzmikroskop anhand des Anteils von grün leuchtenden Zellen an der Gesamtzellmenge bewertet. Dafür wurden in einer Kontrollschale Zellen mit dem Plasmid (peGFP) transfiziert, welches die Sequenz von GFP enthält. Um eine Proteindegradierung zu vermeiden, erfolgen alle folgenden Schritte auf Eis unter Zusatz des Complete-Proteaseinhibitors (Roche). Zuerst wird das Medium abgenommen und die Zellen mit 2ml PBS gewaschen. Dann werden die Zellen in 1ml eiskaltem PBS/Complete mithilfe eines Zellschabers gelöst. Die gewonnene Zellsuspension wird in ein 1,5ml-Eppendorfgefäß pipettiert und 15 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 13.000rpm mithilfe einer Tischzentrifuge pelletiert.

Zum Schluss wird der Überstand verworfen und das Pellet entweder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert oder direkt weiterverwendet.

#### **3.2.9 Herstellung von Zellysaten**

Das Zellpellet aus 3.2.8 wird je nach Größe mit 50-500 $\mu\text{l}$  Lysispuffer (0,5% TritonX-100 in PBS mit Complete-Proteaseinhibitor) versetzt und kurz mittels Vortexer durchmischt, um eine Zellsuspension zu erhalten. Dann behandelt man die Zellsuspension zweimalig 20 Sekunden in einem Ultraschallwasserbad mit 20-30% der Maximalintensität. Dadurch wird das Zellpellet aufgebrochen. Zwischen den zwei Durchgängen werden die Proben auf Eis gelagert. Danach wird das Lysat 15 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 13.000rpm zentrifugiert. Der Überstand enthält das Totallysat und wird weiterverarbeitet. Das Pellet enthält Zellkerne und anderen Zellschrott und wird verworfen.

#### **3.2.10 Membranpräparation**

Hierzu wird das Zellpellet aus der Zellernte (3.2.8) mit 300 $\mu\text{l}$  PBS + Complete (1 Tabl. per 50ml) + PEFA-bloc (47,9mg per 50ml) versetzt und im Ultraschallwasserbad zweimal 10 Sekunden lang lysiert. Danach wird das Lysat 10 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 3.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird in zwei Fraktionen aufgeteilt:

- 1) 100 $\mu\text{l}$  des Homogenates werden zur Herstellung des Totallysats genutzt. Zum Totallysat werden 0,2% TritonX gegeben und es wird erneut eine Behandlung im Ultraschallwasserbad für dreimal 20 Sekunden durchgeführt. Dann erfolgt eine Sedimentierung des Zelldebris bei 14.000rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  für 10 Minuten. Das Totallysat befindet sich im Überstand.
- 2) Die anderen 200 $\mu\text{l}$  des Homogenats werden für eine Membranpräparation genutzt. Dazu müssen die Proben in spezielle Ultrazentrifugengefäße pipettiert und gegeneinander ausgewogen werden um ein Schlingern des Ultrazentrifugenrotors aufgrund unterschiedlicher Gewichtsverteilung zu verhindern. Anschließend werden die Proben eine Stunde bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 50.000rpm ultrazentrifugiert. Der Überstand enthält die lösliche Fraktion der Zelle. Das Pellet wird mit Lysispuffer (PBS, 0,2% TritonX + Complete + PEFA) versehen und ebenfalls einer weiteren Behandlung im Ultraschallwasserbad für dreimal 20 Sekunden unterzogen. Zum Abschluss erfolgt eine Sedimentierung des Zelldebris bei 14.000rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  für 10 Minuten. Der Überstand enthält nun die Membranfraktion.

### 3.2.11 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung des Proteingehalts der hergestellten Zellysate erfolgt mit einem Kit der Firma Pierce welches die Bicinchoninsäure-(BCA)-Methode nutzt.

Die Lysate werden in einer Verdünnung von 1:10 im 96-well-Format aufgetragen, um sie mit dem Standard vergleichen zu können, welcher aus einer seriellen BSA-Verdünnung in ddH<sub>2</sub>O besteht. Die Proben werden 30 Minuten bei 37°C mit 200µl *BCA Working Reagent* inkubiert, nachfolgend wird ihre die Extinktion bei 562nm im Mikrotiterplattenleser gemessen. Es werden jeweils zwei Messungen pro Probe durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Der Mittelwert der Extinktion wird mit dem BSA-Standard in Korrelation gebracht und daraus der Proteingehalt berechnet.

### 3.2.12 SDS-Probenvorbereitung

Je nach Versuchsansatz werden SDS-Proben im Gesamtvolumen von meist 20µl hergestellt, die aus 20-40µg Protein, ddH<sub>2</sub>O und 5µl vierfach konzentriertem, reduzierendem SDS-PAGE-Probenauftragspuffer (4x Laemmli-Puffer) bestehen. Die Proben werden 10 Minuten bei 55°C auf einem Thermoblock erhitzt und dann entweder direkt auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen oder bei -20°C gelagert. Durch die Hitze werden die Wasserstoffbrücken der Proteinverbindungen aufgebrochen und Sekundär- sowie Tertiärstrukturen zerstört. Das enthaltene β-Mercaptoethanol führt zur Spaltung von Disulfidbrücken durch Reduktion.

### 3.2.2.13 Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE = *sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) dient zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in einem Polyacrylamidgel. Das Gel wird dazu in einer Kammer befestigt, die mit Elektrolytpuffer (SDS-haltiges Tris-HCl / Tris-Glycin-Puffersystem) gefüllt ist. Anschließend wird eine Spannung angelegt. Kleinere Proteine können leichter und schneller durch die Maschen des Gels laufen (Bowen et al. 1980).

Zur Auftrennung der Proteine wird das *Mini-Protein 3-Electrophoresis-System* (BioRad) verwendet. Dazu werden 10% oder 12,5%-ige Trenngele und 4,5%-ige Sammelgele verwendet, die eine Dicke von 1,5mm aufweisen und 10 oder 15 Taschen besitzen. Die Gele werden in einer Gießvorrichtung zwischen zwei Glasplatten gegossen, welche zuvor mit 70% technischem Ethanol gereinigt wurden. Zum Auspolymerisieren wird TEMED (0,3% N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, Roth) und als Radikalstarter APS verwendet (0,06% Ammoniumperoxodisulfat, Roth). Direkt nach der Zugabe der beiden Komponenten wird das

Trenngel-Puffergemisch in die Vorrichtung gegossen und mit einer Schicht Isopropanol bedeckt, um einen glatten Übergang zwischen Trenngel und Sammelgel zu erhalten und ein Austrocknen des Gels während der dreißigminütigen Polymerisation zu verhindern. Anschließend wird das Isopropanol abgegoßen und das Gel mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Der Sammelgel-Ansatz wird ebenfalls direkt nach der Zugabe von TEMED und APS auf das auspolymerisierte Trenngel gefüllt und es wird entweder ein 10er- oder 15er-Kamm hineingesteckt, damit Taschen für das spätere Auftragen der Proben entstehen. Nach der kompletten Polymerisation wird die Gießvorrichtung abmontiert und das Gel entweder direkt verwendet oder bei 4°C in feuchte Tücher gewickelt über Nacht gelagert. Zum Säubern der Taschen wird der Kamm entfernt und die Taschen mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Verbleibende Gelreste werden mithilfe einer Kanüle, die an eine Absaugvorrichtung angeschlossen ist, entfernt.

Zur eigentlichen Elektrophorese wird das Gel in eine Kammer mit Elektrodenpuffer eingebaut. Dann werden die Proben vorsichtig in die Taschen pipettiert, so dass keine Proteine verloren gehen. Zum Sammeln der Proben im Sammelgel wird das Gel 15 Minuten bei 100V gefahren. Zur Auftrennung der Proben im Trenngel wird die Spannung auf 130-150V so lange erhöht, bis die Bromphenolblaufront gerade noch im Trenngel zu sehen ist. Eine Tasche wird immer mit dem Proteinstandard *Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus* (Fermentas) gefüllt. Nach der Elektrophorese werden die aufgetrennten Proteine aus dem Gel mithilfe von *Semi Dry* oder *Tank Blot* auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert.

#### **3.2.14 Fixierung von Zellen**

Die Zellen werden für eine spätere Betrachtung unter dem Mikroskop fixiert. Dazu werden Paraformaldehyd (PFA) und Glutaraldehyd (GA) verwendet, wobei die freien Aldehydgruppen der beiden Chemikalien an freie Aminogruppen in den Zellen binden.

Für eine Standard-Immunfluoreszenz werden die Zellen auf Coverslips in 6-Well-Platten fixiert. Dafür wird das Medium 24-48 Stunden nach Transfektion abgesaugt und die Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Danach wird 1ml 4% PFA/PBS pro Well auf die Zellen pipettiert und das Ganze 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Schluss werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und bei 4°C in PBS gelagert oder direkt weiterbearbeitet.

### 3.3 Immunologische Methoden

#### 3.3.1 *Western Blot*

Als *Western Blot* wird die Übertragung von Proteinen auf eine Membran bezeichnet, welche zum Beispiel über Diffusion oder Elektrophorese erfolgt. Die Methode des *Blotting* wurde von Edwin Southern entdeckt, der die Auftrennung von DNA-Fragmenten und nachfolgende Hybridisierung als *Southern Blot* bezeichnete (Southern 1975). Später wurde eine Auftrennung von RNA-Fragmenten als *Northern Blot* und eine Proteinauftrennung als *Western Blot* bezeichnet.

Es wurde die Methode von H. Towbin für einen Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran modifiziert angewendet (Towbin et al. 1979). Dabei wird das Proteingemisch, das durch eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt wurde, durch ein senkrecht zum Gel gerichtetes elektrisches Feld auf eine Membran transferiert. Die Proteine bleiben an der Membranoberfläche durch hydrophobe Wechselwirkungen haften und das angelagerte SDS kann aus der Membran gewaschen werden. Im nachfolgenden Schritt können die Proteine soweit renaturiert werden, dass sie ihre Sekundär- oder Tertiärstruktur zurückerhalten. Dann sind sie für weitere Methoden, zum Beispiel Detektion durch Antikörper-Bindung (Immundetektion) zugänglich. Es wurden zwei Methoden zur elektrophoretischen Übertragung verwendet: das *Tank-Blot*- und das *Semidry-Blot*-Verfahren.

##### 3.3.1.1 *Semidry-Blot-Verfahren*

Die durch *SDS-PAGE* aufgetrennten Proteine werden mittels *Semidry*-Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Diese Methode wurde dem *Tank-Blot*-Verfahren speziell bei der Detektion von kleineren Proteinen vorgezogen.

Hierzu wurde Filterpapier (Whatman, Roth) und eine Nitrocellulose-Membran (Whatman Protran Nitrocellulose Transfer Membran, Whatman GmbH) auf die Größe des SDS-Gels zurechtgeschnitten und in Transferpuffer getränkt. Danach wurden sie in einer *Semidry*-Apparatur aufgeschichtet (Transblot SD, BioRad). Mithilfe des *Blotting Rollers* (Invitrogen) wurde jede Schicht von Luftblasen befreit, um einen möglichst gleichmäßigen Transfer zu erzielen. Es wurde eine Spannung von 20V für 70 Minuten angelegt.

##### 3.3.1.2 *Tank-Blot-Verfahren*

Beim *Tank-Blot*-Verfahren erfolgte der Transfer in einer Kammer (Trans-Blot Cell bzw. Mini Trans-Blot Cell, BioRad), die vollständig mit Transferpuffer gefüllt war. Es wurden Schlitten verwendet, in denen nach dem gleichen Prinzip wie bei der *Semidry*-Apparatur eine

Aufschichtung erfolgte, jedoch wurden die äußersten Filterpapiere durch dünne Schwämme ersetzt. Außerdem wurde der Transfer in einem 4°C Raum unter ständigem Rühren des Puffers durchgeführt. In die Kammer wurde ein Kühlelement (-20°C) eingebaut.

Der Transfer erfolgte bei 20V über Nacht mit einer nachfolgenden Erhöhung der Spannung auf 70V für weitere 30 Minuten. Der Transfer konnte auch am Tag durchgeführt werden, indem die *Tank-Blot*-Kammer zusätzlich in eine Eis-Box gestellt wurde (2 Stunden bei 800mA für die große Kammer oder 600mA für die kleine Kammer).

#### 3.3.1.3 Immundetektion

Der Protein-Transfer wurde nach dem *Western Blot* mit einer Ponceau-S-Färbung (0,1% Ponceau S / 5% Essigsäure / ddH<sub>2</sub>O, Sigma Aldrich) überprüft.

Danach wurde die Membran durch kurzzeitiges Waschen mit ddH<sub>2</sub>O vom Ponceau-Rot befreit und zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen 30 Minuten in 5% *Blotto* (5% Milchpulver/TBST) blockiert. Anschließend wurde die Membran in ein 50ml Sarstedt-Röhrchen mit der proteinbeschichteten Seite nach innen überführt und entweder 2 Stunden bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht mit dem gewünschten Primärantikörper in 5% *Blotto* auf einem Rollkippschüttler inkubiert. Die Primärantikörperlösung wurde mehrfach verwendet und bei -20°C gelagert. Als nächster Schritt erfolgte das dreimalige Waschen der Membran in TBST für jeweils 10 Minuten. Im Anschluss wurde der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper (*horseradish peroxidase* = Meerrettichperoxidase) für 1 Stunde mit der Nitrocellulosemembran in 5% *Blotto* inkubiert. Schließlich wurde die Membran noch dreimal in TBST für 10 Minuten gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran mit 500µl *ECL Advanced* bedeckt (*ECL Advanced Western Blotting Detection Systems*, Amersham), welches die HRP-katalysierte Chemolumineszenzreaktion aktiviert. Dabei kommt es zu einer Oxidation des Luminols durch die Meerrettichperoxidase und das angeregte Substrat setzt die Aktivierungsenergie in Form von Licht frei. So konnten die markierten Proteine durch eine Chemolumineszenzkamera (LAS-3000mini, Fujifilm) mit der ImageReader LAS-3000 Software visualisiert und fotografiert werden.

#### 3.3.1.4 Strippen

Sollte ein *Western Blot* mit unterschiedlichen Antikörpern markiert werden, musste zwischen den einzelnen Immundetektionen der alte Antikörper durch *Strippen* entfernt werden. Hierzu wurde die Membran bei 72°C in einem Wärmeschrank mit einem speziellen *Stripping*-Puffer für 30 Minuten inkubiert. Durch die Wärme und die im Puffer enthaltenen Detergenzien



sowie Reduktionsmittel konnten die Antikörper entfernt werden, wohingegen die Proteine weitestgehend erhalten blieben. Jedoch musste der *Western Blot* vor einer Wiederverwendung noch etwa 2 Stunden in TBST bei Raumtemperatur gewaschen werden, um den *Stripping*-Puffer vollständig von der Membran zu entfernen. Danach konnte eine weitere Immundetektion beginnend mit der Blockierung in 5% Blotto durchgeführt werden.

#### 3.3.2 Ko-Immunpräzipitation

Zur Untersuchung einer direkten Interaktion zweier Proteine wurde die Methode der Ko-Immunpräzipitation verwendet. Dafür wurde ein Zelllysat hergestellt und mithilfe eines proteinspezifischen Antikörpers sowie der Protein-G-Sepharose (*Immobilized Protein G*, Pierce) das gesuchte Protein aus dem Lysat gefällt. Findet eine Protein-Protein-Interaktion zwischen den zwei gesuchten Proteinen statt, so kann man auch das andere Proteine im *Western Blot* des Präzipitats detektieren.

Dazu wurde ein Zellpellet hergestellt (siehe 3.2.8), jedoch wurde die Zentrifugation nur bei 3.000rpm durchgeführt. Dann wurde zum Pellet 500 µl EBC-Puffer/Complete gegeben und das Pellet zweimal 10sec mit einem Ultraschallstab lysiert. Anschließend lagerten die Proben 30min auf Eis, bevor sie nochmals zweimalig mit dem Ultraschallstab für 10 Sekunden lysiert wurden. Es folgte ein Zentrifugationsschritt zur Sedimentierung des Zelldebris bei 13.000rpm und 4°C für 10 Minuten. Daraufhin wurden 100µl des Lysats mit 100µl 2xLaemmli-Puffer für 20 Minuten bei 60°C denaturiert, um das Totallysat für die spätere *SDS-Page* vorzubereiten. Die restlichen 400µl Totallysat wurden mit 1,5µl des Antikörpers auf das vorbereitete G-Sepharose-Pellet gegeben und für 4 Stunden bei 4°C über Kopf geschüttelt. Die G-Sepharose wurde vorbereitet, indem sie zweimal mit reinem EBC-Puffer gewaschen wurde. Dazu wurde die G-Sepharose bei 3.200rpm für 2 Minuten pelletiert, der Überstand abgenommen und das Pellet mit 500µl EBC-Puffer versetzt. Nachfolgend wurde das Eppendorf-Gefäß über Kopf geschüttelt und erneut pelletiert.

Nach der Präzipitation des gesuchten Proteins wurde das Präzipitat noch dreimal mit EBC-Puffer nach dem folgenden Schema gewaschen: erst wurde das Präzipitat bei 3200rpm für 2min pelletiert, der Überstand abgenommen und das Pellet mit 500µl EBC-Puffer versetzt. Danach wurde das Präzipitat 5 Minuten bei Raumtemperatur über Kopf geschüttelt und nochmals pelletiert.

Zum Schluß wurde zum Präzipitat 50µl 1xLaemmli-Puffer gegeben und das ganze 20 Minuten bei 60°C auf einem Thermoschüttler inkubiert, so dass sich die präzipitierten Proteine im Puffer eluieren ließen.

### 3.4 Lichtmikroskopische Methoden

#### 3.4.1 Axiovert 200M Mikroskop

Zur Betrachtung und Aufnahme von fluoreszenzgefärbten Proben am Lichtmikroskop wurde das Axiovert 200M (Carl Zeiss) verwendet, welches über die Software Axio Vision 4.1 beta Version 08.2003 gesteuert wurde. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit den Programmen: Axio Vision Viewer LE Rel. 4.1 und Adobe Photoshop CS2.

Je nach Färbung der Präparate wurden verschiedene Filter verwendet, um die Fluoreszenz sichtbar zu machen. Für die Dapi-Fluoreszenz (blau) wurden die Filter G365 und BP445/59 verwendet, wohingegen für den Alexa Fluor 594 (rot) die Filter BP565/30 und BP620/60 und für den Kanal Alexa Fluor 488 (grün) die Filter BP485/20 und BP515-565 verwendet wurden. Die Lagerung der Präparate erfolgte bei 4°C im Dunkeln.

Als Hilfe wurde ein Apoptom verwendet, welches optische Schnitte durch die Probe legen kann, indem eine Gitterstruktur in die Ebene des Leuchtfeldes projiziert wird. Durch das Scannen der Probe mit Gitterstruktur in drei Schritten und Verschiebung der Gitter, konnte ein digitales Bild mit einem optischen Schnitt durch die Zelle berechnet werden.

Zusätzlich wurden einzelne Färbungen am konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Konfokale LSM Olympus IX81, Fluoview FV100) der Arbeitsgruppe Gilberger am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg ausgewertet.

#### 3.4.2 Direkte Immunfluoreszenzmikroskopie

Bei der direkten Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen mit Plasmiden transfiziert (3.2.6), welche ein fluoreszierendes Protein enthielten. Anschließend wurden die Zellen fixiert (3.2.14) und konnten direkt mit Mowiol/Dabco/Dapi auf Objektträgern eingedeckelt werden.

Bei den fluoreszierenden Proteinen handelte es sich um GFP, dsRed und Dapi. Das Protein GFP stammt aus der Qualle *Aequorea victoria* und wird durch blaues und ultraviolettes Licht angeregt. Das Protein dsRed wurde in der Koralle *Discosoma* entdeckt und fluoresziert rötlich. DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid) wurde zur DNA-Färbung eingesetzt, da sich die Verbindung AT-reichen Regionen der DNA anlagert. Bei Anregung mit ultraviolettem Licht fluoresziert DAPI im sichtbaren Bereich mit blauer Farbe.

#### 3.4.3 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

Bei der indirekten Immunfluoreszenz wird das gesuchte Protein mit einem spezifischen Primärantikörper markiert. Daran wird ein Fluorophor-gekoppelter Sekundärantikörper gebunden,

der durch Anregung mit spezifischen Wellenlänge ein fluoreszierendes Signal aussendet. Dadurch kommt es im Vergleich zur direkten Immunfluoreszenz zu einer Verstärkung des Signals.

Die Zellen wurden zuvor auf Deckgläsern ausgesät (siehe 3.2.3). Nachdem die Zellen die gewünschte Konfluenz erreicht hatten, wurden sie fixiert (siehe 3.2.14).

Zuerst wurden die fixierten Zellen 5 Minuten mit 0,2% Saponin in PBS permeabilisiert, um die Plasmamembran der Zellen für die Antikörper durchlässig zu machen. Saponine sind Glykoside von Steroiden und finden sich unter anderem in der indischen Waschnuss. Sie verursachen eine reversible Permeabilisierung, so dass alle weiteren Schritte ebenfalls in 0,2% Saponin durchgeführt werden müssen. Dann wurden alle freien Aldehydgruppen 10 Minuten mit 0,12% Glycin in PBS + 0,2% Saponin abgesättigt und es folgte ein Blockierungsschritt (15min) mit Rinderserumalbumin-Lösung (3% BSA in PBS + 0,2% Saponin), um unspezifische Bindungen zu verhindern.

Die immunologische Färbung wurde in einer feuchten Kammer im Dunkeln durchgeführt. Hierfür wurden Tropfen mit Antikörperlösung (Antikörper in 3% BSA in PBS + 0,2% Saponin) auf einem Parafilm-Stück vorbereitet und die Deckgläser aus den Zellkulturschalen mit den Zellen nach unten auf die Tropfen gelegt. Beide Antikörper wurden jeweils eine Stunde inkubiert. Zwischen und nach den Inkubationsschritten mit den beiden Antikörpern wurden die Deckgläser viermal in 0,2% Saponin in PBS gewaschen. Zum Schluss wurden die Deckgläser dann noch in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mit Mowiol/Dabco/Dapi auf Objektträgern eingedeckelt. DABCO soll das Ausbleichen der Proben verhindern und DAPI führt zu einer blauen Kernfärbung.

#### **3.4.4 Immunhistologie**

Die histologischen Untersuchungen wurden in Kooperation mit Catherine Meyer-Schwesinger (III. Medizinische Klinik und Poliklinik, Forschung Nephrologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) durchgeführt.

Dazu wurden bereits vorhandene Paraffinschnitte von WT- und LIMP2-defizienten Mäusen verwendet. Diese wurden zuerst dreimal 5 Minuten mit Xylol entparafiniert. Dann wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 95%, 90% und 75%) und zum Schluss in ddH<sub>2</sub>O jeweils zweimal 5 Minuten rehydriert.

Danach wurde eine Epitop-Demaskierung mit unterschiedlichen Puffern durchgeführt, um eine optimale Antikörperbindung zu ermöglichen. Hierzu wurden vier unterschiedliche Methoden verwendet. Die Proben wurden

- in Citratpuffer (pH 6,1, 35min) gekocht und danach auf Eiswasser (10min) abgekühlt.
- bei 37°C mit Proteinase 24 (5ug/ml, 15min) behandelt.

- in DACO-Puffer (pH 9,0, 15min) im Wasserdampf inkubiert und abgekühlt (15min).  
- in 0,05% Citraconsäureanhydrid-Dampf (pH 7,4, 30min) inkubiert und abgekühlt (15min).  
Anschließend wurden die Schnitte in feuchten Kammern gelagert und weiter behandelt. Zuerst wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen und in 5% Ziegenserum (GS) in PBS für 30 Minuten blockiert. Danach erfolgte ein drei weitere Waschschrift mit PBS. Der erste Antikörper gegen LIMP2 (1:250, 1:500 und 1:1000 in 5% GS/PBS) oder gegen den (Pro-) Reninrezeptor (1:250 und 1:1000 in 5% GS/PBS) wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Schnitte wiederum dreimal mit PBS gewaschen und es folgte die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper anti-Rabbit (1:400 in 5% GS/PBS) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden dreimal in PBS gewaschen, bevor sie weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Alkalischer Phosphatase inkubiert wurden (Streptavidin-AP Komplex 1:100, ABC Kit Vektor). Es folgte ein drei letzte Waschschrift mit PBS. Anschließend wurden die Schnitte mit Neufuchsin, einem Substrat der Alkalischen Phosphatase gefärbt, bis das Signal im Schnitt gut sichtbar wurde. Dann wurden die Schnitte in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und eine Kernfärbung mit Hämalaun für 3 Minuten durchgeführt. Darauf folgte ein erneutes Waschen der Schnitte mit ddH<sub>2</sub>O und eine Stabilisierung der Färbung mit HCl-EtOH. Schlussendlich wurden die Schnitte ein letztes Mal in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und eingedeckelt.

### 3.5 Elektronenmikroskopische Methoden

Alle elektronenmikroskopischen Methoden wurden mit Unterstützung von Viola Oorschot im Labor von Judith Klumperman am UMC in Utrecht (Universtair Medisch Center Utrecht, Niederlande) erlernt und durchgeführt. Dabei galten die Protokolle von Jan Slot als Orientierung (Slot et al. 2007).

#### 3.5.1 Fixierung der Zellen

Die gewünschten Zellen wurden auf 6cm Zellkulturschalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von über 80% wachsen gelassen. Eine Fixierung der Zellen erfolgte um ihre strukturelle Integrität während der nachfolgenden aufwändigen Prozedur zu erhalten. Hierzu wurde eine chemische Fixierung entweder mit 4% PFA in 0,1M Phosphatpuffer oder mit 2% PFA und 0,2% GA in 0,1M Phosphatpuffer (PB) durchgeführt.

Für eine Fixierung mit 4% PFA/PB wurde zum vorhandenen Zellkulturmedium das gleiche Volumen an Fixierlösung gegeben (Endkonzentration 2% PFA). Nach 5 Minuten wurde das Medium abgenommen und durch 4% PFA/PB ersetzt. Die Fixierung erfolgte über Nacht bei 4°C. Danach wurden die Zellen in 1% PFA/PB überführt und bei 4°C gelagert oder mit Parafilm verschlossen und verschickt.

Für eine Fixierung mit 2% PFA und 0,2% GA in PB wurde zum vorhandenen Zellkulturmedium das gleiche Volumen an doppeltkonzentrierter Fixierlösung gegeben (Endkonzentration 2% PFA und 0,2% GA in PB). Nach 5 Minuten wurde das Medium abgenommen und durch 2% PFA und 0,2% GA in PB ersetzt. Die Fixierung erfolgte entweder 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Danach wurden die Zellen in 1% PFA/PB überführt und bei 4°C gelagert oder mit Parafilm verschlossen und verschickt.

#### 3.5.2 Einbettung der Proben

Zur Einbettung der Zellen wurde das Fixativ entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden sie 5 Minuten mit 0,15% Glycin/PBS inkubiert. Anschließend wurden sie nochmals mit PBS gewaschen, bevor die Zellen mit 1,5ml 1% Gelatine bedeckt und mit einem Zellschaber abgekratzt wurden. Die Suspension wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt, zentrifugiert und der Gelatine-Überstand verworfen. Das Pellet wurde durch leichtes Rütteln gelockert und vorsichtig in 500µl 12% Gelatine, welche zuvor auf 37°C erwärmt wurde, resuspendiert und 30 Minuten bei 37°C infundiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und der Überstand bis auf etwa 100µl verworfen. Das Eppendorf-Gefäß wurde 30 Minuten auf Eis gelagert, so dass die Gelatine auskristallisieren konnte. Danach

wurde die Spitze des Eppendorf-Gefäßes mit dem Zellpellet durch eine Rasierklinge abgetrennt und in eiskalte 2,3M Saccharose überführt. Nach ein paar Minuten ließ sich das Zellpellet von der Plastikspitze trennen. Zum Schluss wurde das Zellpellet im 4°C Raum unter einem Mikroskop in etwa 16 kleine Blöcke mit einer doppelseitigen Rasierklinge geschnitten. Die Blöcke wurden in 2,3M Saccharose überführt und über Nacht bei 4°C über Kopf rotiert.

Am nächsten Tag wurden die Zellblöcke auf kleinen Nägeln aufgebockt, dies wurde ebenfalls im 4°C Raum unter dem Mikroskop durchgeführt. Es wurden Nägel aus Kupfer und Aluminium verwendet, welche zuvor aufgeraut und von Metallrückständen befreit worden sind. Des Weiteren wurden sie farblich markiert, um die unterschiedlichen Proben später wieder identifizieren zu können. Die Blöcke wurden aus der Saccharose-Lösung gefischt und auf die flachen Köpfe der Nägel gelegt. Im Weiteren wurde die überschüssige Saccharose durch Filterpapier entfernt und die Blöcke parallel zu einer farblichen Markierung ausgerichtet. Abschließend wurden die Nägel mit der aufgebockten Probe in flüssigem Stickstoff eingefroren.

#### **3.5.3 Herstellung von *grids* (Formvar carbonummantelt)**

Zuerst wurden die runden Kupfergitter (*grids*) mit Aceton gewaschen und auf Filterpapier getrocknet. In der Zwischenzeit wurden Objektträger in mehreren Reinigungsschritten von jeglichen Rückständen befreit und die Formvar-Lösung in eine spezielle Gießvorrichtung gegossen. Der Objektträger wurde in die Gießvorrichtung gestellt, so dass er zu zwei Dritteln mit der Formvar-Lösung bedeckt war. Dann wurde die Formvar-Lösung langsam abgelassen und in einem kleinen Erlenmeyer-Kolben unterhalb der Gießvorrichtung aufgefangen und wiederverwendet. Die Abflussgeschwindigkeit ist entscheidend für die Dicke des Formvar-Films auf dem Objektträger. Die Kanten des Formvar-Films wurden mit einer Rasierklinge geschärft. Im Folgenden wurde ein großes Becherglas mit destilliertem Wasser vorbereitet. Durch Anhauchen des Formvar-Films und langsames senkrechtes Absenken in das ddH<sub>2</sub>O konnte der Formvar-Film vom Objektträger gelöst werden und auf der Oberfläche schwimmen. Nun konnten vorsichtig die gesäuberten *grids* mit der spiegelnden Seite nach oben mit einer Pinzette auf dem schwimmenden Formvar-Film platziert werden. Nachdem der Formvar-Film zu etwa zwei Dritteln mit *grids* belegt worden war, konnte er sich an einen beklebten Objektträger anlagern, der an der leeren Seite des Formvar-Films in das Wasserbad eingeführt wurde. Die bedeckten Objektträger wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Am nächsten Tag wurden die *grids* noch mit einem Carbonmantel überzogen und in einer staubfreien Box bei Raumtemperatur bis zu einem Monat gelagert.

#### 3.5.4 Herstellung von Glasmessern

Die Herstellung von Glasmessern für die Elektronenmikroskopie wurden mit Tokuyasus balancierter Brechmethode durchgeführt (Tokuyasu et al. 1959). Dazu wurde das Gerät Leica Knife Maker (Model KMR3, Leica) verwendet. Die Glasmesser entstanden durch das Brechen eines langen Glasstabs in seine Hälften bei gleichmäßig angewandtem Druck. Die erhaltenen Hälften wurden wiederum in ihre Hälften gebrochen, bis man kleine quadratische Glasstücke erhielt. Diese wurden dann entlang ihrer Diagonalen in einzelne Dreiecke gebrochen, dabei musste der Bruch langsam erfolgen, da zu schnelles Brechen des Glases die Schärfe des Messers beeinträchtigen kann.

#### 3.5.5 Trimmen des Zellblocks

Bevor man die aufgebockten Zellblöcke zum Schneiden von Ultradünnschnitten verwenden konnte, mussten diese erst vorbereitet werden. Dazu wurde der Block mit der langen Seite horizontal im Ultra-Kryomikrotom (Leica Ultracut T/FCS) bei  $-100^{\circ}\text{C}$  befestigt. Dann wurden Glasmesser und Block optimal zueinander ausgerichtet und angenähert. Im folgenden wurde zuerst die Oberfläche durch Semidünnschnitte von 200nm mit einer Geschwindigkeit von 100mm pro Sekunde geglättet. Es erfolgte eine Aufnahme von einzelnen Schnitten in einem Tropfen 2,3M Saccharose durch eine Metallöse. Im optimalen Fall wurde der Schnitt durch die Öse in der Kühlkammer aufgenommen, bevor diese aufgehört hatte zu rauchen und bevor der Tropfen Saccharose gefroren war. Der aufgenommene Schnitt wurde auf einem einfachen Objektträger platziert, mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen, mit Tolouidinblau gefärbt, nochmals mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und auf einer Heizplatte getrocknet. Anschließend konnte unter einem Lichtmikroskop der Block auf seine Zelldichte beurteilt werden.

Im Weiteren wurde nun mit der Kante des Glasmessers ein kleiner rechteckiger Zellblock aus dem großen Block herausgearbeitet, der für die späteren Ultradünnschnitte verwendet wurde. Der Block sollte etwa 1,5mal länger als breit sein. Dazu wurde die Kante des Messers dem Block optimal angenähert und die Probe bis zu einer Tiefe von 50 $\mu\text{m}$  getrimmt. Anschließend wurde der Block um  $180^{\circ}$  gedreht und auf der anderen Seite 50 $\mu\text{m}$  tief geschnitten. Nach dem Erhalt der zwei Seiten des Blocks wurde dieser wieder  $90^{\circ}$  zurück gedreht, um den Boden des Blocks zu schneiden. Am Schluss erfolgt der kritischste Part des Trimmens: das Kopfende.

### 3.5.6 Schneiden von Ultradünnschnitten

Der optimale Schnitt ist perfekt flach, gleichmäßig dick, zeigt keine Messerspuren und keine Kompression. Um möglichst nahe an das Idealbild heranzukommen, musste das Messer optimal zum getrimmten Block ausgerichtet sein. Das Schneiden erfolgte bei 1,0mm/s und 70nm Dicke für 4% PFA fixierte Proben und 0,4mm/s und 65nm Dicke für 2% PFA / 0,2% GA fixierte Proben. Es wurde versucht *ribbons* (3-5 aneinandergereihte Schnitte) herzustellen. Die Dicke eines Schnitts lässt sich an seiner Farbe beurteilen. Optimal ist eine goldene Farbe, jedoch sind die Schnitte, die mit Glasmessern produziert werden, meist dicker und zeigen häufiger unterschiedliche Farben. Um einen möglichst flachen Schnitt zu erhalten, wurde der Schnitt mithilfe eines Binokulars und eines dünnen Haares, welches an einem Holzstäbchen befestigt war, auf dem Messer vorsichtig in die Länge gezogen und gerade ausgerichtet. Sollte der Schnitt festkleben oder sich vom Messer ablösen, konnte der Schnitt mit dem Haar auch gelöst oder auf das Glas gedrückt werden.

Ein ganz entscheidender Punkt war die Aufnahme des Schnittes mit einer Metallöse und einer spezifischen *Pick-up*-Lösung (2,3M Saccharose in PB + 2% Methylcellulose in ddH<sub>2</sub>O). Dazu wurden die Schnitte von der Messerkante nach distal bewegt. Dann wurde die Öse mit dem Tropfen *Pick-up*-Lösung in die Kryokammer gebracht, sobald die Ecke der Öse anfangen zu gefrieren, erfolgte die Aufnahme der Schnitte. Dieser Zeitpunkt trat deutlich schneller ein als bei reiner 2,3M Saccharose. Wurden die Schnitte zu früh aufgenommen, so dehnten sie sich aus. Erfolgte die Aufnahme zu spät, waren die Schnitte komprimiert und faltig. Die aufgenommenen Schnitte wurden auf den carbonbementelten *grids* zum liegen gebracht. So konnten sie einige Wochen bei 4°C geschützt in einer Box gelagert werden.

### 3.5.7 Immunogoldfärbung

Damit man spezifische Proteine in der Elektronenmikroskopie sichtbar machen kann, wird eine Immunogoldfärbung durchgeführt. Hierbei wird das gewünschte Proteine mit einem Antikörper markiert und in einem zweiten Schritt mit kleinen elektronendichten Goldpartikeln gekoppelt, welche eine Größe von 10, 15 oder 20nm haben.

Zur Vorbereitung der Immunofärbung der *grids* wurde ein Parafilm-Streifen auf einer dunklen Glasfläche durch ein wenig Wasser befestigt und die Pufferlösungen in Reihen von Tropfen auf dem Parafilm vorbereitet.

Die *grids* mussten zuerst mit den Schnitten nach unten in 2% Gelatine/PB gelegt und durch eine Lampe erwärmt werden, bis die Gelatine flüssig wurde. Dann wurden die Gelatineschalen mit den *grids* 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Färbung der *grids* erfolgte



mit den Schnitten nach unten auf Tropfen mit spezifischem Puffer. Dazu wurden die Schnitte auf 0,15% Glycin/PBS dreimal 2 Minuten demaskiert und auf 1% BSA/PBS für 5 min blockiert. Dann erfolgte die Inkubation der *grids* auf 10µl Tropfen mit Primärantikörper in 1% BSA/PBS für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Damit die Schnitte nicht austrocknen konnten, wurden sie in einer feuchten Kammer geschützt inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte viermal auf 0,1% BSA/PBS gewaschen. Sollte der Primärantikörper eine schwache Bindekapazität zu Protein A aufweisen, folgte ein Zwischenschritt mit der Inkubation der *grids* auf einem Sekundärantikörper und folgendem Waschen mit 0,1% BSA/PBS. Danach wurden die *grids* auf 10µl Protein-A-Gold in 1% BSA/PBS (1:70) für 20 Minuten inkubiert und daraufhin fünfmal mit reinem PBS gewaschen. Zum Schluss wurde die Immunoreaktion 5 Minuten auf 1% GA/PBS stabilisiert. Sollte eine Doppelfärbung durchgeführt werden, wurde erneut bei der Demaskierung der Proben gestartet und die Immunoreaktion ein zweites Mal mit einer veränderten Goldgröße durchgeführt.

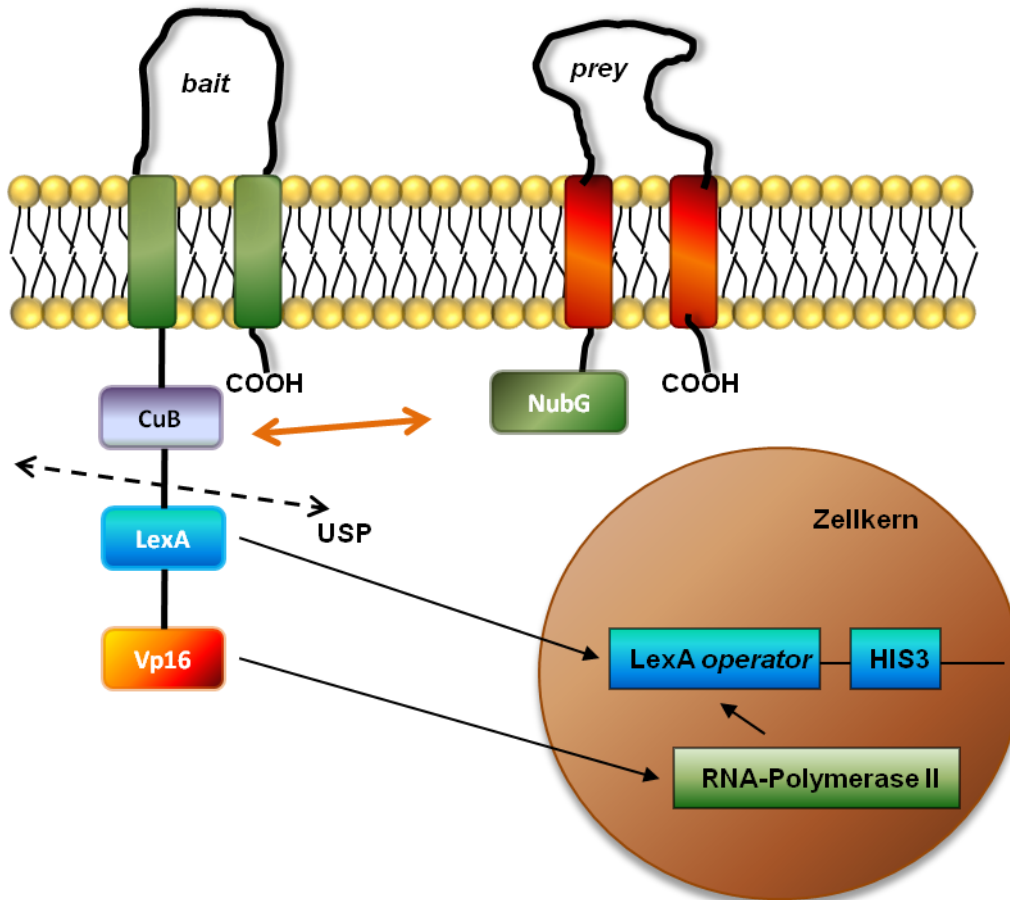
Zur Kontrastierung wurden die *grids* erst sechsmal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Dann wurden sie 5min auf 2% Uranylalat/Azetat (ph 7) inkubiert, um die Membranlipide zu stabilisieren. Anschließend folgte nach kurzem Waschen auf ddH<sub>2</sub>O die Kontrastierung mit Methylcellulose/Uranylacetat für 5-10 Minuten. Zum Schluß wurden die *grids* mit einer Metallöse aus der Methylcellulose gefischt und auf Filterpapier in einem Winkel von 45° abgetropft. Die *grids* wurden bei Raumtemperatur getrocknet und in kleine Boxen sortiert.

#### **3.5.8 Elektronenmikroskopie**

Zum Betrachten der immunogold-gefärbten Ultra-Kryodünnschnitte wurde das Transmissions-Elektronenmikroskop Tecnai T12 (FEI) verwendet. Dabei wurde eine Hochspannung von 80kV angelegt. Es konnten sowohl Bilder mit einer digitalen Kamera (Megaview3, Olympus Soft Imaging Systems), als auch mit einer Negativplatten-Kamera geschossen werden.

### 3.6 Hefesysteme

#### 3.6.1 *Yeast Two-Hybrid Split-Ubiquitin System*



**Abb. 3.5 Schematische Darstellung des Yeast Two-Hybrid Split-Ubiquitin Systems**

Beide Proteine (*bait* und *prey*) tragen in ihrem *tag* jeweils die Hälfte eines Ubiquitin-Proteins (CuB und NubG). Bei NubG handelt es sich um eine mutierte Form, die nur noch ein ganzes Ubiquitin-Protein bildet, wenn sie in starke räumliche Nähe zu CuB kommt, d.h. wenn *bait* und *prey* interagieren. Das gebildete Ubiquitin wird durch die Ubiquitin-spezifische Protease (USP) erkannt und es kommt zu einer Abspaltung der Transkriptionsfaktoren Vp16 und LexA. Diese können daraufhin in den Zellkern translozieren und das Ablesen eines Selektionsgens ermöglichen.

Das *Yeast Two-Hybrid Split-Ubiquitin System* wird genutzt, um mögliche Protein-Protein-Interaktionspartner zu identifizieren. Als *bait* und *prey* können beliebige Proteine eingesetzt werden, deren Interaktion untersucht werden soll. Dabei wird das *bait* Protein mit der C-terminalen Hälfte (CuB) eines Ubiquitins sowie den künstlichen Transkriptionsfaktoren LexA und Vp16 fusioniert. Als *prey* Protein kann entweder eine ganze Datenbank oder ein spezifisches Protein verwendet werden, welches mit der N-terminalen Hälfte eines Ubiquitins (NubG) fusioniert ist. Dabei ist das NubG mutiert, so dass es nur bei enger räumliche Nähe mit CuB zu einem vollen Ubiquitin reassoziieren kann. Wenn also zwei Proteine interagieren, so kommen ihre C- und N-terminalen Ubiquitin-Hälften in Kontakt. Das nun komplette Ubiquitin wird durch die Ubiquitin-spezifische Protease (USP) erkannt und die

Transkriptionsfaktoren LexA und Vp16 werden abgespalten und ins Zytosol freigesetzt. Dann können sie in den Kern translozieren und das Selektionsgen aktivieren, so dass die Hefen auf Selektionsmedium ohne die Aminosäure Histidin wachsen können (Fields et al. 1989; Johnsson et al. 1994).

#### 3.6.2 Herstellung kompetenter Hefen

Mithilfe einer autoklavierten Glaspipette wurden Hefezellen aus einem Zellaliquot entnommen, auf einer YPAD-Platte ausgestrichen und bei 30°C für 2 Tage inkubiert. Die längerfristige Lagerung der kompetenten Hefen erfolgte bei -80°C.

Anschließend wurden von der Agarplatte Klone mit einer Glaspipette gepickt, in einem YPAD-haltigen Erlenmeyerkolben angeimpft und über Nacht bei 30°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde die Zelldichte der Vorkultur bestimmt. Dazu wurde die Extinktion der Probe bei 600nm ( $OD_{600}$ ) im Vergleich zu reinem Medium gemessen. Dann wurde das benötigte Volumen der Hefesuspension berechnet, mit dem eine Kultur von 100ml YPAD-Medium mit einer  $OD_{600}$  von 0,4 angeimpft werden konnte (Rechnung: benötigtes Vorkulturvolumen =  $(100\text{ml} \times 0,4) / (\text{bestimmte unverdünnte } OD_{600})$ ). Die Zellen wurden 2-4 Stunden bei 30°C auf dem Schüttler inkubiert, bis sie eine  $OD_{600}$  von 0,6 bis 0,8 erreicht haben. Die Ernte der Zellen in 50ml Sarstedt-Röhrchen erfolgte durch zweizeitiges Pelletieren in 2min bei 3200rpm und 4°C sowie Verwerfen des Überstands. Daraufhin wurde das Pellet mit 10ml ddH<sub>2</sub>O resuspendiert, das Sarstedt-Röhrchen mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun wurde das Pellet mit 10ml LiSorb-Puffer resuspendiert, erneut zentrifugiert und wiederum der Überstand verworfen. Daraufhin wurde das Pellet in 600µl LiSorb resuspendiert und die Suspension mit 60µl denaturierter Lachs-Sperma-DNA inkubiert. Die DNA wurde zuvor 10min bei 95°C auf einem Hitzeblock denaturiert und danach direkt auf Eis gelagert. Zum Schluss wurde die Zellsuspension in Eppendorf-Gefäßen à 50µl aliquotiert und direkt auf Trockeneis eingefroren.

#### 3.6.3 Transformation von Hefen

Die kompetenten Hefezellen wurden auf Eis aufgetaut. Danach wurde zu 25µl Hefesuspension 2µl des gewünschten Plasmids sowie 300µl LiPEG-Puffer pipettiert. Das Gemisch wurde geschüttelt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Hefen 15 Minuten bei 42°C im Wasserbad gelagert. Diese Temperatur führt bei den Hefen bereits zu einem Hitzeschock, was die Aufnahme des Plasmids erleichtert. Danach wurden die Hefen bei 3000rpm 1 Minute herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde

verworfen und das Pellet in 75µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert, auf SC-Platten mit der entsprechenden Selektion ausplattiert und bei 30°C für 2-3 Tage inkubiert.

### 3.6.4 Herstellung von Hefelysaten

Die Zellen wurden, wie in 3.6.2 beschrieben, angeimpft. Dabei wurde das jeweils spezifische Selektionsmedium verwendet und die Hefen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8-1,0 inkubiert. Auch das Pelletieren der Hefezellen und das Waschen mit ddH<sub>2</sub>O erfolgte identisch wie in 3.6.2. Anschließend wurde das Pellet jedoch mit 750µl IP-Puffer/Complete versetzt und zusätzlich wurden Glasperlen bis knapp unter den Flüssigkeitsspiegel in das 50ml Sarstedt-Röhrchen gegeben. Das Sarstedt-Röhrchen wurde sechsmal für eine Minute im Vortexer geschüttelt und zwischendurch immer einminütig auf Eis gelagert. Durch das Vortexen mit den Glasperlen wurden die Hefezellen lysiert. Im Weiteren wurden die Röhrchen 2 Minuten bei 3200rpm und 4°C zentrifugiert und das Pellet durch die Perlen hindurch resuspendiert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Dann wurden die Perlen mit weiteren 500µl IP-Puffer/Complete gewaschen und dieser Überstand ebenfalls in das gleiche Eppendorf-Gefäß überführt, welches dann 5 Minuten bei 5000rpm und 4°C zentrifugiert wurde. Der Überstand enthielt das Hefelysat. Das abzentrifugierte Pellet mit Debris und Glasperlen wurde verworfen. Das Lysat wurde bei -20°C gelagert und konnte entweder direkt als Totallysat für die SDS-Probenvorbereitung verwendet werden oder es folgt eine Membranpräparation.

### 3.6.5 Verdünnungsreihe

Um eine Interaktion zwischen zwei Proteinen zu überprüfen werden diese als *bait* und *prey* in zwei aufeinander folgenden Schritten in Hefen transformiert. Durch die Transformation des *bait*-tragenden Plasmids können die Hefen bereits auf Leucin-freiem Medium wachsen. Durch die Expression des *prey* Proteins wachsen die Hefen zusätzlich auch auf Trypsin-freiem Medium. Deshalb wurde eine Vorkultur der Klone, die beide Proteine enthalten, in SC-Leu-Trp-haltigem Medium über Nacht bei 30°C auf einem Schüttler angesetzt. Am folgenden Morgen wurde die OD<sub>600</sub> der Vorkulturen bestimmt und berechnet, wie viele µl Hefesuspension in einem Gesamtvolumen von 1ml vorhanden sein müssen, damit alle Proben die gleiche Menge an Hefen aufweisen ( $X \mu\text{l Hefen in } 1\text{ml ddH}_2\text{O} = 1000 / \text{OD}_{600}$  unverdünnt). Dann wurden von der berechneten Ausgangslösung 1:10, 1:100 und 1:1000 Verdünnungen hergestellt. Dabei wurde auf ein regelmäßiges Vortexen zwischen den Verdünnungsschritten geachtet. Zum Schluss wurden je 4µl der Verdünnungsstufen auf Selektions-Agarplatten pipettiert und 2-3 Tage bei 30°C inkubiert.

## 4 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in mehrere Bereiche. Zuerst erfolgte die Identifikation möglicher neuer Interaktionspartner von LIMP2. Danach wurde die gefundene Interaktion in Bezug auf ihre Lokalisation in der Zelle charakterisiert. Des Weiteren wurde die Bindungsstelle der Interaktion gesucht. Zum Schluss wurde die Lokalisation der Interaktion *in vivo* analysiert.

### 4.1 Interaktion zwischen LIMP2 und dem (Pro-)Reninrezeptor (*in vitro*)

#### 4.1.1 *Yeast Two-Hybrid (Y2H)*

Aufgrund des sehr spezifischen Krankheitsbildes der AMRF Syndrom Patienten mit einer solitären Beteiligung von Niere und Gehirn, stellt sich die Frage, wie diese organspezifischen Veränderungen bei einer Mutation des ubiquitär vorkommenden LIMP2 erklärbar sind. Da diese Symptome nicht allein durch eine Fehlsortierung der  $\beta$ -Glukozerebrosidase erklärbar sind, wurde die Hypothese aufgestellt, dass das lysosomale Protein noch andere Interaktionspartner in den beiden befallenen Organen besitzt. Bei einer Mutation von LIMP2 könnte diese hypothetische Interaktion ebenfalls behindert sein, was die Ausfallerscheinungen erklären könnte.

Um mögliche noch nicht veröffentlichte Interaktionspartner von LIMP2 zu identifizieren, wurde ein *Yeast Two-Hybrid Membrane Protein Screen* durchgeführt (siehe Methoden 3.6.1). Dafür wurden NMY51 Hefezellen mit dem *bait* (pTMBV-LIMP2) transformiert und als *prey* wurde eine cDNA Bibliothek verwendet, welche aus zerebralem Material von Mäusen hergestellt worden war. Nach Wachstum auf Selektionsplatten wurden die Klone einzeln aufgenommen, vervielfältigt und sequenziert. Insgesamt wurden 120 Klone untersucht, dabei wurden 57 verschiedene Gene sequenziert, wovon 37 als putative Interaktionspartner infrage kamen (siehe Tabelle 4.1). Insgesamt 16 Klone mussten als falsch positive Kandidaten verworfen werden, da sie entweder zu den mitochondrialen Proteinen zählten oder in eine der veröffentlichten Kategorien falsch positiver Interaktionspartner der Firma MoBiTec fielen (MoBiTec 2010).

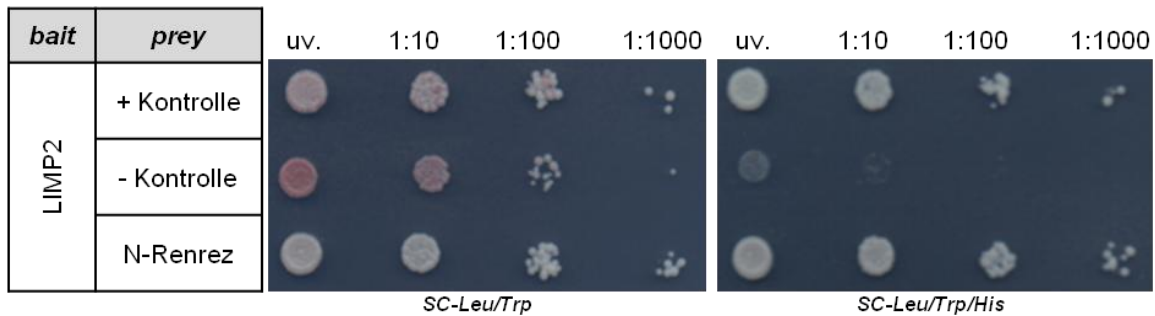
Unter den 37 putativen Kandidaten fanden sich mehrere interessante, mögliche Interaktionspartner. Das Protein ATP6AP2, auch (Pro-)Reninrezeptor genannt, wurde für eine weitere Untersuchung ausgewählt, da übereinstimmende klinische Befunde bei einer Mutation des Rezeptors beschrieben worden waren. Zusätzlich war das Protein primär als akzessorische

Untereinheit der V-ATPase entdeckt worden. Diese organspezifischen Symptome ließen die Hypothese einer möglichen Interaktion zwischen LIMP2 und dem (Pro-)Reninrezeptor zu.

putative Interaktionspartner	Gennummer	Häufigkeit
<i>Adiponectin receptor (Adipor1)</i>	NM_028320	1
<i>AMPA2</i>	NM_001039195	1
<b><i>ATP6AP2/ (pro-)renin receptor</i></b>	<b>NM_027439</b>	<b>1</b>
<i>BCL2/Bnip1</i>	NM_172149	1
<i>Calcyon</i>	NM_026769	3
<i>Camk2n1</i>	NM_025451	1
<i>Chondroitin (Cspg5)</i>	NM_013884	1
<i>Connexin29</i>	NM_080450	1
<i>Cytochrom b-5</i>	NM_025797	1
<i>DC2 Protein (Dc2)</i>	NM_001108566	1
<i>Degs1</i>	NM_007853	1
<i>Dystrobrevin a</i>	NM_207650	1
<i>Emopamil-binding protein</i>	NM_026598	1
<i>Glutathione perox. (Gpx4)</i>	NM_008162	1
<i>Guanine nucleo. binding (Gnao1)</i>	NM_010308	1
<i>iTM2b</i>	NM_008410	1
<i>Laptm4a</i>	NM_008640	6
<i>Laptm4b</i>	NM_008640	1
<i>leptin receptor</i>	AK_154712	1
<i>Myelin basic protein Mbp</i>	NM_001025259	1
<i>Nucleophosmin 1 (Npm1)</i>	NM008722	1
<i>ORM1-like</i>	NM_025661	1
<i>Prostaglandin synthase</i>	NM_008963	1
<i>Reticulon 3</i>	NM_053076.2	3
<i>Ring Finger Protein 41 (RNF41)</i>	NM_005785	1
<i>RNA-Polymerase II subunit 25</i>	NM_029365	1
<i>Sacroglycan, epsilon (Sgce)</i>	NM_011360	1
<i>Septin (Sept4)</i>	NM_011129	1
<i>Solute Carrier family 3</i>	NM_008577	4
<i>SPARC-like 1</i>	BC_003759	1
<i>Stathmin-like 3 (Stmn3)</i>	NM_009133	1
<i>Tetraspanin 6 (Tspan6)</i>	NM_019656	1
<i>Tubulin 1a</i>	NM_011653	1
<i>Unconventional SNARE</i>	NM_029768	1
<i>Vesicle-associated mem. Pro. (Vapb)</i>	NM_019806	1
<i>Vkorc1</i>	NM_178600	1

**Tabelle 4.1** Auswertung des *Yeast Two-Hybrid Membrane Protein Screens*

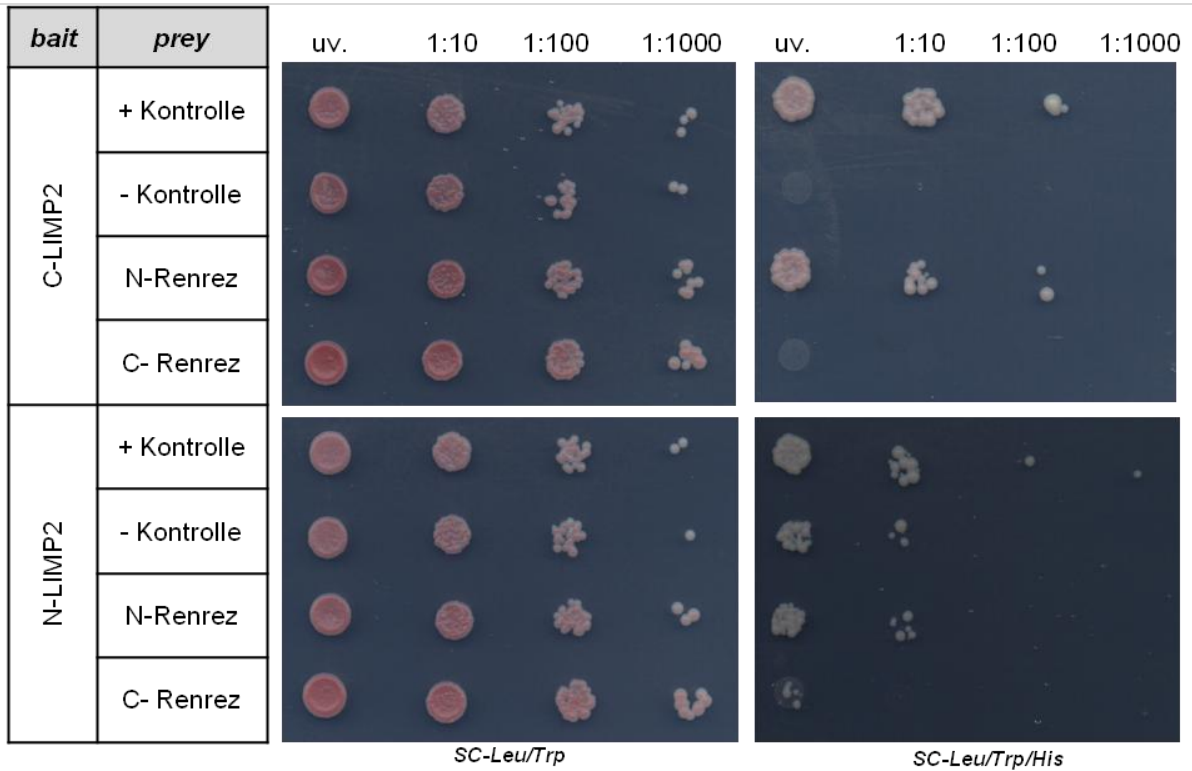
Zur Bestätigung des Screens wurde selektiv der Hefestamm NMY51 mit dem *bait*-Protein LIMP2 (pTMBV-LIMP2) und dem *prey*-Protein (Pro-)Reninrezeptor (pASDL-N-Renrez) transformiert. Die Interaktion wurde auf der Selektionsplatte bestätigt (siehe Abb. 4.1).



**Abb. 4.1 Yeast Two-Hybrid Screen: putative Interaktion zwischen LIMP2 und dem (Pro-)Reninrezeptor**  
 Der Hefestamm NMY51 wurde mit LIMP2 als *bait* Protein (pTMBV-LIMP2) transformiert. Zusätzlich wurden der Reninrezeptor (pASDL-N-Renrez) und die Kontrollplasmide (pAI-ALG5 als Positivkontrolle, pDL2-ALG5 als Negativkontrolle) transformiert. Danach wurden die Hefesuspensionen als Verdünnungsreihe auf Selektions-Agarplatten pipettiert. Die SC-Leu/Trp-Platte diente als Expressionskontrolle beider Plasmide. Ein Wachstum auf der SC-Leu/Trp/His-Platte zeigte eine Interaktion an. Es konnte eine Interaktion von pTMBV-LIMP2 und pASDL-N-Renrez gezeigt werden.

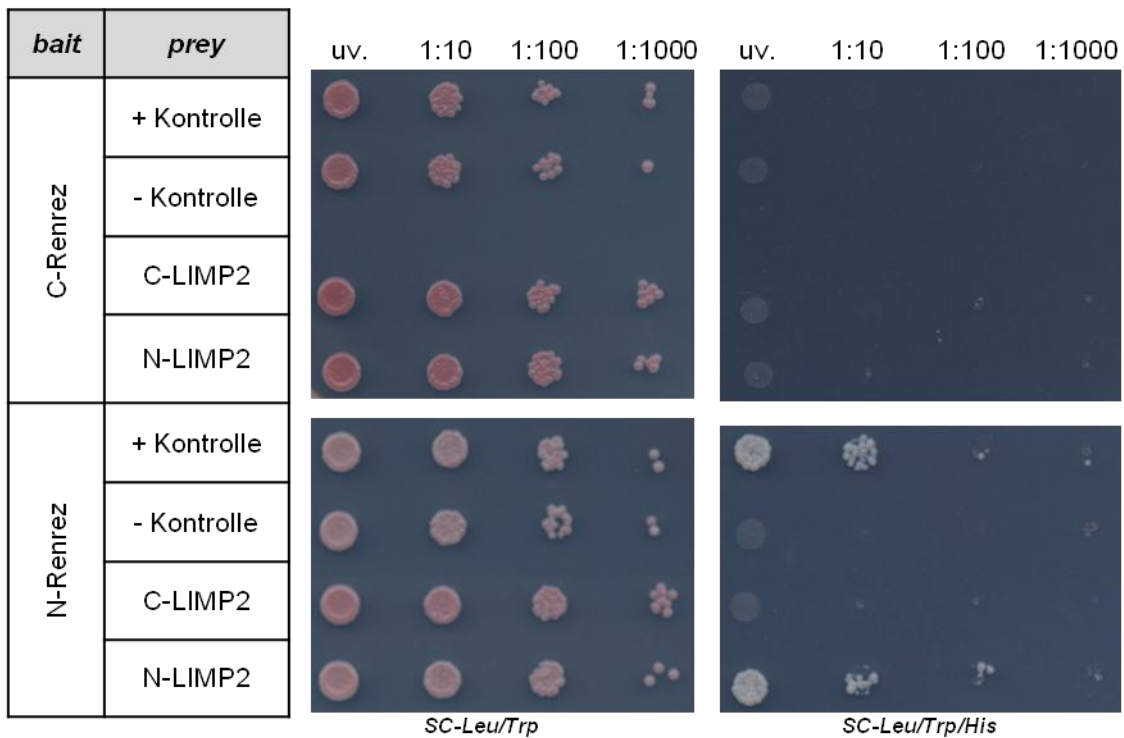
Im Weiteren wurden einzelne Parameter im Y2H-System verändert, um die Interaktion unter unterschiedlichen Bedingungen auf ihre Standhaftigkeit zu prüfen. Dazu wurde wieder LIMP2 als *bait* Protein und der (Pro-)Reninrezeptor als *prey* Protein verwendet. Diesmal wurde LIMP2 jedoch mithilfe des Vektors pBT3 transformiert, dieser trägt einen schwächeren Promotor als der im Screen verwendete Vektor pTMBV. Auch hier wurde die Interaktion von LIMP2 mit dem (Pro-)Reninrezeptor bestätigt. Leider zeigte das Plasmid pBT3-N-LIMP2 eine leichte Selbstaktivierung (siehe Abb. 4.2).

Nachfolgend wurde der (Pro-)Reninrezeptor als *bait*-Protein verwendet und ebenfalls der schwächere Vektor pBT3 benutzt. Als *prey*-Protein wurde LIMP2 eingesetzt. Die Interaktion zwischen dem (Pro-)Reninrezeptor und LIMP2 ließ sich erneut bestätigen. Das Konstrukt pBT3-C-Renrez wurde nicht exprimiert (siehe Abb. 4.3). Deshalb wurde ein Konstrukt pBT3-SUC-Renrez kloniert, das die Sortierung des Proteins verbessern sollte, indem eine hefetytische Typ-I-Signalsequenz im Vektor pBT3-SUC dem Protein vorgeschaltet wurde. Daraufhin zeigte sich nun eine Selbstaktivierung des Proteins, das heißt es kam zu einem Wachstum der transformierten Klone auf Selektionsplatten ohne vorhandene Interaktion (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4.2 Bestätigung der Interaktion zwischen LIMP2 und dem (Pro-)Reninrezeptor**

Der Hefestamm NMY51 wurde mit LIMP2 als *bait* Protein (pBT3-C- oder pBT3-N-LIMP2) transformiert. Zusätzlich wurden der Reninrezeptor (pASDL-C- oder pASDL-N-Renrez) und die Kontrollplasmide (pAI-ALg5 als positiv Kontrolle, pDL2-ALG5 als negativ Kontrolle) transformiert. Die Hefen wurden als Verdünnungsreihe auf Selektions-Agarplatten pipettiert. Die SC-Leu/Trp-Platte diente als Expressionskontrolle. Wachstum auf der SC-Leu/Trp/His-Platte zeigte eine Interaktion an. Es konnte eine Interaktion von pBT3-C-LIMP2 und pASDL-N-Renrez gezeigt werden.

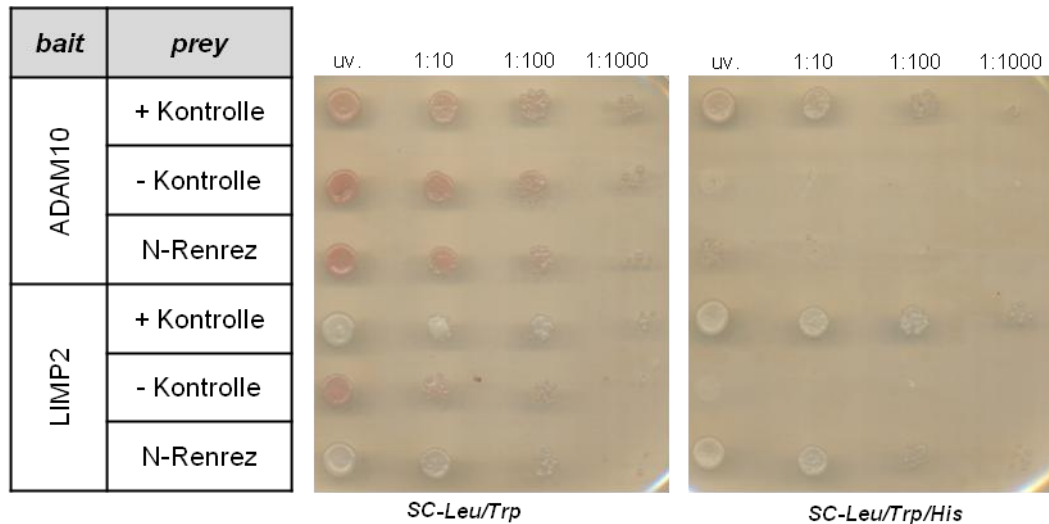


**Abb. 4.3 Bestätigung der Interaktion zwischen dem (Pro-)Reninrezeptor und LIMP2**

Der Hefestamm NMY51 wurde mit dem (Pro-)Reninrezeptor als *bait* Protein (pBT3-C/N-Renrez) transformiert. Zusätzlich wurden LIMP2 (pASDL-C/N-LIMP2) und die Kontrollplasmide transformiert.



Zusätzlich musste die Spezifität der Protein-Protein-Interaktion untersucht werden, da in einem anderen *Y2H Screen* der Arbeitsgruppe Saftig/Schwake der (Pro-)Reninrezeptor ebenfalls als putativer Interaktor des *bait*s ADAM10 gefunden worden war. Dazu wurde als *bait* LIMP2 oder ADAM10 eingesetzt und als *prey* der (Pro-)Reninrezeptor verwendet. Doch zeigte nur die Kombination von LIMP2 und (Pro-)Reninrezeptor eine spezifische Interaktion (siehe Abb. 4.4). Im Screen zur Suche nach Interaktionspartnern von ADAM10 musste der (Pro-)Reninrezeptor als falsch positiver Kandidat verworfen werden.



**Abb. 4.4 Überprüfung einer Interaktion des Reninrezeptors mit LIMP2 und ADAM10**

Der Hefestamm NMY51 wurde mit ADAM10 und LIMP2 als Bait-Protein (pTMBV-ADAM10 und pTMBV-LIMP2) transformiert. Zusätzlich wurde der Reninrezeptor (pASDL-N-Renrez) und die Kontrollplasmide (pAI-ALg5 als positive Kontrolle, pDL2-ALG5 als negative Kontrolle) transformiert. Die Hefen wurden anschließend als Verdünnungsreihe auf Selektions-Agarplatten pipettiert. Die SC-Leu/Trp-Platte diente als Expressionskontrolle der Plasmide. Ein Wachstum auf der SC-Leu/Trp/His-Platte zeigt eine Interaktion an. Es konnte nur eine Interaktion von LIMP2 und dem Reninrezeptor gezeigt werden. ADAM10 interagiert nicht.

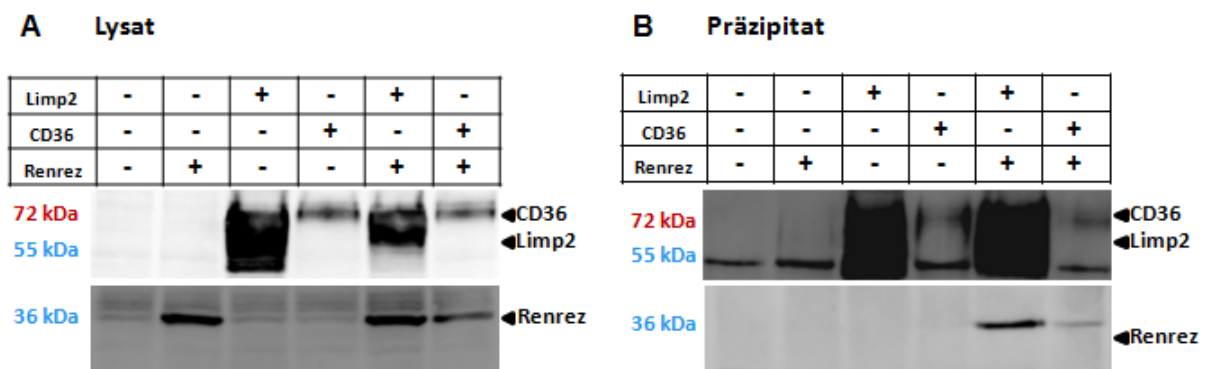
#### 4.1.2 Interaktion des (Pro-)Reninrezeptors mit LIMP2 in Säugetierzellen

Im weiteren Verlauf sollte nun die Protein-Protein-Interaktion in Zellen komplexerer Organismen mit spezifischeren Methoden untersucht werden, um eine Relevanz für das Krankheitsbild in Maus und Mensch klären zu können.

##### 4.1.2.1 Ko-Immunpräzipitation

Nachdem eine Interaktion der beiden Proteine in Hefezellen gezeigt werden konnte, sollte in einer Ko-Immunpräzipitation die Protein-Protein-Interaktion in Zellen komplexerer Organismen nachgewiesen werden. Dazu wurden Cos7 Zellen mit LIMP2, CD36 und dem (Pro-)Reninrezeptor transfiziert, wobei CD36 hier als Kontrolle dienen sollte. Das Membranprotein gehört wie LIMP2 zur Familie der CD36 Scavenger Rezeptor Proteine, Klasse B. Beiden Proteine weisen eine zu dreißig Prozent identische Sequenz auf (Vega et al. 1991; Calvo et al. 1993; Calvo et al. 1995). Jedoch unterscheidet sich CD36 von LIMP2 in seiner intrazellulären Lokalisation, während CD36 an der Plasmamembran lokalisiert ist, liegt LIMP2 hauptsächlich lysosomal vor.

Aus den gewonnenen Zellysaten wurden LIMP2-Myc und CD36-Myc mit dem  $\alpha$ -Myc Antikörper präzipitiert. Im Präzipitat wurde nach der Anwesenheit des (Pro-)Reninrezeptors mit  $\alpha$ -HA gesucht (siehe Abb. 4.5).



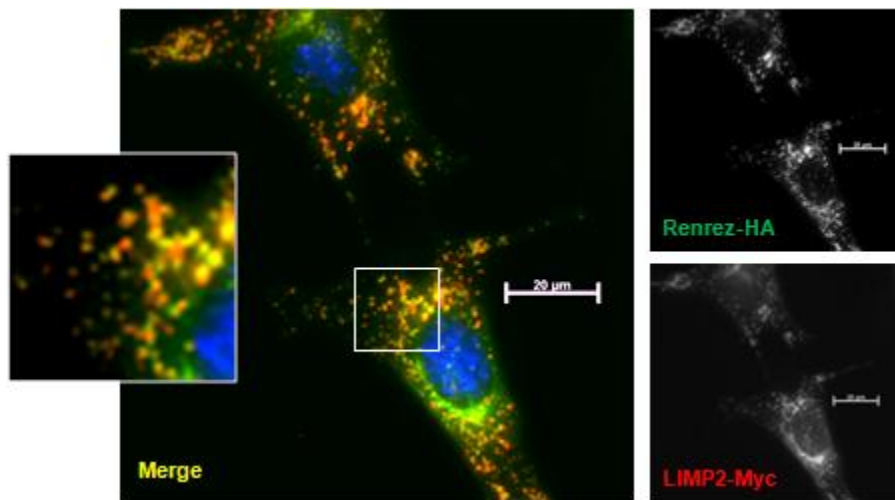
**Abb. 4.5 Ko-Immunpräzipitation von LIMP2 und Reninrezeptor**

Hierzu wurden Cos7 Zellen mit LIMP2-Myc, CD36-Myc und Renrez-HA transfiziert. Aus dem Zellysat wurde LIMP2 mittels des  $\alpha$ -Myc-Antikörpers präzipitiert. Im Präzipitat wurde der Reninrezeptor mithilfe von  $\alpha$ -HA detektiert. Als Negativkontrolle dienten eGFP-transfizierte Cos7 Zellen.

Hierbei konnte eine Interaktion zwischen LIMP2 und dem (Pro-)Reninrezeptor bestätigt werden. Jedoch wurde der (Pro-)Reninrezeptor auch mit CD36 präzipitiert. Insgesamt war die Präzipitation jedoch schwächer, wobei auch die Expression von CD36 gegenüber LIMP2 vermindert war.

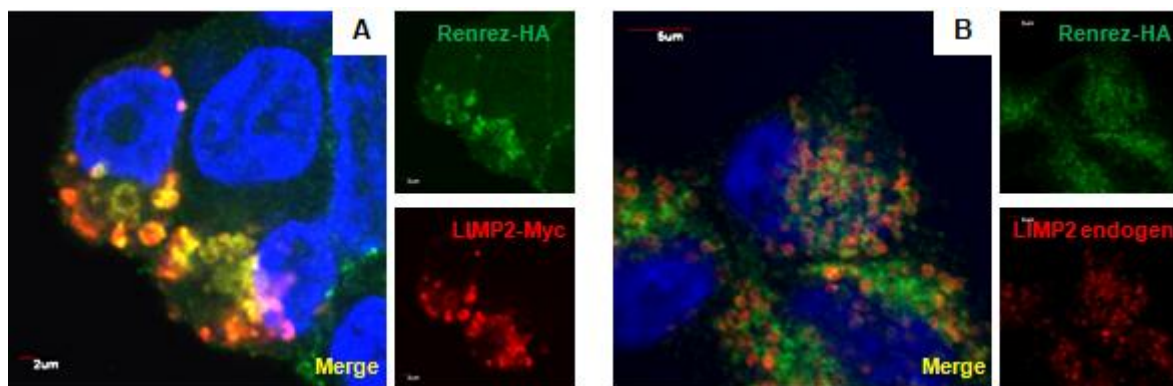
#### 4.1.2.2 Kolokalisation von LIMP2 mit dem (Pro-)Reninrezeptor

Nach der Überprüfung der Interaktion von LIMP2 und (Pro-)Reninrezeptor in Säugetierzellen sollte nun eine Kolokalisationsstudie beider Proteine durchgeführt werden. Dazu wurden LIMP2-defiziente Zellen mit LIMP2 und dem (Pro-)Reninrezeptor transfiziert und mit unterschiedlich farbigen Sekundärantikörpern markiert. LIMP2 wurde anhand des *Myc-tags* mit einem fluoreszierenden Antikörper rot und der Reninrezeptor mithilfe des *HA-tags* grün dargestellt. Dabei zeigte sich eine eindeutige Kolokalisation von (Pro-)Reninrezeptor und LIMP2 in vesikulären Strukturen (siehe Abb. 4.6).



**Abb. 4.6 Kolokalisation von LIMP2 und (Pro-)Reninrezeptor in LIMP2-defizienten Zellen**

LIMP2-defiziente Zellen wurden mit den Plasmiden pFROG-mRenrez-HA und pFROG-mLIMP2-Myc transfiziert. Die Detektion der beiden Proteine erfolgte mit  $\alpha$ -HA und  $\alpha$ -Myc. Es zeigte sich eine deutliche Kolokalisation von LIMP2 und dem Reninrezeptor in kleinen Vesikeln.

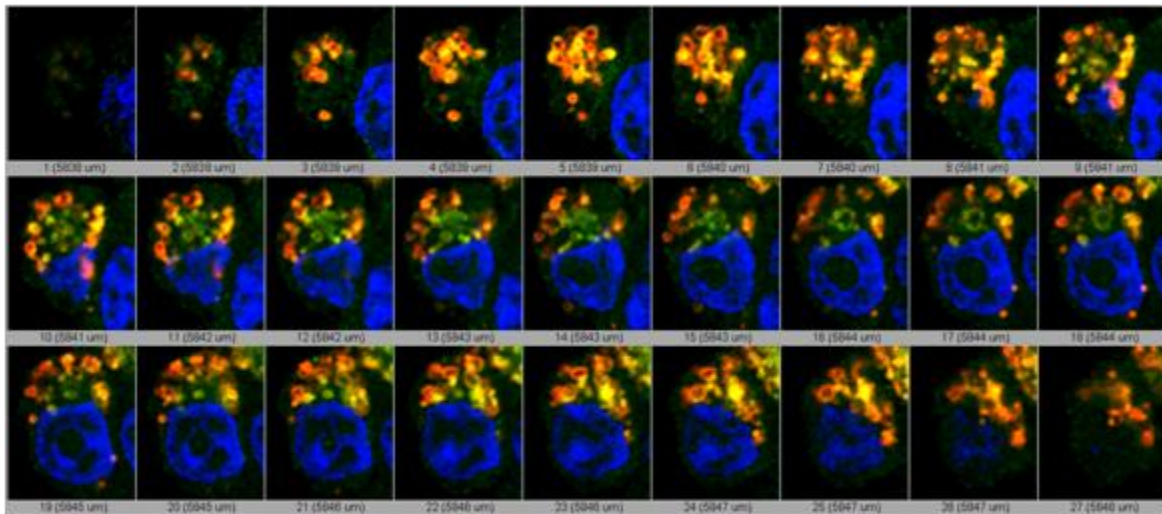


**Abb. 4.7 Kolokalisation von LIMP2 und (Pro-)Reninrezeptor in HEK293T Zellen**

HEK293T Zellen wurden mit dem Plasmid pFROG-hRenrez-HA transfiziert (B). Eine zweite Gruppe wurde zusätzlich noch mit pFROG-hLIMP2-Myc transfiziert (A). Der Reninrezeptor wurde mithilfe des Antikörpers  $\alpha$ -HA detektiert, der gegen das C-terminale *tag* gerichtet ist. LIMP2 wurde mit  $\alpha$ -Myc in Überexpression (A) und mit  $\alpha$ -LIMP2 endogen (B) gefärbt. Es zeigte sich in beiden Fällen eine Kolokalisation, jedoch überwiegt sie in der Überexpression.

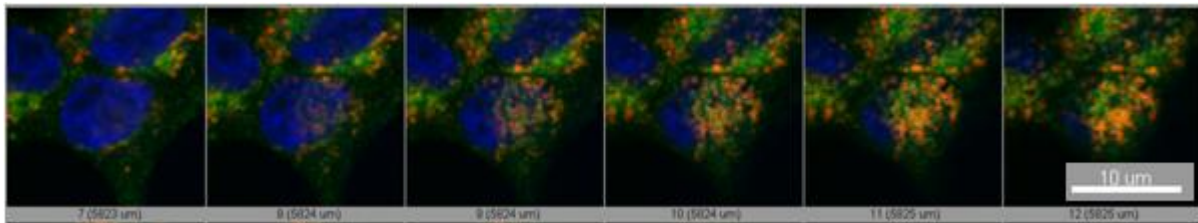
In einem weiteren Schritt wurde die Kolokalisation in humanen HEK293T Zellen untersucht. Die Kolokalisation konnte sowohl unter Überexpression von LIMP2 dargestellt werden, als

auch durch Markierung des endogenen LIMP2 in HEK293T Zellen. Dabei zeigte sich, dass das Kolokalisationssignal in Überexpression stärker ist (siehe Abb. 4.7).



**Abb. 4.8 Kolokalisation von überexprimiertem LIMP2 und Reninrezeptor in HEK293T Zellen**

HEK293T Zellen wurden mit dem Plasmid pFROG-hRenrez-HA und pFROG-hLIMP2-Myc transfiziert. Der Reninrezeptor wurde mithilfe des Antikörpers  $\alpha$ -HA, LIMP2 mit  $\alpha$ -Myc detektiert. Bei Schichtaufnahmen durch die Zelle konnte die Kolokalisation von LIMP2 und Reninrezeptor in allen Ebenen der Zelle bestätigt und ein dreidimensionales Modell entworfen werden.



**Abb. 4.9 Kolokalisation von endogenem LIMP2 und überexprimiertem Reninrezeptor in HEK293T**

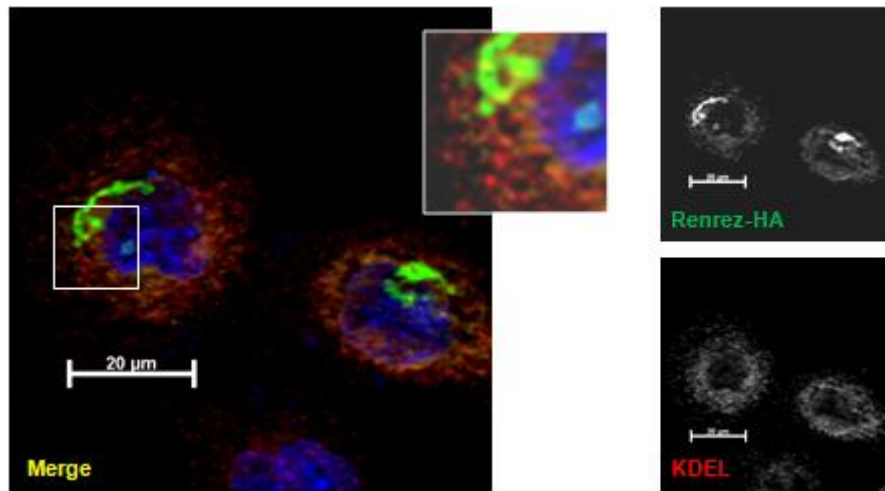
HEK293T Zellen wurden mit dem Plasmid pFROG-hRenrez-HA transfiziert. Der Reninrezeptor wurde mithilfe des Antikörpers  $\alpha$ -HA, LIMP2 mit  $\alpha$ -LIMP2 detektiert. Bei Schichtaufnahmen durch die Zelle konnte die Kolokalisation von Reninrezeptor auch mit endogenem LIMP2 bestätigt werden. Jedoch war die Kolokalisation deutlich schwächer als in Überexpression.

Zusätzlich wurden Schnittbildaufnahmen durch die Zelle am konfokalen Mikroskop der Arbeitsgruppe Gilberger am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg durchgeführt. Dort konnte gezeigt werden, dass die Kolokalisation beider Proteine in allen Ebenen der Zelle zu finden ist. Unter Überexpression von LIMP2 bildeten sich große Vakuolen mit starker Kolokalisation zum (Pro-)Reninrezeptor, während bei endogener Expression von LIMP2 die Kolokalisation deutlich schwächer ausgeprägt war (siehe Abb. 4.8, 4.9).

Mithilfe der Schichtaufnahmen konnte ein dreidimensionales Modell der HEK293T-Zelle mit den fluoreszenz-markierten Proteinen LIMP2 und (Pro-)Reninrezeptor berechnet werden.

#### 4.1.2.3 Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptors in der Zelle

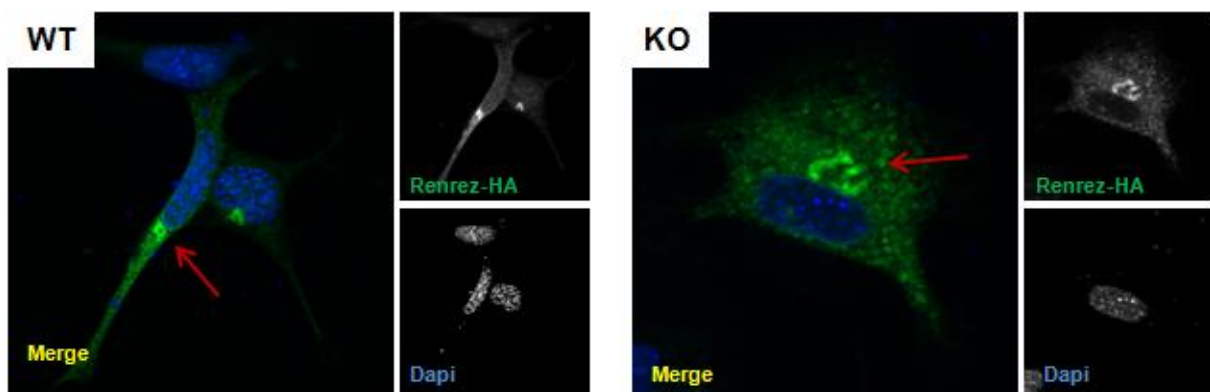
Um einen ersten Eindruck der intrazellulären Verteilung des (Pro-)Reninrezeptors zu erhalten, wurden Immunfluoreszenz-Studien mit unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt.



**Abb. 4.10 Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptors in Cos7 Zellen**

Cos7 Zellen wurden mit dem Plasmid pFROG-mRenrez-HA transfiziert. Die Detektion des Reninrezeptors erfolgte mit  $\alpha$ -HA. Zusätzlich wurde das Endoplasmatische Retikulum mithilfe eines Antikörper gegen ein ER-Retentionssignal ( $\alpha$ -KDEL) markiert. Es zeigte sich eine schwache Kolokalisation.

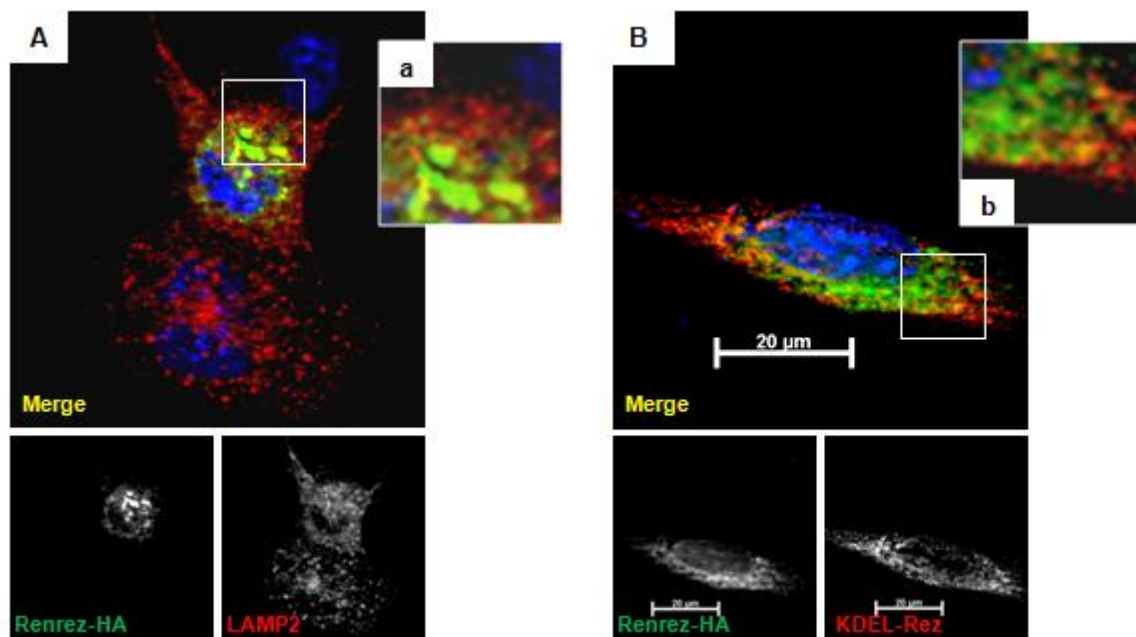
Zuerst wurde die Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptors in Cos7 Zellen untersucht. Dazu wurden Fibroblasten mit dem Plasmid pFROG-mRenrez-HA transfiziert und der (Pro-)Reninrezeptor indirekt mit fluoreszierenden Antikörpern markiert. Hier zeigte sich ein starkes Fluoreszenzsignal in Kernnähe, sowie schwächer in der Peripherie der Zelle. Eine Doppelfärbung mit dem ER-Marker KDEL zeigte eine schwache Kolokalisation (siehe Abb. 4.10).



**Abb. 4.11 Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptors in WT- und LIMP2-defizienten Zellen**

WT und LIMP2-defiziente Zellen wurden mit pFROG-Renrez-HA transfiziert. Der (Pro-)Reninrezeptor wurde mit einem Antikörper gegen das C-terminal HA-tag detektiert. In beiden Zelllinien zeigte sich eine starke Färbung in kernnahen Bereichen (siehe roter Pfeil) sowie punktförmige Färbungen über die gesamte Zelle verteilt.

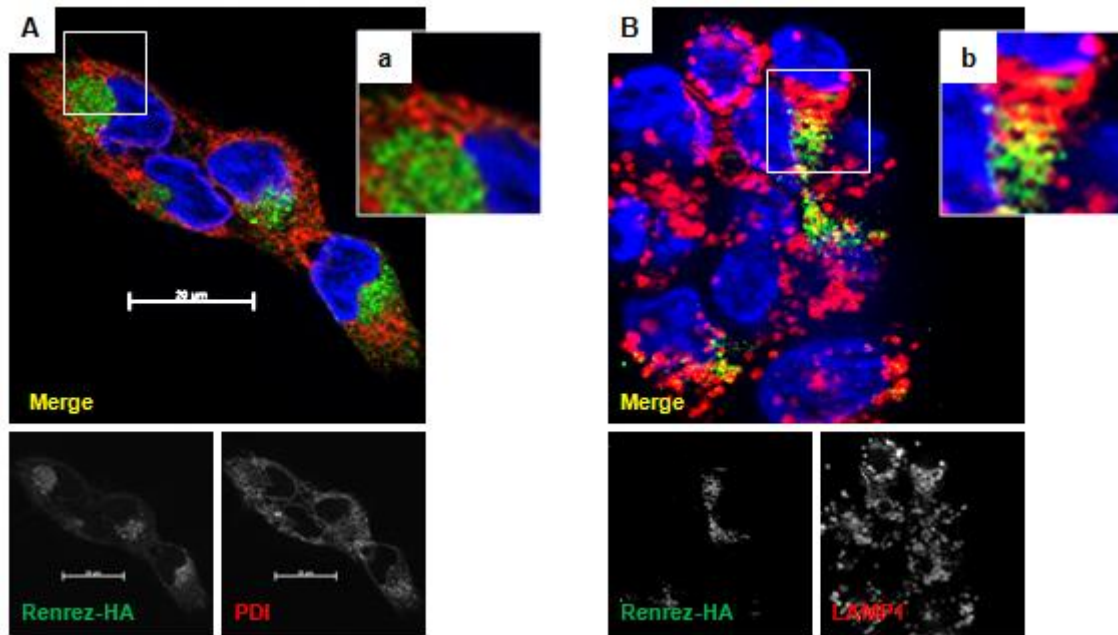
Im Weiteren wurde die Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptors auch in embryonalen Mausfibroblasten untersucht. Die WT- und LIMP2-defizienten Zellen wurden dazu ebenfalls mit dem Plasmid pFROG-mRenrez-HA transfiziert. Auch hier zeigte der (Pro-)Reninrezeptor ein auffälliges Signal in Kernnähe sowie eine punktförmige Färbung in der Peripherie der Zellen (siehe Abb. 4.11). Es fanden sich jedoch keine starken Veränderungen in der Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptors im Vergleich von WT- und LIMP2-defizienten Zellen.



**Abb. 4.12 Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptors in LIMP2-defizienten Zellen**

LIMP2-defiziente Zellen wurden mit pFROG-Renrez-HA transfiziert. Der (Pro-)Reninrezeptor wurde mit einem Antikörper gegen das C-terminal HA-tag detektiert. Die Lokalisation des Reninrezeptors wurde anhand von Doppelfärbungen mit dem lysosomalen Marker LAMP2 (A) und dem Golgi-Marker KDEL-Rezeptor (B) analysiert. Es zeigten sich Kollokalisierungen sowohl mit LAMP2 als auch mit dem KDEL-Rezeptor.

Daraufhin wurden LIMP2-defiziente Zellen, die mit dem Plasmid pFROG-mRenrez-HA transfiziert waren, in Doppelfärbungen untersucht. Der (Pro-)Reninrezeptor wurde grün markiert, während das lysosomale Markerprotein LAMP2 und der *cis*-Golgi-Marker KDEL-Rezeptor rot dargestellt wurden. Es zeigte sich eine leichte Kollokalisierung (siehe Abb. 4.12). Zusätzlich wurde die Verteilung des (Pro-)Reninrezeptors auch in der humanen Zelllinie HEK293T untersucht. Dafür wurden die Zellen mit dem humanen Konstrukt pFROG-hRenrez-HA transfiziert. In den humanen Zellen zeigte der (Pro-)Reninrezeptor (grün) ebenfalls ein starkes Signal in Kernnähe, jedoch konnte keine signifikante Kollokalisierung mit dem ER-Marker PDI (rot) gezeigt werden. Zusätzlich zeigte der (Pro-)Reninrezeptor eine diskrete Färbung in der Peripherie (siehe Abb. 4.13 A). Eine schwache Kollokalisierung mit dem lysosomalen Marker LAMP1 war möglich (siehe Abb. 4.13 B).



**Abb. 4.13 Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptors in HEK293T Zellen**

HEK293T Zellen wurden mit dem Plasmid pFROG-hRenrez-HA transfiziert. Die Detektion des Reninrezeptors erfolgte mit  $\alpha$ -HA. **A** Zusätzlich wurde das Endoplasmatische Retikulum mithilfe eines Antikörpers gegen die *Protein Disulphide Isomerase* ( $\alpha$ -PDI) markiert, welche ein ER-Retentionssignal (KDEL) besitzt. Es zeigte sich keine signifikante Kolo-kalisation. **B** Hier wurde die Lysosomen mithilfe eines Antikörpers gegen das endogene Protein LAMP1 markiert. Es zeigte sich eine leichte Kolo-kalisation.

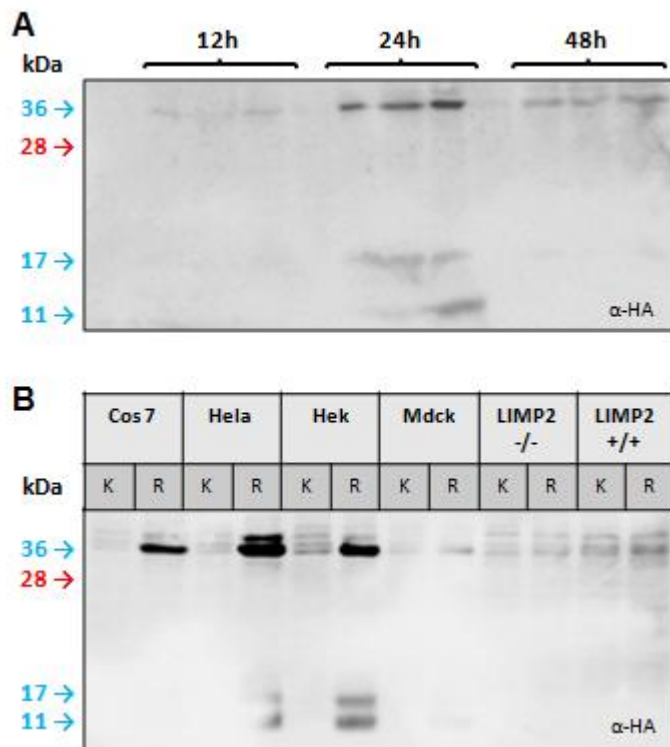
Eine Färbung des Golgi-Apparats mithilfe von Antikörpern war leider nur in LIMP2-defizienten Zellen möglich. Jedoch lässt sich aus der starken kernnahen Färbung in Cos7 und Hek293T Zellen, die nicht mit dem Signal des ER-Markers übereinstimmt, eine Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptors im Golgi-Apparat vermuten.

Zusammenfassend konnte der Reninrezeptor intrazellulär im ER, im Golgi und im Lysosomen lokalisiert werden. Eine Färbung an der Plasmamembran konnte nicht gezeigt werden. Beim Vergleich von WT- und LIMP2-defizienten Zellen zeigten sich keine starken Veränderungen in der Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptors.

#### 4.1.2.4 Expressionsoptimierung des (Pro-)Reninrezeptors

Aufgrund der sehr schlechten und inkonsistenten Expression des (Pro-)Reninrezeptors bei transienten Transfektionen wurden Parameter wie Zeit und Zelltyp untersucht, um die Effizienz zu verbessern.

Dabei stellte sich heraus, dass der (Pro-)Reninrezeptor bereits nach 24 Stunden seine maximale Expression erreicht und nach 48 Stunden geringer nachweisbar ist. Außerdem konnten die C-terminalen Fragmente (11 und 17kDa) des (Pro-)Reninrezeptors nur nach 24h detektiert werden. Daraufhin wurde bei allen weiteren Versuchen eine Zellernte nach 24 Stunden durchgeführt (siehe Abb. 4.14A). Zur weiteren Verbesserung der transienten Transfektion wurden unterschiedliche Zelllinien mit dem Plasmid pFROG-mRenrez-HA transfiziert. Diejenigen Zellen, die für eine hohe Transfektionseffizienz bekannt sind: Cos7, Hela und Hek293T zeigten das stärkste Signal. Jedoch zeigte sich in MdcK Zellen (Sammelrohrzellen der Niere) keine Expression des Proteins (siehe Abb. 4.14B). Auffällig waren die unterschiedlichen Transfektionseffizienzen bei LIMP2-defizienten Zellen (Vergleich Abb 4.14A und 4.14B, siehe Diskussion S. 78)



**Abb. 4.14 Der Reninrezeptor wird 24 Stunden nach Transfektion und in den Zelllinien Cos7, Hela und Hek293T am stärksten exprimiert**

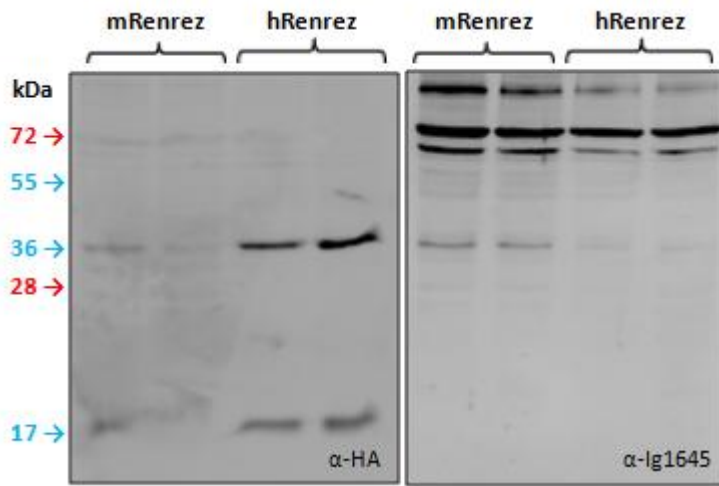
**A** Es wurden LIMP2-defiziente Zellen mit dem Plasmid pFROG-mRenrez-HA transfiziert. Die Zellernte erfolgte nach 12, 24 und 48 Stunden. Die Totallysate wurden jeweils mit drei unterschiedlichen Proteinmengen (20, 30 und 40µg)

**B** Es wurden verschiedenste Zelllinien mit dem Plasmid pFROG-mRenrez-HA (R) und als Kontrolle (K) mit peGFP transfiziert. Die Zellernte erfolgte nach 24 Stunden und die Proteinmenge der Proben betrug 40µg. Die Detektion des (Pro-)Reninrezeptors erfolgte mit  $\alpha$ -HA.

Mangels entsprechenden Antikörpern gegen den endogenen (Pro-)Reninrezeptor mussten alle Versuche unter Überexpression mit einem HA-tag durchgeführt werden. Um nicht unentwegt transiente Transfektionen durchführen zu müssen und eine konstantere Expression des (Pro-)Reninrezeptors zu erhalten, wurden stabile Hek293T Zelllinien hergestellt, die entweder den



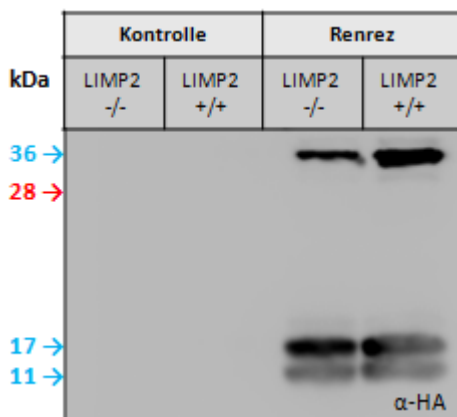
(Pro-)Reninrezeptor der Maus oder des Menschen exprimierten. Hierfür wurden die HEK293T Zellen mit dem Plasmid pFROG-Renrez-HA sowie dem Resistenzplasmid pGK-Hyg transfiziert und durch Hygromycin selektioniert. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen konstant in Hygromycin-haltigem Medium kultiviert, um einen Verlust des Plasmids zu vermeiden. Dabei wurde das Maus-Konstrukt schwächer als der humane (Pro-)Reninrezeptor exprimiert. Außerdem war es nun möglich mit dem Antikörper Ig1645 den (Pro-)Reninrezeptor tag-unabhängig zu detektieren. Die Banden entsprechen in etwa den Größen des (Pro-)Reninrezeptors als Mono- und Dimer (siehe Abb. 4.15).



**Abb. 4.15 Stabile Expression des (Pro-)Reninrezeptors in HEK293T**

Hierfür wurden Zellen mit dem Plasmid pFROG-mRenrez-HA und dem Resistenzgen tragenden Vektor pGK-Hyg transfiziert. Nach 3 Tagen wurde eine Selektion mit Hygromycin begonnen (siehe Methoden 3.2.6.3). Nach der Selektion wurden Totallysate (Proteinmenge 40µg) gewonnen. Die Detektion des (Pro-)Reninrezeptors erfolgte mit α-HA. Des Weiteren wurde der Antikörper Ig1645 von G. Nguyen getestet, der sich gegen den endogenen Reninrezeptor richten soll.

Aufgrund der schlechten Transfektionseffizienz von MEF-Zelllinien mit dem Reninrezeptor und der geringen Eignung von Hek293T Zellen für Elektronenmikroskopie wurden unter Zuhilfenahme eines retroviralen Transduktionssystems stabil transduzierte MEF-Zelllinien generiert, welche den murinen Reninrezeptor dauerhaft exprimierten. Hiermit sollte ein Vergleich zwischen WT- und LIMP2-defizienten Zellen ermöglicht werden. Dazu wurden die MEF-Zellen mit retroviralem Überstand transduziert, welcher durch Transfektion von PHÖNIX mit pMOWS-Renrez-HA hergestellt worden war (siehe Methoden 3.2.7). Beide neu generierten Zelllinien zeigten eine ähnlich starke Expression des (Pro-)Reninrezeptors (36kDa), sowie seiner C-terminalen Fragmente (11kDa und 17kDa) (siehe Abb. 4.16).



**Abb. 4.16 Expressionskontrolle retroviral transduzierter MEF-Zellen**

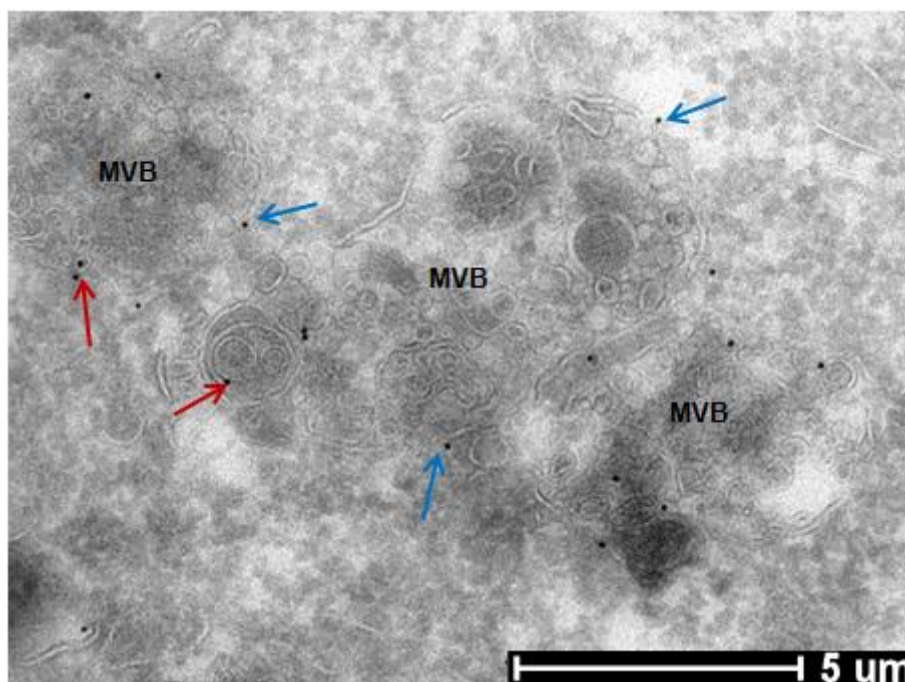
WT und LIMP2-defiziente Zellen (LIMP2 +/+; LIMP2 -/-) wurden mit retroviralem Überstand transduziert, welcher aus der Transfektion von PHÖNIX mit pMOWS-Renrez-HA gewonnen worden war. Die Zellernte erfolgte nach 24 Stunden. Die Proteinmenge der SDS-Proben betrug 40µg. Die Detektion des Reninrezeptors erfolgte mit α-HA. Beide neu generierten Zelllinien zeigten eine starke Expression des (Pro-)Reninrezeptors.

### 4.1.3 Elektronenmikroskopie

Aufgrund der Rolle von LIMP2 als Transportprotein der  $\beta$ -Glukozereberosidase und der *in vitro* nachgewiesenen Interaktion von LIMP2 mit dem (Pro-)Reninrezeptor stellte sich die Frage, ob LIMP2 in der neu entdeckten Interaktion ebenfalls eine Transportfunktion übernimmt. Mittels lichtmikroskopischer Methoden konnte in Kiel eine Kolokalisation beider Proteine in der Zelle gezeigt werden, jedoch war hier keine weitere Spezifizierung möglich. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen in Utrecht sollte daraufhin eine genauere Bestimmung der intrazellulären Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptors in Abhängigkeit von LIMP2 erfolgen.

#### 4.1.3.1 Lokalisation von endogenem LIMP2 in MEF-Zellen

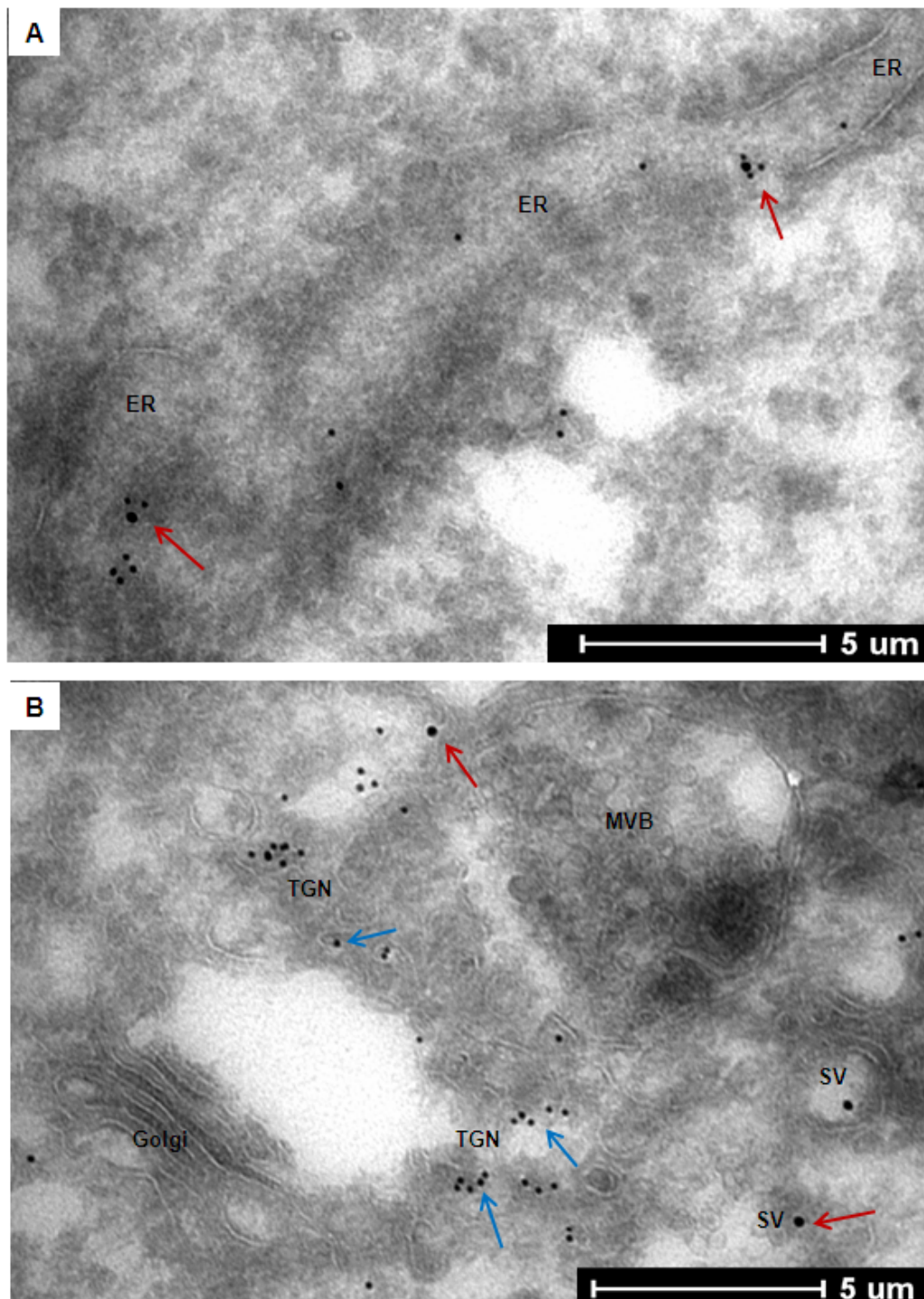
Zuerst wurde die zelluläre Lokalisation des endogenen Proteins LIMP2 in WT-Zellen (583-3) untersucht. Ultradünne Gefrierschnitte wurden mithilfe eines Antikörpers markiert, der sich gegen den luminalen Anteil von LIMP2 richtet. Dabei zeigte sich das lysosomale Protein intrazellulär auf der begrenzenden Membran sowie auf intraluminalen Vesikeln der *multivesicular bodies* (siehe Abb. 4.17).



**Abb. 4.17 Lokalisation von endogenem LIMP2 in WT-Zellen**

Ultradünne Gefrierschnitte wurden mithilfe eines Antikörpers gegen den luminalen Anteil von LIMP2 angefärbt ( $\alpha$ -LIMP2 luminal, rabbit 1:70; PAG 10nm). Das endogene Protein findet sich an der äußeren Membran (blaue Pfeile) sowie auf luminalen Vesikeln (rote Pfeile) von *multivesicular bodies* (MVB).

Um die Untersuchungen zu bestätigen, wurden Kollokalisationsstudien durchgeführt, bei denen eine Doppelfärbung mit speziellen Organell-Markern für Endoplasmatisches Retikulum (KDEL), Trans-Golgi-Netzwerk (TGN38) und spätes Endosom / Lysosom (LAMP1) erfolgte.

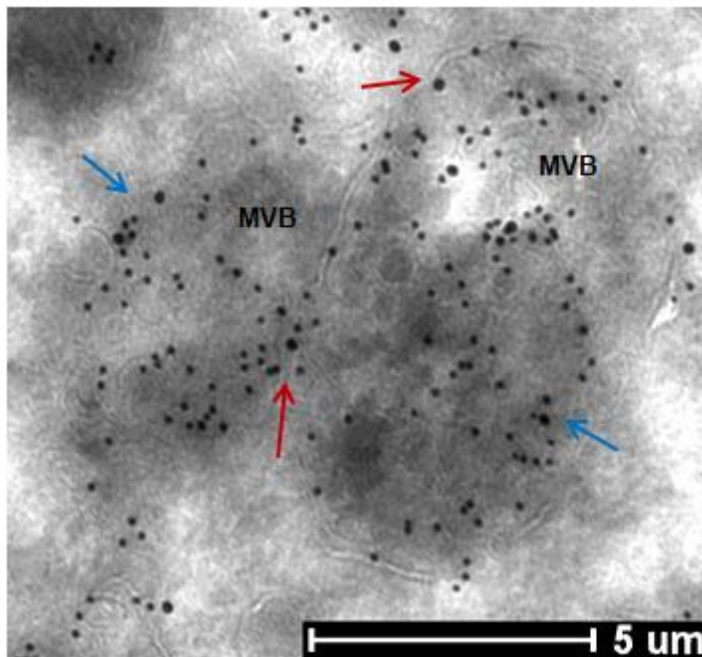


**Abb. 4.18 Lokalisation von LIMP2 im Vergleich zu KDEL und TGN38**

**A** Ultradünne Gefrierschnitte wurden mit Antikörpern (1.  $\alpha$ -KDEL.1:100, rabbit  $\alpha$ -mouse 1:300; PAG 10nm; 2.  $\alpha$ -LIMP2 luminal, rabbit 1:70; PAG 15nm) angefärbt. Eine Kollokalisierung von LIMP2 und KDEL kann vereinzelt beobachtet werden (rote Pfeile).

**B** Ultradünne Gefrierschnitte wurden mit Antikörpern (1.  $\alpha$ -TGN38 1:15, rabbit  $\alpha$ -sheep 1:750; PAG 10nm; 2.  $\alpha$ -LIMP2 luminal, rabbit 1:70; PAG 15nm) angefärbt. Eine Kollokalisierung zwischen LIMP2 (rote Pfeile) und TGN38 (blaue Pfeile) konnte nicht dargestellt werden.

Dabei zeigte sich LIMP2 vereinzelt kolokalisiert mit KDEL am Endoplasmatischen Retikulum. Doch zeigte sich diese Kolokalisation nur in Gold-Clustern, was eher für eine unspezifische Antikörperinteraktion spricht. Eine Kolokalisation von LIMP2 und TGN38 konnte demgegenüber nicht gezeigt werden. Der Trans-Golgi-Marker (TGN38) zeigte sich gehäuft in kleinen Vesikeln in der Nähe des Golgi-Apparats, während LIMP2 auf größeren Vesikeln und *multivesicular bodies* lokalisiert war (siehe Abb. 4.18).



**Abb. 4.19 Kolokalisation von LIMP2 und LAMP1**

Ultradünne Gefrierschnitte wurden mit zwei Antikörpern (1.  $\alpha$ -LAMP1 (1:50); PAG 10nm; 2.  $\alpha$ -LIMP2 luminal, rabbit 1:70; PAG 15nm) angefärbt. Eine Kolokalisation der beiden Proteine findet auf der äußeren Membran (rote Pfeile) und luminal (blaue Pfeile) der *multivesicular bodies* statt.

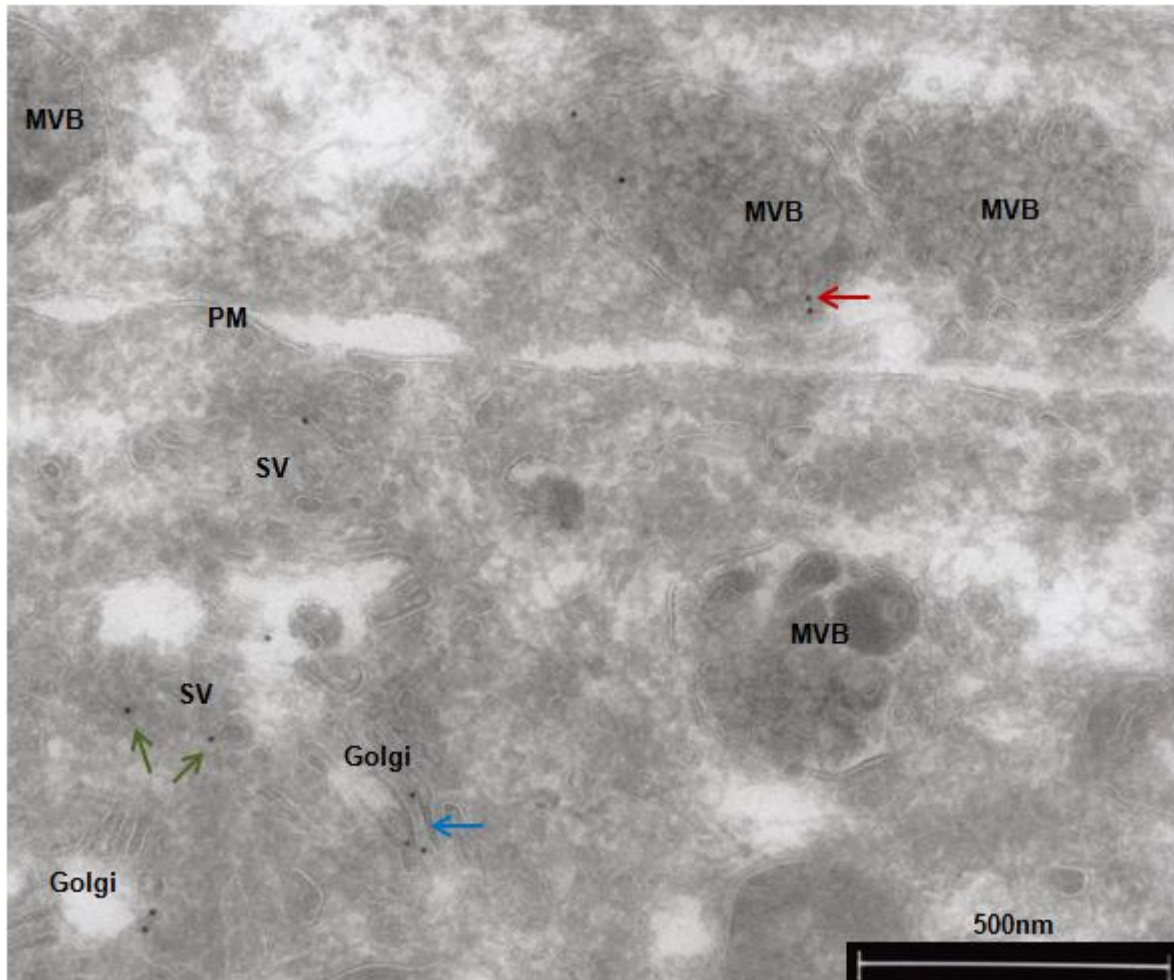
Zusätzlich ließ sich LIMP2 auf LAMP1-positiven *multivesicular bodies* darstellen. Dabei fand sich eine Kolokalisation sowohl auf der äußeren Membran, als auch intraluminal der *multivesicular bodies*.

Zusammenfassend konnte erstmals die endogene Lokalisation des lysosomalen Membranproteins LIMP2 beschreiben werden. Das Protein fand sich sowohl im ER, als auch auf der begrenzenden Membran sowie intraluminal LAMP1-positiver *multivesicular bodies*.

#### 4.1.3.2 Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptors in MEF-Zellen

Um die intrazelluläre Verteilung des (Pro-)Reninrezeptors zu analysieren, wurden retroviral transduzierte MEF-Zelllinien (WT und LIMP2-defiziente Zellen) hergestellt, die stabil einen (Pro-)Reninrezeptor mit HA-tag am C-Terminus exprimierten (siehe 3.2.7). Dies war notwendig, da kein funktionsfähiger Antikörper gegen das endogene Protein vorlag (siehe Abb. 4.16).

Ultradünne Gefrierschnitte der Wildtyp-Zelllinie wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen das HA-tag des (Pro-)Reninrezeptors angefärbt. Es zeigte sich eine intrazelluläre Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptors an *small vesicles*, Golgi-Apparat und *multivesicular bodies* (siehe Abb. 4.20). Auch andere Organellen des sekretorischen Proteintransportwegs zeigten eine leichte Goldmarkierung, welche jedoch deutlich geringer ausgeprägt war.

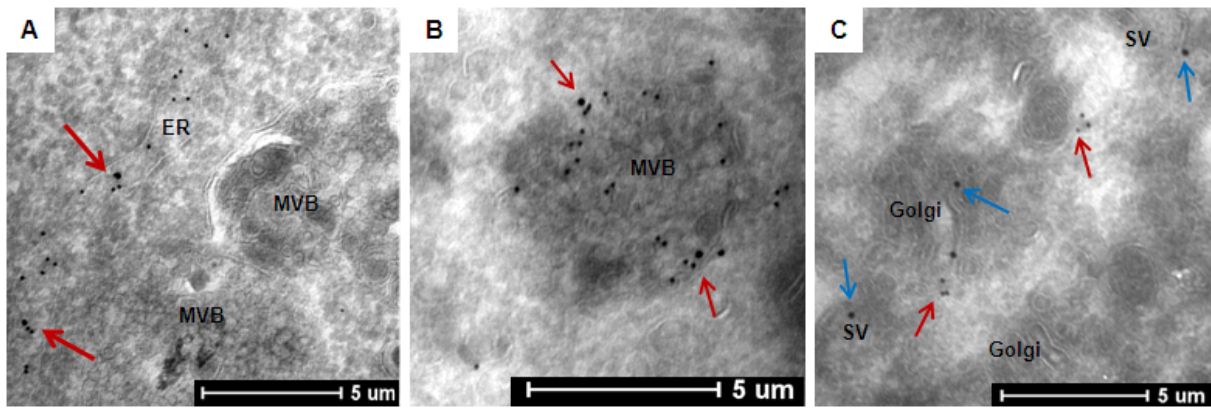


**Abb. 4.20 Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptors in WT- Zellen**

Der (Pro-)Reninrezeptor wurde mithilfe des monoklonalen  $\alpha$ -HA-Antikörpers (1:300) sowie sekundär mit Protein-A-Goldpartikeln (PAG), 10nm (1:70) markiert. Der Reninrezeptor fand sich im WT sowohl im Golgi-Apparat (blauer Pfeil) als auch in *small vesicles* (grüne Pfeile) und *multivesicular bodies* (roter Pfeil).

Um die Organellzuordnung zu bestätigen, wurden ebenfalls Kolokalisationsstudien mit den Organell-Markern für Endoplasmatisches Retikulum (KDEL), Trans-Golgi-Netzwerk (TGN38) und spätes Endosom / Lysosom (LAMP1) durchgeführt.

Eine Kolokalisation des (Pro-)Reninrezeptors mit KDEL am Endoplasmatischen Retikulum konnte gezeigt werden. Außerdem fand sich eine Kolokalisation des (Pro-)Reninrezeptors mit LAMP1 auf *multivesicular bodies*. Eine Kolokalisation mit dem Trans-Golgi-Marker TGN38 konnte jedoch nicht gezeigt werden (siehe Abb 4.21).



**Abb. 4.21 Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptors im Vergleich zu KDEL, LAMP1 und TGN38**

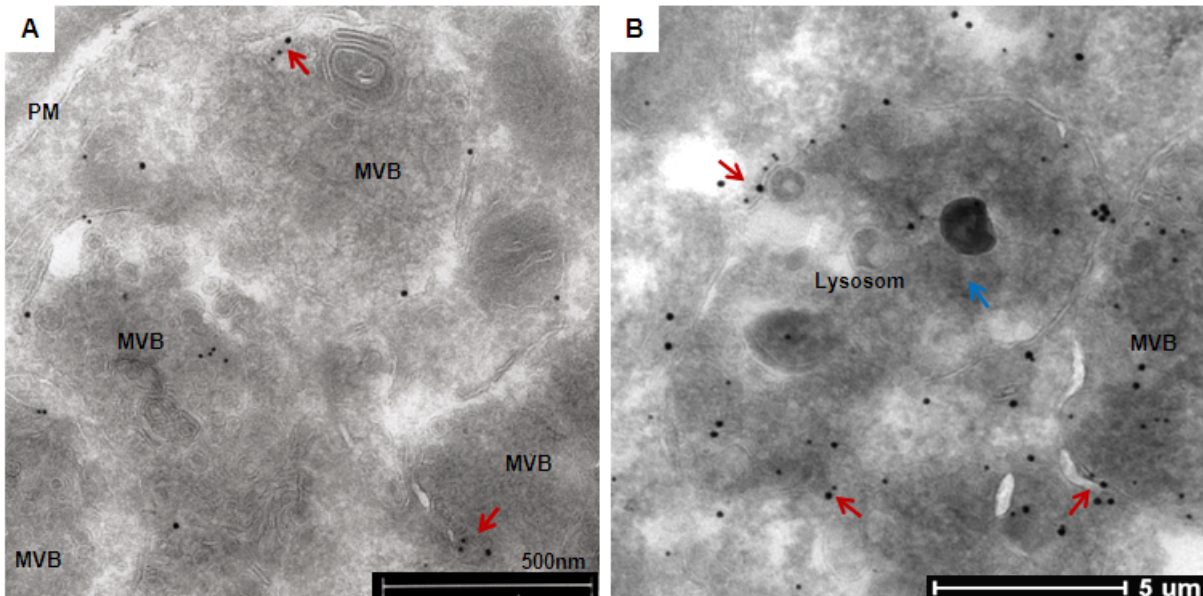
Ultradünne Gefrierschnitte (fixiert mit 2% GA/PBS) wurden mittels Immunogold-Färbung markiert.

**A** Die Antikörper waren gegen das HA-tag des Reninrezeptors und das ER-Retentionssignal KDEL gerichtet (1.  $\alpha$ -KDEL 1:100; PAG 10nm, 2.  $\alpha$ -HA poly 1:150, PAG 15nm). Eine Kolokalisation von KDEL und Reninrezeptor findet am Endoplasmatischen Retikulum statt (siehe rote Pfeile).

**B** Hier wurden Antikörper gegen das HA-tag des Reninrezeptors und das lysosomale Protein LAMP1 verwendet (1.  $\alpha$ -Lamp1 ID4B 1:50, rabbit  $\alpha$ -rat 1:300, PAG 10nm; 2.  $\alpha$ -HA polycl. Sigma 1:150; PAG 15nm). Eine Kolokalisation von LAMP1 und Reninrezeptor findet sich an *multivesicular bodies* (siehe rote Pfeile).

**C** Die Antikörper richten sich gegen das HA-tag des Reninrezeptors und den Trans-Golgi-Marker TGN38 (1.  $\alpha$ -TGN38 1:15, rabbit  $\alpha$ -sheep 1:750, PAG 10nm, 2.  $\alpha$ -HA poly 1:150, PAG 15nm). Eine Kolokalisation von TGN38 (rote Pfeile) und Reninrezeptor (blaue Pfeile) konnte nicht gezeigt werden.

#### 4.1.3.3 Kolokalisation von LIMP2 und (Pro-)Reninrezeptor in MEF-Zellen



**Abb. 4.22 Lokalisation von LIMP2 und Reninrezeptor in WT- Zellen**

Ultradünne Gefrierschnitte wurden mit Antikörpern gegen das HA-tag des Reninrezeptors und das endogene LIMP2 angefärbt (1.  $\alpha$ -HA monoclonal (1:300); PAG 10nm; 2.  $\alpha$ -LIMP2 luminal, rabbit 1:70; PAG 15nm).

**A** Eine Kolokalisation von LIMP2 und Reninrezeptor fand sich in *multivesicular bodies* (siehe gelbe Pfeile).

**B** Sowohl LIMP2 als auch der (Pro-)Reninrezeptor fanden sich auf der äußeren Membran (rote Pfeile) sowie auf kleinen intraluminalen Vesikeln (blauer Pfeil).

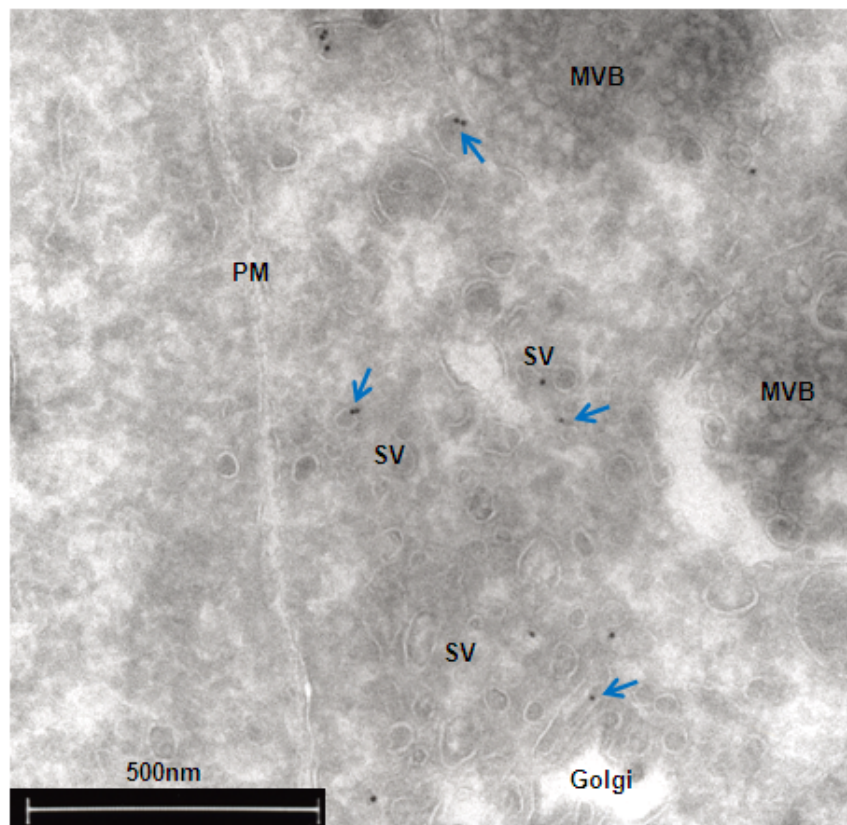
Nach der Analyse der intrazellulären Verteilung der einzelnen Proteine, sollte nun eine gemeinsame Darstellung von LIMP2 und (Pro-)Reninrezeptor erfolgen. Dabei sollte der Ort der Kolokalisation beider Proteine ermittelt werden. Die Färbung ultradünner Gefrierschnitten

von Wildtyp-Zellen erfolgte mit den bereits zuvor verwendeten Antikörpern  $\alpha$ -HA und  $\alpha$ -LIMP2. Dabei wurde der (Pro-)Reninrezeptor mithilfe von kleinen Goldpunkten (10nm) markiert, während LIMP2 mit größeren Goldpunkten (15nm) gekennzeichnet wurde.

Zusammenfassend konnte eine Kolokalisation von LIMP2 und (Pro-)Reninrezeptor an *multivesicular bodies* und Lysosomen gezeigt werden. Beide Proteine befanden sich sowohl an der äußeren Membran als auch auf intraluminalen Vesikeln von *multivesicular bodies* (siehe Abb. 4.22).

#### 4.1.3.4 Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptors in LIMP2-defizienten Zellen

Nachdem der Ort der intrazellulären Kolokalisation von LIMP2 und (Pro-)Reninrezeptor als *multivesicular body* und Lysosom ermittelt worden war, stellten sich nun die Fragen, ob LIMP2 als Transportprotein für den (Pro-)Reninrezeptor zum Lysosom fungiert. Deshalb sollte die intrazelluläre Verteilung des (Pro-)Reninrezeptors in LIMP2-defizienten Zellen beurteilt werden. Dazu wurden ultradünne Gefrierschnitte mit einem Antikörper gegen das HA-tag am C-Terminus des (Pro-)Reninrezeptors gefärbt.



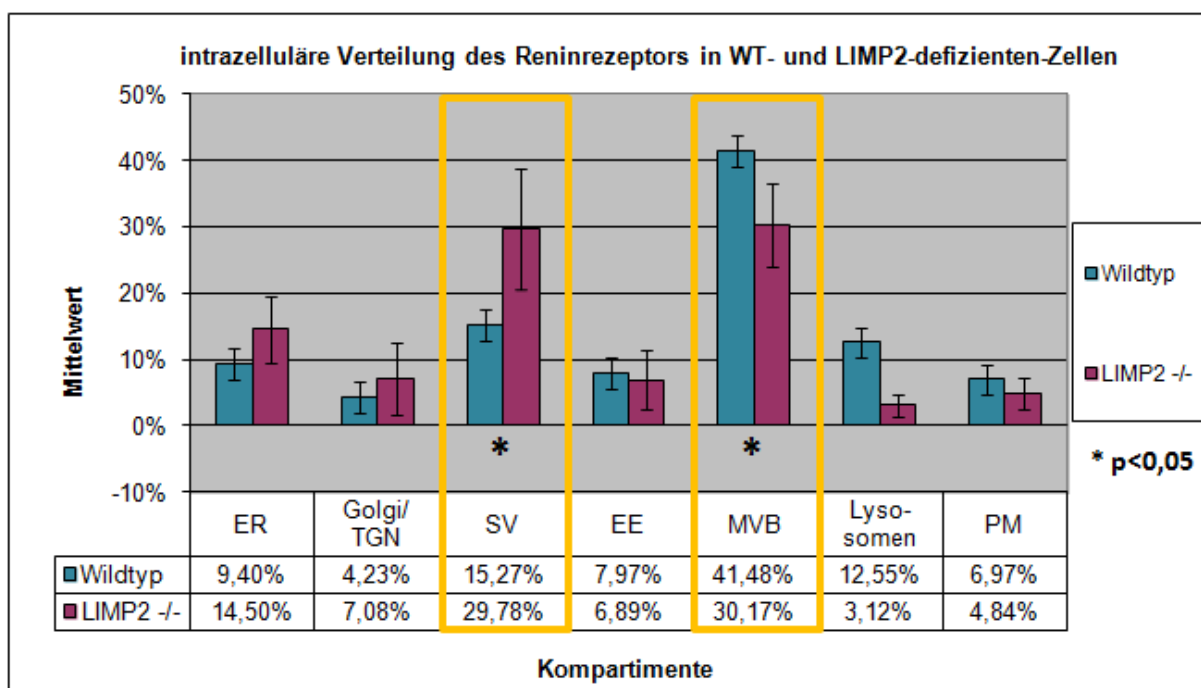
**Abb. 4.23 Lokalisation des Reninrezeptors in LIMP2-defizienten Zellen**

Der Reninrezeptor wurde mithilfe des monoklonalen  $\alpha$ -HA-Antikörpers (1:300) sowie sekundär mit Protein-A-Goldpartikeln (PAG), 10nm (1:70) markiert. Der Reninrezeptor (siehe blaue Pfeile) findet sich in LIMP2-defizienten Zellen sowohl am Golgi-Apparat, in *small vesicles* (SV) als auch in *multivesicular bodies* (MVB).

Hierbei zeigte sich, dass der (Pro-)Reninrezeptor auch weiterhin in allen Organellen des sekretorischen Proteintransportwegs, wie Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, *small vesicles* und *multivesicular bodies*, zu finden ist. Jedoch zeigte sich eine Veränderung in der quantitativen Verteilung des Proteins. Der (Pro-)Reninrezeptor fand sich vermehrt in frühen Kompartimenten des sekretorischen Proteintransportwegs, wie zum Beispiel: Golgi-Apparat und *small vesicles*; jedoch auch weiterhin an *multivesicular bodies* (siehe Abb. 4.23).

#### 4.1.3.5 Quantifizierung der Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptors im Vergleich von Wildtyp- und LIMP2-defizienten Zellen

Um eine Veränderung in der intrazellulären Verteilung des (Pro-)Reninrezeptors in LIMP2-defizienten Zellen im Vergleich zu Wildtyp besser beurteilen zu können, wurde eine quantitative Untersuchung vorgenommen. Dazu wurden am Elektronenmikroskop jeweils vier WT- und LIMP2-defiziente Schnitte untersucht. Insgesamt wurden 782 Goldpunkte in Wildtyp-Zellen und 691 Goldpunkte in LIMP2-defizienten-Zellen ausgezählt. Dabei wurden die gefundenen Goldpunkte bestimmten Kategorien zugeordnet: Endoplasmatisches Retikulum (ER), Golgi-Apparat/Trans-Golgi-Netzwerk (TGN), *small vesicles* (SV), *early endosomes* (EE), *multivesicular bodies* (MVB), Lysosomen und Plasmamembran (PM).



**Abb. 4.24 Quantifizierung der Verteilung des Reninrezeptors in WT- und LIMP2-defizienten Zellen**

Ultradünne Gefrierschnitte von Wildtyp- und LIMP2-defizienten Zellen wurden am Elektronenmikroskop auf ihre Verteilung des durch 10nm große Goldpartikel markierten Reninrezeptors ausgewertet. Jeder Goldpartikel wurde einem Kompartiment in der Zelle zugeordnet. Danach wurden die dazugehörigen Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet sowie ein t-Test angewandt. Dabei zeigte sich, dass der Reninrezeptor eine signifikante Änderung der Verteilung im Bereich der *small vesicles* und der *multivesicular bodies* im Vergleich von WT- und LIMP2-defizienten Zellen aufwies (siehe gelbe Kästen). \* = signifikant =  $p < 0,05$ .



Es konnte eine signifikante Veränderung in den Kompartimenten *small vesicles* und *multivesicular bodies* festgestellt werden. In Wildtyp-Zellen fand sich der (Pro-)Reninrezeptor zu 15,27% in *small vesicles* (SD 4,76%) und zu 41,48% in *multivesicular bodies* (SD 4,21%). In LIMP2-defizienten-Zellen fand sich der (Pro-)Reninrezeptor hingegen zu 29,78% in *small vesicles* (SD 9,07%) und zu 30,17% in *multivesicular bodies* (SD 6,31%). Mithilfe eines zweiseitigen t-Tests konnten signifikante p-Werte ( $p < 0,05$ ) von  $p = 0,041$  in *small vesicles* und von  $p = 0,029$  in *multivesicular bodies* berechnet werden (siehe Tabelle 8.1 und 8.2 im Anhang).

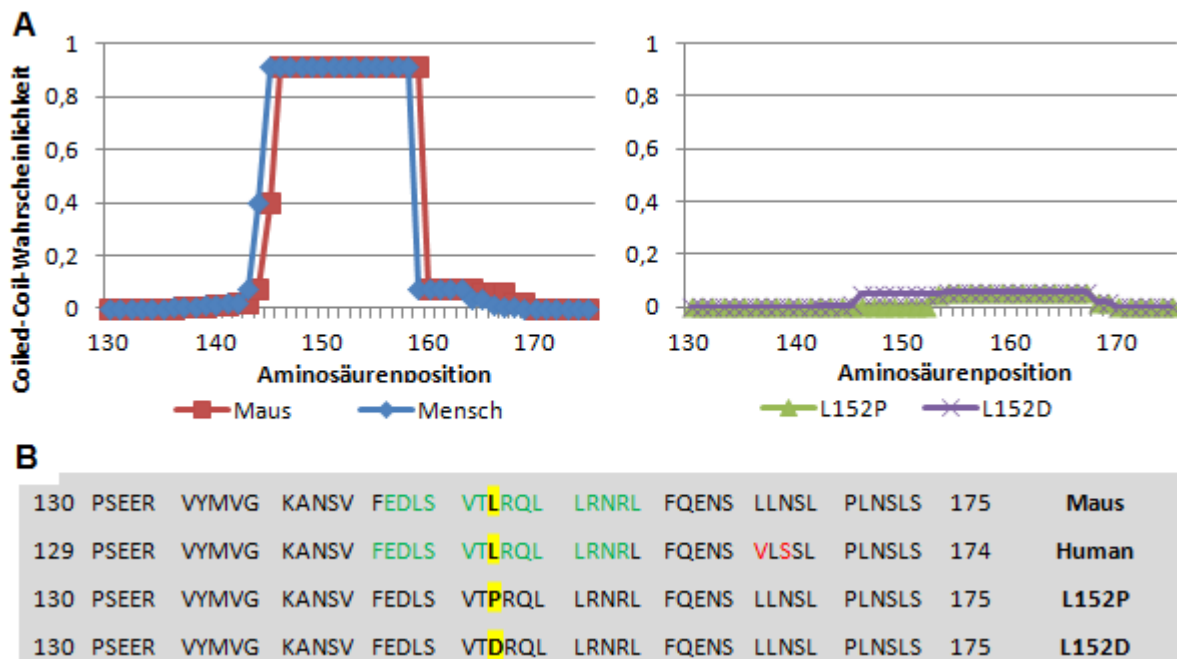
Auch in anderen Kompartimenten entlang des sekretorischen Proteintransportwegs konnte eine Verschiebung der Verteilung hin zu früheren Kompartimenten wie ER und Golgi-Apparat beobachtet werden (siehe Abb. 4.24), jedoch waren hierbei die p-Werte nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

## 4.1.4 Charakterisierung einer putativen Interaktionsstelle

### 4.1.4.1 Überprüfung der *Coiled-Coil*-Domäne als putative Bindungsstelle

Nachdem eine Interaktion zwischen LIMP2 und dem (Pro-)Reninrezeptor in vitro mittels Ko-Immunpräzipitation gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, welches Bindungsmotiv für die Interaktion verantwortlich ist. Für LIMP2 wurde bereits gezeigt, dass es über seine *Coiled-Coil*-Domäne im luminalen Anteil mit der  $\beta$ -Glukozerebrosidase interagiert (Blanz et al. 2010).

Die *Coiled-Coil*-Domäne ist ein Strukturmotiv von Proteinen. Dabei winden sich zwei bis fünf  $\alpha$ -Helices umeinander und bilden einen *Supercoil* (Mason et al. 2004). Kennzeichnend für diese Struktur ist ein Heptadenmuster der Aminosäuren (a-b-c-d-e-f-g). Hier finden sich an Position **a** und **d** überwiegend hydrophobe, verzweigte Reste (Leucin, Isoleucin und Valin) und an Position **e** und **g** geladene Reste (Glutaminsäure und Lysin). Die auftretenden hydrophoben Wechselwirkung stabilisieren die Struktur der *Coiled-Coil*-Domäne. Das Motiv ist unter anderem an Proteinfaltung und Protein-Protein-Interaktionen beteiligt (Lupas et al. 1991).



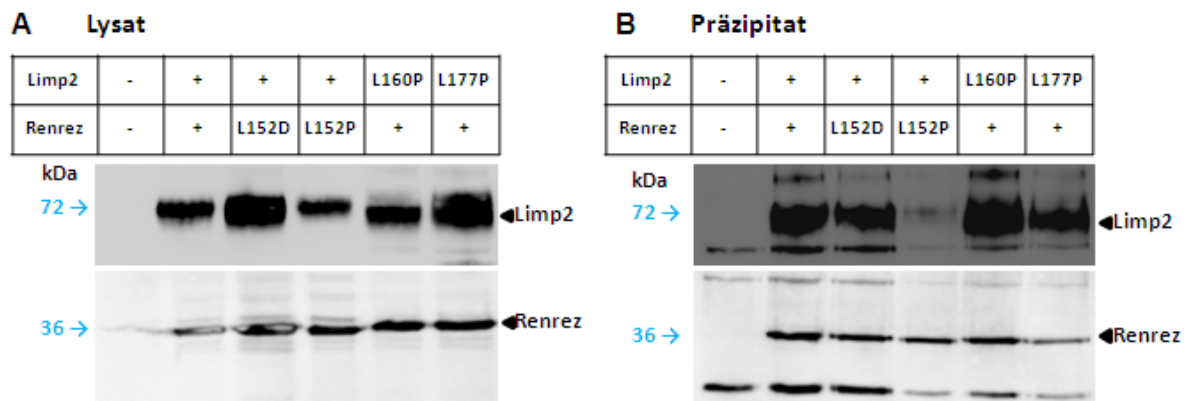
**Abb. 4.25** Wahrscheinlichkeit einer *Coiled-Coil*-Domäne in der Struktur des (Pro-)Reninrezeptors

**A:** Die Proteinsequenzen des Reninrezeptors aus der Maus und dem Menschen wurden mithilfe des Programms COILS ([www.ch.embnet.org](http://www.ch.embnet.org)) auf die Wahrscheinlichkeit für das Ausbilden einer *Coiled-Coil*-Domäne untersucht. Dabei zeigte sich eine hohe Wahrscheinlichkeit im Bereich der Aminosäuren 146-159 in der Maus und 145-158 im Menschen. Durch Austausch des Leucins an Aminosäureposition 152 durch Asparaginsäure (L152D) oder Prolin (L152P) konnte die Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung einer *Coiled-Coil*-Domäne minimalisiert werden. **B:** Die Sequenz der Region um die *Coiled-Coil*-Domäne (grüne Schrift) ist stark konserviert. In Gelb markiert ist Position 152 mit den eingefügten Mutationen. In Rot dargestellt sind die wenigen Unterschiede in der Aminosäuresequenz zwischen Maus und Mensch.

Bei einer Analyse des (Pro-)Reninrezeptors auf häufige Interaktionsmotive konnte ebenfalls eine putative *Coiled-Coil*-Domäne identifiziert werden, die sich sowohl im Protein der Maus als auch des Menschen finden lässt. Die *Coiled-Coil*-Domäne umschließt die Aminosäuren 145-158 beim Mensch sowie 146-159 bei der Maus (siehe Abb. 4.25).

Um eine Rolle der *Coiled-Coil*-Domäne in der Interaktion zwischen LIMP2 und dem (Pro-)Reninrezeptor zu überprüfen, wurde eine Ko-Immunpräzipitation durchgeführt. Dazu wurde jeweils die *Coiled-Coil*-Domäne vom (Pro-)Reninrezeptors oder von LIMP2 mutiert, indem die Aminosäure Leucin in diesem Bereich durch Asparaginsäure oder Prolin ersetzt wurde.

Die mutierten Proteine wurden in Cos7-Zellen transfiziert. Anschließend wurde LIMP2 aus dem Zelllysat mit  $\alpha$ -Myc präzipitiert und im Präzipitat nach der Anwesenheit des (Pro-)Reninrezeptors mit  $\alpha$ -HA gesucht. Dabei stellte sich heraus, dass eine Zerstörung der Sekundärstruktur der Proteine im Bereich der *Coiled-Coil*-Domäne zu keiner Behinderung der Interaktion zwischen den beiden Proteinen führte. Somit ist die *Coiled-Coil*-Domäne als putative Bindungsstelle unwahrscheinlich (siehe Abb 4.26).

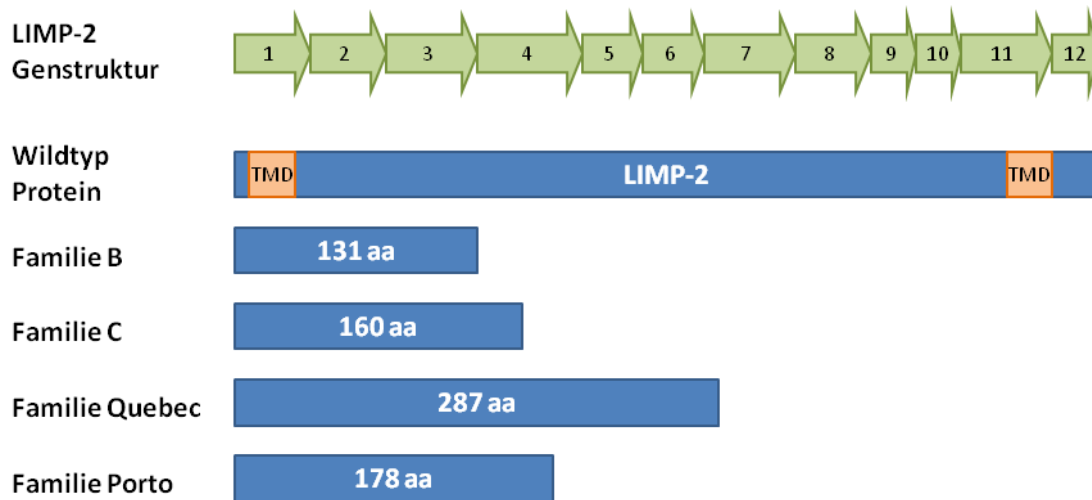


**Abb. 4.26 Ko-Immunpräzipitation von LIMP2 und Reninrezeptor bei mutierter *Coiled-Coil* Domäne**

Hierzu wurden Cos7 Zellen mit LIMP2-Myc und Renrez-HA transfiziert. Zusätzlich wurden Cos7 Zellen mit Konstrukten transfiziert die eine mutierte *Coiled-Coil*-Domäne in LIMP2 (L160P, L177P) oder Reninrezeptor (L152D, L152P) enthielten. Um die Struktur der *Coiled-Coil*-Domäne zu zerstören wurden die Aminosäure Leucin (L) durch Asparaginsäure (D) oder Prolin (P) ersetzt. Aus dem Zelllysat wurde LIMP2 mittels  $\alpha$ -Myc Antikörper präzipitiert und im Präzipitat wurde der Reninrezeptor mithilfe von  $\alpha$ -HA detektiert. Als Negativ-Kontrolle dienten eGFP-transfizierte Cos7 Zellen. Eine Zerstörung der *Coiled-Coil*-Struktur beeinflusste die Interaktion beider Proteine nicht.

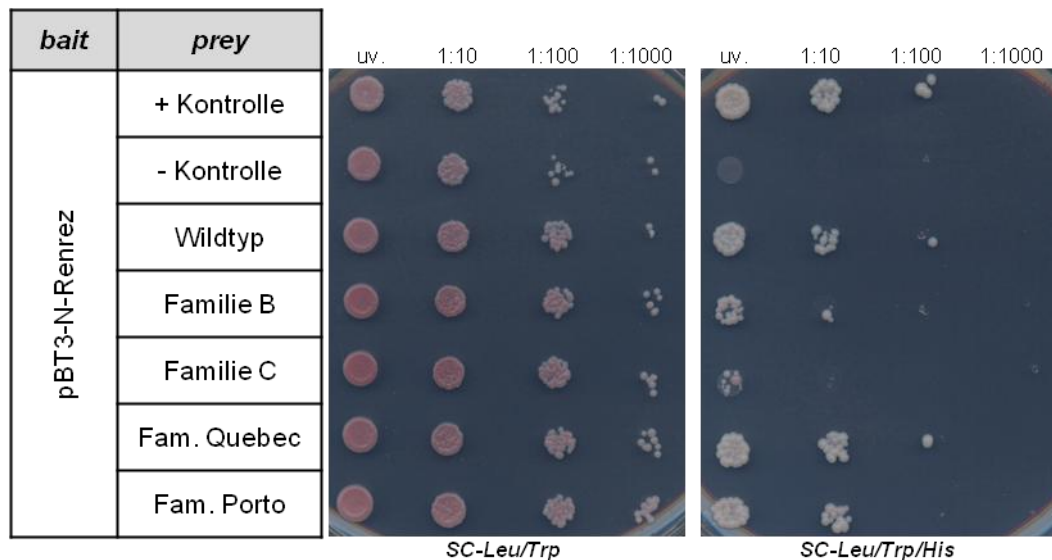
#### 4.1.4.2 Einfluss von LIMP2-Mutationen (AMRF Syndrom) auf die Interaktion

Nachdem die *Coiled-Coil*-Domäne als Bindungsmotiv nicht in Frage kam, wurden im Weiteren bekannte LIMP2-Mutationen von AMRF Syndrom Patienten auf ihre Bindungsfähigkeit zum Reninrezeptor untersucht. Die Mutationen finden sich im Verlauf des gesamten Gens und führen zu einem verkürzten Protein (Berkovic et al. 2008).



**Abb. 4.27 Schematische Darstellung der LIMP-2 Genstruktur sowie bekannter AMRF-Mutationen**

Das LIMP-2-Gen setzt sich aus 12 Exons zusammen. Das Protein besitzt zwei Transmembrandomänen (TMD). Zusätzlich sind bekannte AMRF-Mutationen dargestellt (Familie B, C, Quebec und Porto), die zu einem verkürzten LIMP2-Protein führen (modifiziert nach Berkovic, Dibbens et al. 2008). aa= amino acid



**Abb. 4.28 Interaktion des Reninrezeptors mit LIMP2-Mutanten des AMRF-Syndroms**

Der Hefestamm NMY51 wurde mit dem Reninrezeptor als *bait*-Protein (pBT3-N-Renrez) transformiert. Zusätzlich wurde der LIMP2 (pASDL-N-LIMP2) und die Kontrollplasmide (pAI-ALG5 als Positivkontrolle, pDL2-ALG5 als Negativkontrolle) transformiert. Des Weiteren wurde vier *prey*-Konstrukte transformiert, die eine bekannte AMRF-Mutation in LIMP2 enthielten. Die Hefen wurden anschließend als Verdünnungsreihe auf Selektions-Agarplatten pipettiert. Die SC-Leu/Trp-Platte diente als Expressionskontrolle beider Plasmide. Ein Wachstum auf der SC-Leu/Trp/His-Platte zeigt eine Interaktion an. Es konnte bei einzelnen AMRF-Mutationen (Familie B/C) ein vermindertes Wachstum auf der Selektionsplatte detektiert werden.

Für die Untersuchung wurde erneut das Y2H-System verwendet. Der (Pro-)Reninrezeptor wurde als *bait*-Protein (pBT3-N-Renrez) in NMY51-Zellen transformiert. Als *prey*-Protein wurde das LIMP2-Protein sowie LIMP2-AMRF-Mutanten transformiert. Nach Wachstum wurden die Hefen auf SC-Leu-Trp-His-Platten selektioniert. Dabei zeigte sich, dass bei allen AMRF-Mutationen weiterhin eine Interaktion mit dem (Pro-)Reninrezeptor stattfand. Diese

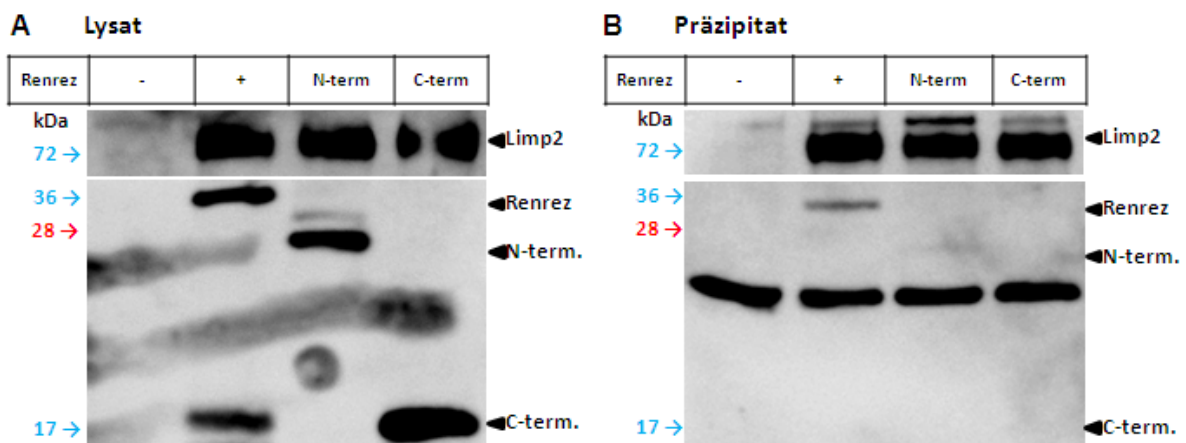
Interaktion war jedoch bei den AMRF-Mutationen der Familien B und C, die zu einem verkürzten Proteine mit einer Länge von 131 und 160 Aminosäuren führen, abgeschwächt (siehe Abb. 4.27 und 4.28).

#### 4.1.4.3 Untersuchung der Spaltfragmente des (Pro-)Reninrezeptors auf ihre Interaktionsfähigkeit mit LIMP2

Nachdem LIMP2-Mutationen auf ihre Interaktion mit dem (Pro-)Reninrezeptor untersucht worden waren, folgte nun die Überlegung, ob nur eines der beiden Spaltfragmente des (Pro-)Reninrezeptors mit LIMP2 interagiert. Zunächst war eine Spaltung des (Pro-)Reninrezeptors durch Furin in ein N- und ein C-terminales Fragment beschrieben worden (Cousin et al. 2009; Nguyen et al. 2010) (siehe Abb 1.9). Später wurde auch die Metalloprotease ADAM19 für die Spaltung des (Pro-)Reninrezeptors verantwortlich gemacht (Yoshikawa et al. 2011).

Zunächst wurden Konstrukte kloniert, die entweder den N- oder C-terminalen Teil des (Pro-)Reninrezeptors mit einem endständigen HA-tag exprimierten. Diese wurden gemeinsam mit LIMP2 in Cos7-Zellen transfiziert. Aus dem Zelllysat wurde LIMP2 mit  $\alpha$ -Myc präzipitiert und im Präzipitat die Anwesenheit des (Pro-)Reninrezeptors oder eines seiner Fragmente mit  $\alpha$ -HA untersucht.

Dabei zeigte sich, dass nur eine Interaktion zwischen LIMP2 und dem (Pro-)Reninrezeptor vorlag, wenn das Protein in voller Länge exprimiert wurde. Eine Interaktion mit dem N-terminalen löslichen Fragment und dem C-terminalen membranständigen Fragment konnte nicht detektiert werden (siehe Abb. 4.29).



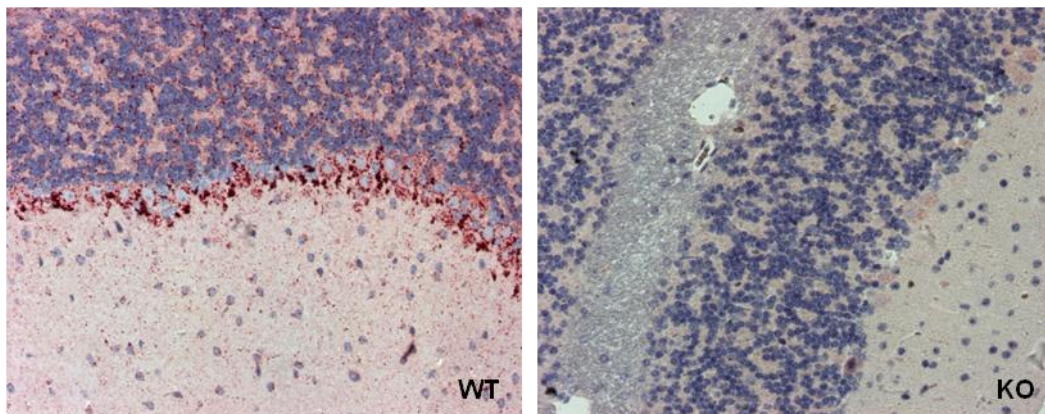
**Abb. 4.29 Ko-Immünpräzipitation von LIMP2 und N/C-terminalen Fragmenten des Reninrezeptor**

Hierzu wurden Cos7 Zellen mit LIMP2-Myc und Renrez-HA transfiziert. Zusätzlich wurden Cos7 Zellen mit Konstrukten transfiziert, die nur das N- oder C-terminale Fragmente des Reninrezeptors exprimieren (N-term, C-term). Aus dem Zelllysat wurde LIMP2 mittels  $\alpha$ -Myc präzipitiert und im Präzipitat wurde der Reninrezeptor mithilfe von  $\alpha$ -HA detektiert. Als Negativkontrolle dienten eGFP-transfizierte Cos7 Zellen. Eine Präzipitation des Reninrezeptors erfolgt nur als ganzes Protein. Die unspezifischen Streifen und Punkte im Western Blot des Lysats sind auf einen technischen Fehler zurückzuführen und als unspezifisch zu werten.

## 4.2 Interaktion von LIMP2 und (Pro-)Reninrezeptor (*in vivo*)

### 4.2.1 Lokalisation von endogenem LIMP2 im Kleinhirn

Nachdem mit verschiedensten Versuchen *in vitro* unter Überexpression des (Pro-)Reninrezeptors eine Interaktion mit LIMP2 nachgewiesen werden konnte, sollte zuletzt die Lokalisation des endogenen LIMP2 in der Niere mithilfe von Immunhistologie untersucht werden. Zunächst musste jedoch die immunhistologische Färbetechnik auf ihre Spezifität für LIMP2 überprüft werden, indem zerebellare Schnitte von Mäusen auf die Lokalisation von LIMP2 überprüft wurden. Dafür wurden entparaffinierte Schnitte in DACO-Puffer fixiert und mit  $\alpha$ -LIMP2 (1:1000) gefärbt (siehe Methoden 3.4.5). Da für LIMP2 bereits eine spezifische Ansammlung in der Purkinje-Zellschicht des Kleinhirns beschrieben wurde (Berkovic et al. 2008), konnte diese Färbung hier erneut bestätigt werden (siehe Abb. 4.30).

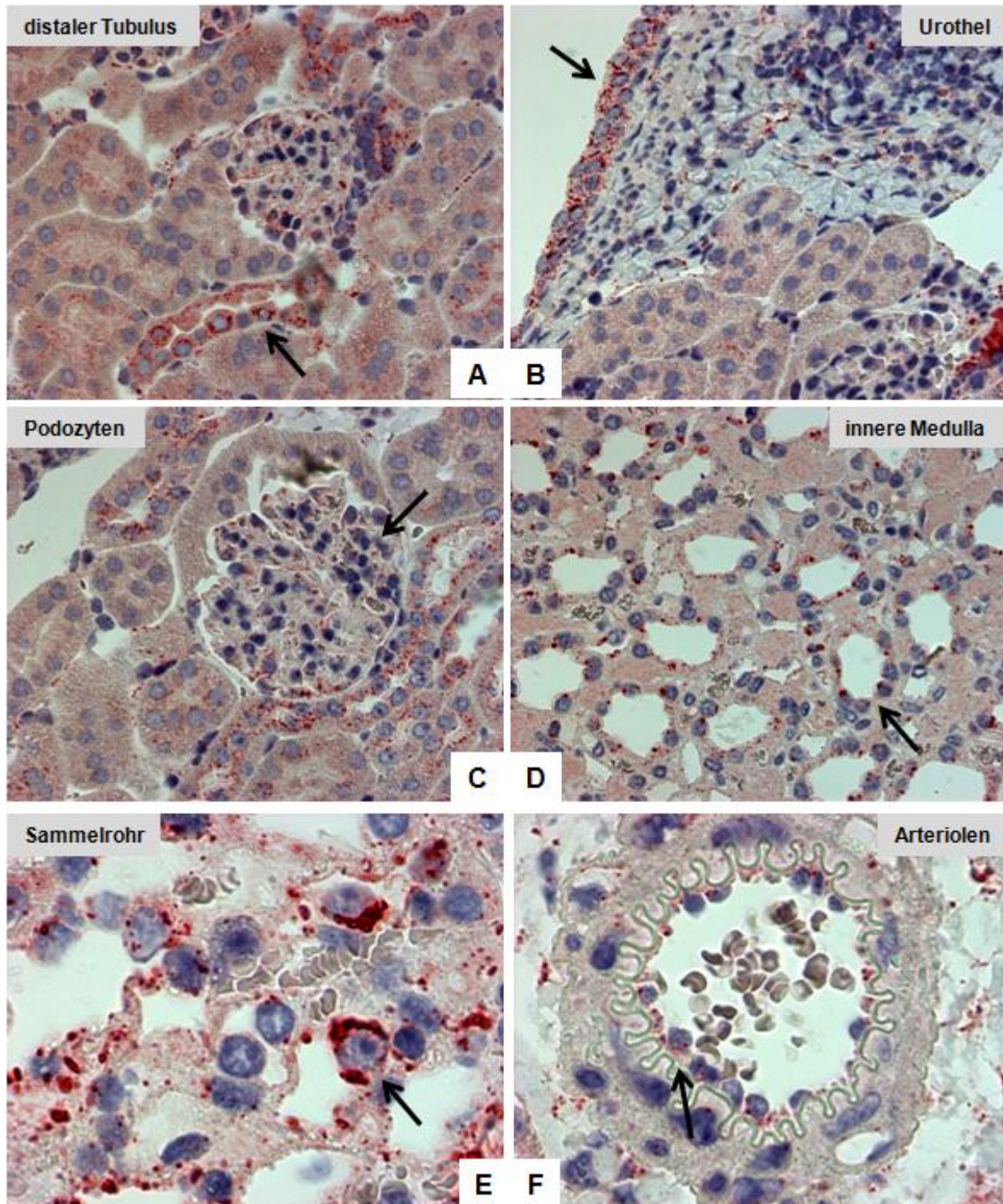


**Abb. 4.30 Immunhistologie von LIMP2 im Kleinhirn von Wildtyp- und LIMP2-defizienten Mäusen**

Als Kontrolle der immunhistologischen Färbetechnik wurden Kleinhirn-Gewebeschnitte von Wildtyp- und LIMP2-defizienten Mäusen mit  $\alpha$ -LIMP2 (1:1000) gefärbt. Dabei konnte die Färbung von *Badhwar, Berkovic et al. 2004* reproduziert werden. LIMP2 fand sich konzentriert in der Purkinje-Zellschicht. In LIMP2-defizienten Schnitten zeigt sich keine spezifische Färbung.

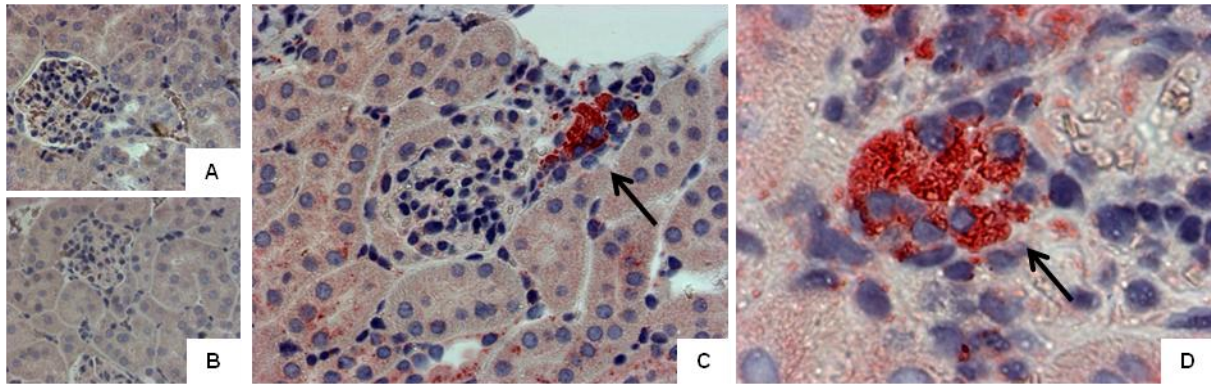
### 4.2.2 Lokalisation von endogenem LIMP2 in der Niere

Im Folgenden sollte die Lokalisation von LIMP2 in der Niere untersucht werden, um mögliche Anhaltspunkte für die renale Lokalisation der Interaktion mit dem (Pro-)Reninrezeptor zu gewinnen. Entparaffinierte renale Schnitte von WT- und LIMP2-defizienten Mäusen wurden in DACO-Puffer fixiert und mit  $\alpha$ -LIMP2 (1:1000) gefärbt. Dabei zeigte LIMP2 eine polymorphe Verteilung. Das lysosomale Protein fand sich sowohl in Zellen des distalen Tubulus, als auch in Urothelzellen. Des Weiteren zeigte sich eine Färbung in Podozyten des Glomerulus, in der inneren Medulla, in Schaltzellen des Sammelrohrs und darüber hinaus im Endothel von Arteriolen (siehe Abb. 4.31). Besonders auffällig war die äußerst kräftige Färbung von LIMP2 im juxtaglomerulären Apparat der Niere. In der stärksten Vergrößerung zeigten sich die Zellen komplett gefüllt mit LIMP2 (siehe Abb. 4.32).



**Abb. 4.31 Immunhistologische Färbung von LIMP2 in der Niere von WT-Mäusen**

Nieren-Gewebeschnitte von WT- und LIMP2-defizienten-Mäusen wurden mit  $\alpha$ -LIMP2 (1:1000) gefärbt und am Lichtmikroskop mit 40-facher Vergrößerung ausgewertet. Dabei zeigten sich die besten Ergebnisse mit einer Fixierung in DACO-Puffer. **WT:** **A** LIMP2 befindet sich im distalen Tubulus. **B** Auch das Urothel zeigt eine Färbung für LIMP2. **C** Des Weiteren findet sich LIMP2 in Podozyten. **D** Auch in der inneren Medulla kann LIMP2 lokalisiert werden. **E** In Sammelrohrzellen der Niere zeigt sich ebenfalls eine Färbung für LIMP2. **F** Zusätzlich findet man LIMP2 im Endothel von Arteriolen. Die Kontrollfärbung LIMP2-defizienter Nierenschnitte finden sich im Anhang auf S.101.

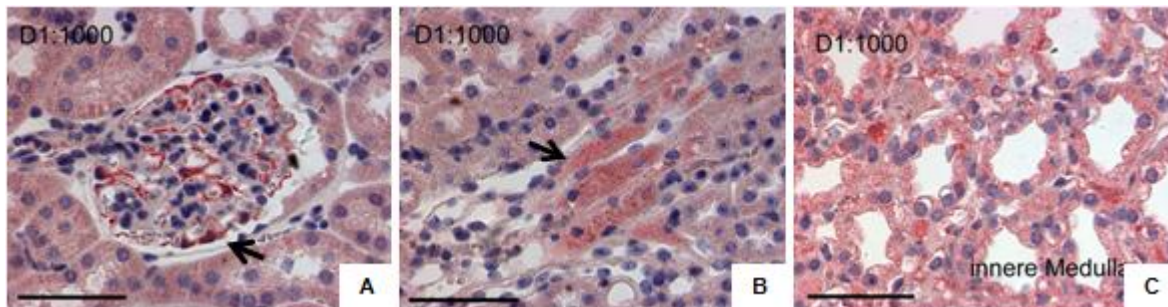


**Abb. 4.32 Lokalisation von LIMP2 im juxtaglomerulären Apparat der Niere**

Nieren-Gewebeschnitte von WT- und LIMP2-defiziente-Mäusen wurden mit  $\alpha$ -LIMP2 (1:1000) gefärbt und am Lichtmikroskop ausgewertet. **A+B** In **LIMP2-defizienten**-Schnitten zeigt sich keine spezifische Färbung.

**WT:** **C** Es zeigt sich ein sehr starkes Signal für LIMP2 im Bereich des juxtaglomerulären Apparats in der Nähe der Glomeruli bei 40-facher Vergrößerung. **D** In 100-facher Vergrößerung des juxtaglomerulären Apparats zeigen sich die Zellen ausgefüllt mit LIMP2. (schwarzer Pfeil = LIMP2).

Während LIMP2 eine spezifische Lokalisation in der Niere zeigte, war die immunhistologische Untersuchung des (Pro-)Reninrezeptors erschwert. Der zur Verfügung stehende Antikörper von G. Nguyen zeigte eher ein unspezifisches Muster verteilt über die verschiedenste Bereiche der Niere. Dabei zeigte sich ein Signal an den Podozyten im Glomerulus, im distalen Tubulus und in der inneren Medulla (siehe Abb. 4.33).



**Abb. 4.33 Immunhistologische Färbung des (Pro-)Reninrezeptor in der Niere**

Nieren-Gewebeschnitte von WT-Mäusen wurden mit  $\alpha$ -PRR (1:1000, G. Nguyen) gefärbt und am Lichtmikroskop ausgewertet. **A:** Der (Pro-)Reninrezeptor zeigte eine Färbung der Podozyten des Glomerulus (schwarzer Pfeil). Zusätzlich fand sich ein diffuses Signal im distalen Tubulus (schwarzer Pfeil in **B**) und eine Färbung in der inneren Medulla (**C**).

Zusammenfassend findet sich eine Lokalisation von LIMP2, als auch vom (Pro-)Reninrezeptor, sowohl im Glomerulus, als auch im distalen Tubulus und in der inneren Medulla der Niere.



## 5 Diskussion

Das Action Myoclonus and Renal Failure (AMRF) Syndrom wird durch Mutationen im lysosomalen Protein LIMP2 verursacht (Berkovic et al. 2008). Die Patienten leiden an einer Glomerulosklerose mit rasch folgendem Nierenversagen sowie einer myoklonischen Epilepsie und versterben im frühen Erwachsenenalter (Badhwar et al. 2004). Dem ubiquitär vorkommenden Transmembranprotein LIMP2 kommt in der Zelle eine wichtige Funktion als M6P-unabhängiger Transporter für die lysosomale  $\beta$ -Glukozerebrosidase zu (Reczek et al. 2007). Ein Defekt der  $\beta$ -Glukozerebrosidase resultiert in der bekanntesten lysosomalen Speichererkrankung, dem Morbus Gaucher, welcher sich durch Hepato- und Splenomegalie, Anämie, Thrombozytopenie und teilweise neurologische Symptome äußert (Jmoudiak et al. 2005). Die Symptomatik der AMRF Syndrom Patienten lässt sich jedoch nicht mit der Transportfunktion von LIMP2 für die  $\beta$ -Glukozerebrosidase erklären.

Durch die hier durchgeführten Experimente konnte ein weiterer Interaktionspartner von LIMP2 identifiziert werden: der (Pro-)Reninrezeptor. Dieser wurde im durchgeführten *Yeast Two-Hybrid Membrane Protein Screen* unter 37 putativen Kandidaten ausgewählt, da Patienten mit einer Mutation im (Pro-)Reninrezeptor ähnliche neurologische Symptome, wie AMRF Syndrom Patienten, in Form einer myoklonischen Epilepsie zeigen (Ramser et al. 2005). Des Weiteren findet sich in Ratten, bei denen der (Pro-)Reninrezeptor überexprimiert wurde, ebenfalls eine renale Symptomatik mit Proteinurie und Glomerulosklerose (Kaneshiro et al. 2007). Darüber hinaus wurde ein Teil des Reninrezeptors als Untereinheit der V-ATPase entdeckt, welche zu den lysosomalen Membranproteinen gehört und für die Ansäuerung des Lysosoms zuständig ist (Ludwig et al. 1998).

Der angewendete Screen unterscheidet sich von einem normalen *Yeast Two-Hybrid Screen* (Y2H Screen) dadurch, dass die Proteine *in situ* an der Membran interagieren können. Bei einem konventionellen *Yeast Two-Hybrid Screen* werden nur lösliche Fragmente der Membranproteine verwendet, damit diese in den Nukleus translozieren und dort die Transkription spezifischer Gene aktivieren können (Fields et al. 1989). Durch Koppelung der Membranproteine mit Ubiquitinhälften und Transkriptionsfaktoren, die nach Abspaltung des Ubiquitins in den Kern translozieren können, kann das Membranprotein in seiner vollen Länge exprimiert werden (Stagljar et al. 1998). Im angewandten Screen konnte eine Interaktion von LIMP2 und (Pro-)Reninrezeptor in unterschiedlichsten Kombinationen

nachgewiesen werden. Dabei wurden verschieden starke Promotoren verwendet und die Proteine sowohl als *bait* als auch als *prey* eingesetzt.

Die Vorteile des *Yeast Two-Hybrid* Systems liegen in der hohen Sensitivität und der Möglichkeit, dass die Interaktion *in vivo* stattfinden kann (Phizicky et al. 1995). Des Weiteren können selbst äußerst schwache Interaktionen mittels *Yeast Two-Hybrid* Systems identifiziert werden (Estojak et al. 1995). Es ist jedoch möglich, dass posttranslationale Modifikationen, die für eine Interaktion wichtig wären, in Hefezellen nicht vorhanden sind. Außerdem kann es zu einer veränderten Faltung der Proteine durch die Fusion mit Transkriptionsfaktoren kommen und dadurch die Interaktionsstelle verdeckt werden (Phizicky et al. 1995). Im hier durchgeführten Screen musste die Orientierung des Transmembranproteins (Pro-) Reninrezeptor beachtet werden. Es muss davon ausgegangen werden, dass das Signalpeptid des (Pro-)Reninrezeptors durch die Hefen nicht erkannt wird und damit eine zweite Transmembrandomäne am N-terminalen Ende des (Pro-)Reninrezeptors artifiziell entsteht.

Des Weiteren kann es zu falsch positiven Treffern im Screen kommen, wobei man technisch und biologisch falsch positive Interaktoren unterscheidet (Ratushny et al. 2008). Technisch falsch positive Interaktoren führen ohne jegliche Protein-Protein-Interaktion zu einer Aktivierung der Transkription, da sie zum Beispiel eine DNA-bindende Domäne besitzen (Fields 2005). Im hier durchgeführten Screen zeigten die Konstrukte pBT3-N-LIMP2 sowie pBT3-SUC-Renrez eine Selbstaktivierung.

Bei biologisch falsch positiven Interaktoren kommt es durch das Fehlen bestimmter Kompartimente in Hefezellen zu einem Aufeinandertreffen von Proteinen, die verwandte Erkennungssequenzen haben, sich aber in Säugetierzellen nicht begegnen. Man geht davon aus, dass bis zu 50% der im Screen gewonnen putativen Interaktoren falsch positiv sind (Ito et al. 2001; Mrowka et al. 2001). Bei einem anderen *Yeast Two-Hybrid Membrane Protein Screen* der Arbeitsgruppe Saftig / Schwake konnte der (Pro-) Reninrezeptor als falsch positiver Interaktor von ADAM10 identifiziert werden. Im Vergleich dazu stellte sich jedoch die Interaktion mit LIMP2 als korrekt heraus (siehe Abb. 4.4).

Ein weiteres Problem stellte die Expressionskontrolle der transformierten Proteine im Western Blot der Hefelysate dar. Hier konnten keine spezifischen Banden nachgewiesen werden, was sich eventuell durch die sofortige Abspaltung des LexA-Fragments erklären lässt, welches man zur Detektion verwenden wollte. Da die Abspaltung jedoch nicht in Hefen, die nur mit dem *bait* transformiert wurden, stattfinden sollte, muss an eine andere Erklärungen gedacht werden. Zum Beispiel, dass die Problematik durch eine sehr geringe Expression der Proteine aufgrund des schwachen Promotors im Vektor pBT3 oder durch

einen nicht funktionsfähigen Antikörper verursacht wird. Die Firma MoBiTec weist jedoch darauf hin, dass die Expressionskontrolle im Western Blot für die Aussagekraft des *Yeast Two-Hybrid* Systems keine Bedeutung hat, entscheidender ist das Wachstum auf den SC-Leu-Trp-Platten (MoBiTec 2010).

In der Literatur findet sich bereits eine *Yeast Two-Hybrid* Untersuchung des (Pro-)Reninrezeptors, bei der eine Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor *Promyelozinc Finger* (PLZF) entdeckt wurde (Scheffe et al. 2006).

Aufgrund der vielen Schwachstellen des *Yeast Two-Hybrid* Systems, unter anderem durch die akzessorische zweite Transmembrandomäne des (Pro-)Reninrezeptors, die leichte Selbstaktivierung einzelner Konstrukte sowie keine mögliche Expressionskontrolle im Western Blot, musste mit weiteren Methoden die putative Interaktion geprüft werden. Dazu wurden LIMP2 und der (Pro-)Reninrezeptor in Zellen komplexerer Organismen exprimiert.

Die Ko-Immunpräzipitation stellt eine der wichtigsten Methoden zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen dar. Der Vorteil dieser Methode im Vergleich zum *Yeast Two-Hybrid* System liegt darin, dass endogen gebildete Proteinkomplexe mit ihren natürlichen posttranslationalen Modifikationen aufgereinigt werden. Als Nachteil kann es zu möglichen Kreuzreaktionen der Antikörper kommen (Fields 2005).

Nach Überexpression von LIMP2 und (Pro-)Reninrezeptor in Cos7-Zellen konnte in der Ko-Immunpräzipitation eine Interaktion zwischen beiden Proteinen gezeigt werden. Der (Pro-)Reninrezeptor wurde jedoch auch mit dem Protein CD36 präzipitiert. CD36 gehört wie LIMP2 in die Gruppe der CD36 Scavenger Rezeptor Proteine (Klasse B) und weist über 30% identische Sequenz mit LIMP2 auf (Vega et al. 1991; Calvo et al. 1993; Calvo et al. 1995). Das könnte dafür sprechen, dass die Bindung des (Pro-)Reninrezeptors mit LIMP2 in einem Bereich stattfindet, in dem beide Scavenger Rezeptor Proteine homologe Anteile aufweisen. Des Weiteren muss aber auch daran gedacht werden, dass es sich beim Nachweis einer Interaktion von Membranproteinen um eine unspezifische Reaktion handeln kann, die durch das Vorhandensein beider Proteine zum Beispiel in *lipid rafts* erklärt werden kann.

Aufgrund der Tatsache, dass kein Antikörper gegen den endogenen (Pro-)Reninrezeptor vorlag, mussten alle Analysen unter Überexpression des Proteins mit einem angehängten HA-tag erfolgen. In Säugetierzellen gestaltete sich die Expression des (Pro-)Reninrezeptors jedoch als schwierig. Nachdem Untersuchungen zur Optimierung der Expressionsstärke und des Zelltyps durchgeführt worden waren, kristallisierte sich eine Zellernte 24 Stunden nach

Transfektion als optimaler Zeitpunkt heraus. Es zeigte sich eine bessere Exprimierbarkeit in den weit verbreiteten Zelllinien Cos7, Hela und Hek293T. Insgesamt zeigten sich ganz unterschiedliche Transfektionseffizienzen bei den LIMP2-defizienten Zellen, was eventuell durch unterschiedliche Passagezahlen der Zellkulturen erklärbar ist. Doch da auch die transiente Transfektion in diesen Zelllinien nicht immer gelang, wurde daraufhin eine stabil transfizierte HEK293T-Zelllinie eingeführt, die für die Immunfluoreszenzmikroskopie genutzt werden konnte. Zusätzlich wurden mithilfe eines retroviralen Transduktionssystems mit dem (Pro-)Reninrezeptor stabil transduzierte Wildtyp- und LIMP2-defiziente-Zelllinien erstellt, die Untersuchungen im Rahmen der Elektronenmikroskopie ermöglichten. Dabei wurde ein doppelt gesichertes virales Transduktionssystem verwendet, bei dem Retroviren die MEF-Zellen infizieren, sich danach aber nicht selbstständig vermehren können, da die notwendigen Gene für die Proteinmaschinerie des Retrovirus nur in der Verpackungszelllinie kodiert sind (Ketteler et al. 2002).

Durch licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen sollte die exakte intrazelluläre Lokalisation von LIMP2 und (Pro-)Reninrezeptor ermittelt werden.

Die Lokalisation von LIMP2 war bis dato nur mithilfe von Überexpressionstudien untersucht worden. Dabei hatte sich gezeigt, dass eine Überexpression von LIMP2 zu vergrößerten späten Endosomen und Lysosomen führte. Auf der begrenzenden Membran dieser großen Vakuolen fand man LIMP2 sowie LBPA und LAMP2 (Kuronita et al. 2002).

Im Rahmen der durchgeführten elektronenmikroskopischen Studien in Utrecht konnte erstmals die Lokalisation des endogenen Proteins LIMP2 untersucht werden. Dabei wurde eine Lokalisation auf der äußeren Membran sowie auf intraluminalen Vesikeln von *multivesicular bodies* und Lysosomen beobachtet.

Ein anderer interessanter Punkt war die Charakterisierung der intrazellulären Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptors. Hier fanden sich in der Literatur sehr widersprüchliche Angaben. So wurde eine Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptors an der Plasmamembran beschrieben (Nguyen et al. 2002). Andere Veröffentlichungen sprachen von einer intrazellulären Verteilung des (Pro-)Reninrezeptor im Bereich des Golgi-Apparats (Cousin et al. 2009). Nguyen verwendete den Antikörper Ig1645, dessen Spezifität jedoch in Frage gestellt werden muss. Dieser Antikörper zeigte in selbst durchgeführten Untersuchungen nur in retroviral transduzierten MEF-Zellen spezifische Banden, in histologischen Schnitten der Niere erschien das Signal eher diffus.

In der Immunfluoreszenz zeigte der (Pro-)Reninrezeptor eine Verteilung über mehrere Kompartimente der Zelle. Neben einem starken Fluoreszenzsignal in Kernnähe zeigten sich auch in der Peripherie punktförmige Färbungen. Eine Kolo­kalisierung mit ER-Marker, lysosomalem Marker und *cis*-Golgi-Marker war möglich, jedoch konnte der (Pro-)Reninrezeptors weder an der Plasmamembran noch im Zellkern eindeutig identifiziert werden. In der Elektronenmikroskopie konnte der (Pro-)Reninrezeptor entlang des sekretorischen Transportwegs an vielen verschiedenen Kompartimenten gefunden werden. Dabei zeigte sich eine Häufung im Golgi-Apparat, in *small vesicles* und *multivesicular bodies*.

Daraufhin wurde mithilfe von Doppelfärbungen die Kolo­kalisierung von LIMP2 und (Pro-)Reninrezeptor untersucht. In der Lichtmikroskopie wurden Fluoreszenzsignale unterschiedlicher Wellenlängen und in der Elektronenmikroskopie verschieden große Goldpartikel zur Differenzierung der beiden Proteine verwendet. Dabei zeigte sich eine eindeutige Kolo­kalisierung der beiden überexprimierten Proteine in vesikulären Strukturen in LIMP2-defizienten Zellen. In humanen HEK293T Zellen konnte die Kolo­kalisierung auch durch Markierung des endogenen Proteins LIMP2 dargestellt werden, jedoch war das Kolo­kalisierungssignal in HEK293T unter Überexpression beider Proteine stärker. Mithilfe von Schnittbildaufnahmen am konfokalen Mikroskop konnte gezeigt werden, dass die Kolo­kalisierung der beiden Proteine in allen Ebenen der Zelle zu finden ist, womit ein Überlagerungseffekt der Fluoreszenzsignale ausgeschlossen werden konnte. In der Elektronenmikroskopie konnten nachfolgend die vesikulären Strukturen, auf denen eine Kolo­kalisierung stattfindet, als äußere Membran und intraluminale Vesikel von *multivesicular bodies* identifiziert werden.

Anschließend wurde untersucht, ob LIMP2 für den (Pro-)Reninrezeptor eine Transportfunktion in der Zelle übernimmt. Hierzu wurde die Verteilung des Rezeptors im Vergleich von Wildtyp- und LIMP2-defizienten Zellen anhand von immunogold-gefärbten elektronenmikroskopischen Schnitten analysiert. Dabei konnte eine Veränderung in der Verteilung des (Pro-)Reninrezeptors in LIMP2-defizienten Zellen beobachtet werden. Der (Pro-)Reninrezeptor zeigte sich vermehrt in den frühen Kompartimenten des sekretorischen Proteintransportwegs, wie ER, Golgi-Apparat und *small vesicles*, und vermindert in späteren Kompartimenten, wie *multivesicular bodies* und Lysosomen. Ein statistisch signifikanter Unterschied in der Verteilung des (Pro-)Reninrezeptors zwischen Wildtyp- und LIMP2-

defizienten Zellen konnte für die Kompartimente *small vesicles* und *multivesicular bodies* berechnet werden ( $p < 0,05$ ).

Diese Ergebnisse deuten auf eine Rolle von LIMP2 im Transport des (Pro-)Reninrezeptors entlang des sekretorischen Transportwegs hin. Dabei könnte eine Mutation in LIMP2 zu einem verzögerten Transport des (Pro-)Reninrezeptors durch veränderte Affinität führen. Insgesamt muss aber davon ausgegangen werden, dass LIMP2 nicht alleiniges Transportprotein des (Pro-)Reninrezeptors sein kann, da der (Pro-)Reninrezeptor trotz Fehlen von LIMP2 aus dem Endoplasmatischen Retikulum transportiert wird und sich keine Akkumulation des Proteins findet.

Als weiterer Punkt sollte eine mögliche Interaktionsstelle charakterisiert werden. Dazu wurde speziell Bezug auf die *Coiled-Coil*-Domäne von LIMP2 genommen, die für den Transport der  $\beta$ -Glukozerebrosidase von entscheidender Bedeutung scheint (Blanz et al. 2010). Bei Untersuchungen des (Pro-)Reninrezeptors auf mögliche Bindungsmotive konnte ebenfalls eine *Coiled-Coil*-Domäne identifiziert werden, so dass eine Interaktion der beiden Proteine mithilfe der *Coiled-Coil*-Domäne vermutet wurde. Dieses Bindungsmotiv konnte aber durch Interaktionsstudien mithilfe von Ko-Immunpräzipitationen als unwahrscheinlich eingestuft werden. In diesen Analysen wurden Konstrukte eingesetzt, bei denen die Sekundärstruktur der *Coiled-Coil*-Domäne durch ausgetauschte Aminosäuren zerstört war. Die beiden Proteine LIMP2 und (Pro-)Reninrezeptor interagierten auch bei mutierter *Coiled-Coil*-Domäne in der Ko-Immunpräzipitation.

Aufgrund der Tatsache, dass die *Coiled-Coil*-Domäne als Interaktionsmotiv in den Hintergrund rückte, wurde versucht anhand der AMRF Syndrom Mutationen ein Bindungsmotiv zu ermitteln. Dazu wurden AMRF Syndrom Mutanten gemeinsam mit dem (Pro-)Reninrezeptor in Hefen exprimiert und die Interaktion mithilfe eines *Yeast Two-Hybrid* Systems analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass die AMRF Syndrom Mutationen zu keinem Verlust der Interaktion in Hefen führten. Die Mutationen der Familien B und C, die in einem sehr kurzen LIMP2-Protein mit einer Länge von 133 und 160 Aminosäuren resultieren, führen zu einer geringeren Affinität gegenüber dem (Pro-)Reninrezeptor. Alternativ könnte der Unterschied im Wachstum auf den Selektionsplatten eventuell durch Expressionsunterschiede der verschiedenen Mutanten erklärt werden.

Ein weiterer Ansatz für die Untersuchung des spezifischen Bindungsmotivs stellte die Frage, ob LIMP2 auch mit den Spaltfragmenten des (Pro-)Reninrezeptors interagiert. In der Literatur war eine Spaltung des (Pro-)Reninrezeptors in ein N-terminal lösliches Fragment

sowie ein C-Terminales membrandurchspannendes Fragment durch die Protease Furin beschrieben worden (Cousin et al. 2009). In einer anderen Veröffentlichung wird die Metalloprotease ADAM19 für die Spaltung des (Pro-)Reninrezeptors verantwortlich gemacht (Yoshikawa et al. 2011). In den von uns durchgeführten Western Blot Expressionsanalysen des (Pro-)Reninrezeptors zeigten sich jeweils zwei Spaltfragmente bei 11 und 17 kDa (siehe Abb 4.17), was auf zwei unterschiedliche Spaltungsenzyme schließen lässt.

Nach Expression von gentechnisch hergestellten Furin-Fragmenten des (Pro-)Reninrezeptors in Cos7 Zellen, wurden Zellysate gewonnen und LIMP2 aus dem Lysat präzipitiert. Im Präzipitat wurde dabei nur der (Pro-)Reninrezeptor als komplettes Molekül (Wildtyp) gefunden. Eine Detektion der C- oder N-terminalen Fragmente des (Pro-)Reninrezeptors im Präzipitat war nicht möglich.

Abschließend wurden immunhistologische Färbungen an Nierenschnitten durchgeführt, wobei die Lokalisation von LIMP2 untersucht wurde. Dabei konnte LIMP2 in vielen Abschnitten entlang des harnproduzierenden und -ableitenden Systems gefunden werden. Das Protein fand sich in Zellen des distalen Tubulus, in Urothelzellen, in Podozyten des Glomerulus, in Zellen des juxtaglomerulären Apparats, in der inneren Medulla sowie in Schaltzellen des Sammelrohrs und im Endothel von Arteriolen.

Die immunhistologische Untersuchung der Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptors war jedoch erschwert. Unter Verwendung des (Pro-)Reninrezeptors von G.Nguyen zeigte sich ein eher diffuses Signal an den Podozyten im Glomerulus, im distalen Tubulus und in der inneren Medulla. Aufgrund einer fehlenden Negativ-Kontrolle des Antikörpers gegen den (Pro-)Reninrezeptor konnte diese diffuse Färbung jedoch nicht auf ihre Spezifität verifiziert werden. In der Literatur ist eine Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptor in ganz unterschiedlichen Bereichen der Niere beschrieben worden. Zunächst war der (Pro-)Reninrezeptor im Mesangium der Glomeruli und in glatten Muskelzellen von vaskulären Strukturen beschrieben worden (Nguyen et al. 2002). Später wurde der (Pro-)Reninrezeptor auch im distalen Tubulus, sowie schwächer im proximalen Tubulus und an größeren Gefäßen lokalisiert (Krebs et al. 2007). Des Weiteren wurde eine Färbung im Sammelrohr in Schaltzellen des Typs A gezeigt (Advani et al. 2009).

Zusammenfassend ist eine Lokalisation von LIMP2, als auch vom (Pro-)Reninrezeptor, sowohl im Glomerulus, als auch im distalen Tubulus, der inneren Medulla und im Sammelrohr beschrieben worden.

Interessant ist die Färbung der Podozyten für LIMP2, da auch für den (Pro-)Reninrezeptor eine Lokalisation in Podozyten beschrieben worden ist (Ichihara et al. 2008). Podozyten bilden einen Teil der Filtrationsbarriere der Niere (Asanuma et al. 2003). Eine wichtige Rolle von Podozyten in der Entstehung der Glomerulosklerose wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (Wiggins 2009). Experimentell lässt sich zeigen, dass eine Beeinträchtigung der Podozyten eine wichtige Komponente in der Entstehung der Glomerulosklerose darstellt (Kretzler et al. 1994). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass genetische Störungen, die zu einer Glomerulosklerose führen, häufig Mutationen in Proteinen tragen, die in Podozyten exprimiert werden (Kestila et al. 1998). Da sowohl LIMP2 als auch der (Pro-)Reninrezeptor in Podozyten vorkommen und die AMRF Syndrom Patienten eine Glomerulosklerose zeigen, könnte dies ein möglicher Ort der Protein-Protein-Interaktion *in vivo* sein.

Des Weiteren spielt die Lokalisation von LIMP2 im Endothel von Arteriolen eine Rolle. So wurde für LIMP2 ein protektiver Effekt im Rahmen der Entstehung von Arteriosklerose beschrieben (Ishikawa et al. 2009), wohingegen in arteriosklerotisch verändertem Gewebe eine Hochregulation des (Pro-)Reninrezeptors sowie anderer Komponenten des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems beschrieben worden ist (Kaschina et al. 2009). Dies könnte dafür sprechen, dass eine Mutation in LIMP2 für eine veränderte Lokalisation / Expression des Reninrezeptors verantwortlich ist, was die Entstehung von arteriosklerotischen Veränderungen begünstigen könnte.

Eine Besonderheit stellte ein sehr kräftiges immunhistologisches Signal von LIMP2 im Bereich des juxtaglomerulären Apparats dar. In der Vergrößerung zeigten sich die Zellen komplett gefüllt mit LIMP2. Der juxtaglomeruläre Apparat ist für die Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushalts sowie des Blutdrucks zuständig. Hier werden die Substrate des (Pro-)Reninrezeptors Prorenin und Renin gebildet und sekretiert. Dabei stellt der juxtaglomeruläre Apparat das einzige funktionelle Kompartiment des Körpers dar, das Renin produziert (Barajas 1979). Dies könnte ein indirekter Hinweis für die Rolle der Protein-Protein-Interaktion von LIMP2 mit dem (Pro-)Reninrezeptor in der Niere über das Hormon Renin sein.

In Zukunft könnte die physiologische Rolle der Interaktion von LIMP2 und dem (Pro-)Reninrezeptor weiter untersucht werden, um die Pathophysiologie des AMRF Syndroms besser verstehen zu können. Sinnvoll wäre eine Analyse der Interaktion *in vivo* mithilfe eines Antikörpers gegen den endogenen (Pro-)Reninrezeptor. So könnte eine Koimmun-



präzipitation in aufgereinigten Glomerulum-Lysaten durchgeführt werden und eine Kollokalisierung von LIMP2 und (Pro-)Reninrezeptor im Gewebe, respektive im juxtaglomerulären Apparat, durch mikroskopische Methoden bestätigt werden.

Kürzlich wurde der (Pro-)Reninrezeptor als Teil eines Proteinkomplexes zusammen mit der V-ATPase zur Aktivierung des Wnt-Signalwegs identifiziert. Der Wnt-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung, in der Stammzellbiologie sowie in der Tumorgenese (Cruciat et al. 2010). Deshalb könnte die Rolle des (Pro-)Reninrezeptors in Zusammenhang mit der Aktivität des Wnt-Signalwegs im Vergleich von Wildtyp- und LIMP2-defizienten Mäusen untersucht werden, um eine mögliche Rolle in der Entstehung des AMRF Syndroms zu ermitteln.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Interaktion von LIMP2 mit dem Reninrezeptor eine Rolle in der Entstehung der myoklonen Epilepsie spielt, da dem Reninrezeptor eine putative Funktion in der Regulation von Aktionspotentialfrequenzen zugeschrieben wurde (Shan et al. 2008). Dies könnte die Anfälligkeit für myoklonische Krampfanfälle der AMRF Syndrom Patienten erklären.

Für die weitere Aufklärung des AMRF Syndroms sollte auch ein Blick auf die anderen putativen Interaktionspartner geworfen werden, welche im *Yeast Two-Hybrid* Screen identifiziert wurden. Dort findet sich zum Beispiel das Protein *Sacroglycan epsilon*, das in Zusammenhang mit myokloner Dystonie und Epilepsie gefunden worden ist und deshalb als Interaktionspartner verifiziert und auf seine Rolle im AMRF Syndrom untersucht werden könnte (Foncke et al. 2003; Asmus et al. 2005).

## 6 Zusammenfassung

Das Lysosom ist der Verdauungsapparat der Zelle, in ihm werden Stoffe durch lysosomale Proteasen abgebaut und in ihre Einzelbausteine zerlegt. Kommt es zu einem Defekt eines lysosomalen Enzyms, entsteht eine lysosomale Speichererkrankung mit Akkumulation des Substrats. Die bekannteste lysosomale Speichererkrankung ist der Morbus Gaucher. Hier liegt ein Defekt der lysosomalen Hydrolase  $\beta$ -Glukozerebrosidase vor. Die Patienten leiden unter einer Hepato- und Splenomegalie, Anämie, Thrombozytopenie und teilweise unter neurologischen Symptomen. Dabei stellte sich heraus, dass die  $\beta$ -Glukozerebrosidase Mannose-6-Phosphat unabhängig durch das lysosomale Membranprotein LIMP2 zum Lysosomen transportiert wird. Bei Mutationen in LIMP2 kommt es zum Action Myoclonus und Renal Failure (AMRF) Syndrom, welches durch eine fokale Glomerulosklerose der Niere und eine myoklonische Epilepsie gekennzeichnet ist. Da sich die Symptome des AMRF Syndroms nicht durch eine Fehlsortierung der  $\beta$ -Glukozerebrosidase erklären lassen, wurde nach möglichen weiteren Interaktionspartnern von LIMP2 gesucht, die die Pathophysiologie des Krankheitsbilds erklären könnten.

In einem *Yeast Two-Hybrid Screen* wurde das Protein (Pro-)Reninrezeptor als putativer Kandidat ausgewählt, da Patienten mit einer Mutation des (Pro-)Reninrezeptors ebenfalls an einer myoklonen Epilepsie leiden und Ratten mit einem überexprimierten Rezeptor eine Proteinurie und Glomerulosklerose zeigen. Die Interaktion von LIMP2 und (Pro-)Reninrezeptor wurde daraufhin in Zellen komplexerer Organismen durch Ko-Immunpräzipitation bestätigt. Des Weiteren konnten die beiden Proteine mithilfe von licht- und elektronenmikroskopischen Studien auf *multivesicular bodies* kolokalisiert werden. Als Bindungsmotiv für die Interaktion konnte durch Ko-Immunpräzipitationen die *Coiled-Coil*-Domäne der beiden Proteine als unwahrscheinlich eingestuft werden. Hingegen konnte gezeigt werden, dass LIMP2 nur mit dem kompletten (Pro-)Reninrezeptor interagiert und nicht mit seinem N- oder C-terminalen Spaltfragment. Abschließend ließ sich außerdem feststellen, dass LIMP2 in der Niere immunhistologisch auffällige Färbungen im Bereich des juxtaglomerulären Apparats aufweist. Dieser ist für die Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushalt sowie den Blutdruck zuständig und produziert als einziger Ort im menschlichen Körper den hormonellen Liganden des (Pro-)Reninrezeptors, das Enzym Renin. Damit konnte ein indirekter Hinweis für die Rolle der Protein-Protein-Interaktion von LIMP2 mit dem (Pro-)Reninrezeptor in der Niere geliefert werden.

## 7 Literaturverzeichnis

- Advani, A., D. J. Kelly, et al. (2009). "The (Pro)renin receptor: site-specific and functional linkage to the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in the kidney." Hypertension **54**(2): 261-9.
- Andermann, E., F. Andermann, et al. (1986). "Action myoclonus-renal failure syndrome: a previously unrecognized neurological disorder unmasked by advances in nephrology." Advances in neurology **43**: 87-103.
- Asanuma, K. and P. Mundel (2003). "The role of podocytes in glomerular pathobiology." Clinical and experimental nephrology **7**(4): 255-9.
- Asmus, F., F. Salih, et al. (2005). "Myoclonus-dystonia due to genomic deletions in the epsilon-sarcoglycan gene." Annals of neurology **58**(5): 792-7.
- Badhwar, A., S. F. Berkovic, et al. (2004). "Action myoclonus-renal failure syndrome: characterization of a unique cerebro-renal disorder." Brain : a journal of neurology **127**(Pt 10): 2173-82.
- Ballabio, A. and V. Gieselmann (2009). "Lysosomal disorders: from storage to cellular damage." Biochimica et biophysica acta **1793**(4): 684-96.
- Balreira, A., P. Gaspar, et al. (2008). "A nonsense mutation in the LIMP-2 gene associated with progressive myoclonic epilepsy and nephrotic syndrome." Hum Mol Genet **17**(14): 2238-43.
- Barajas, L. (1979). "Anatomy of the juxtaglomerular apparatus." The American journal of physiology **237**(5): F333-43.
- Berkovic, S. F., L. M. Dibbens, et al. (2008). "Array-based gene discovery with three unrelated subjects shows SCARB2/LIMP-2 deficiency causes myoclonus epilepsy and glomerulosclerosis." Am J Hum Genet **82**(3): 673-84.
- Blake-Palmer, K. G. and F. E. Karet (2009). "Cellular physiology of the renal H<sup>+</sup>ATPase." Current opinion in nephrology and hypertension **18**(5): 433-8.
- Blanz, J., J. Groth, et al. (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**(4): 563-72.
- Bowen, B., J. Steinberg, et al. (1980). "The detection of DNA-binding proteins by protein blotting." Nucleic acids research **8**(1): 1-20.
- Braulke, T. and J. S. Bonifacino (2009). "Sorting of lysosomal proteins." Biochimica et biophysica acta **1793**(4): 605-14.
- Burckle, C. A., A. H. Jan Danser, et al. (2006). "Elevated blood pressure and heart rate in human renin receptor transgenic rats." Hypertension **47**(3): 552-6.
- Calvo, D., J. Dopazo, et al. (1995). "The CD36, CLA-1 (CD36L1), and LIMPII (CD36L2) gene family: cellular distribution, chromosomal location, and genetic evolution." Genomics **25**(1): 100-6.
- Calvo, D. and M. A. Vega (1993). "Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family." The Journal of biological chemistry **268**(25): 18929-35.

- Caro, L. G. and G. E. Palade (1964). "PROTEIN SYNTHESIS, STORAGE, AND DISCHARGE IN THE PANCREATIC EXOCRINE CELL. AN AUTORADIOGRAPHIC STUDY." J Cell Biol **20**: 473-95.
- Carrasco-Marin, E., L. Fernandez-Prieto, et al. (2011). "LIMP-2 links late phagosomal trafficking with the onset of the innate immune response to *Listeria monocytogenes*: a role in macrophage activation." The Journal of biological chemistry **286**(5): 3332-41.
- Chatterjee, D., M. Chakraborty, et al. (1992). "Sensitivity to vanadate and isoforms of subunits A and B distinguish the osteoclast proton pump from other vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **89**(14): 6257-61.
- Clague, M. J., S. Urbe, et al. (1994). "Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation." The Journal of biological chemistry **269**(1): 21-4.
- Cousin, C., D. Bracquart, et al. (2009). "Soluble form of the (pro)renin receptor generated by intracellular cleavage by furin is secreted in plasma." Hypertension **53**(6): 1077-82.
- Cresswell, P. (1994). "Assembly, transport, and function of MHC class II molecules." Annu Rev Immunol **12**: 259-93.
- Cruciat, C. M., B. Ohkawara, et al. "Requirement of prorenin receptor and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase-mediated acidification for Wnt signaling." Science (New York, N.Y.) **327**(5964): 459-63.
- Cruciat, C. M., B. Ohkawara, et al. (2010). "Requirement of prorenin receptor and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase-mediated acidification for Wnt signaling." Science (New York, N.Y.) **327**(5964): 459-63.
- Cuervo, A. M. and J. F. Dice (1998). "Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases." J Mol Med **76**(1): 6-12.
- Dardis, A., M. Filocamo, et al. (2009). "Biochemical and molecular findings in a patient with myoclonic epilepsy due to a mistarget of the beta-glucosidase enzyme." Mol Genet Metab **97**(4): 309-11.
- De Duve, C. (1963). "The lysosome." Scientific American **208**: 64-72.
- Dibbens, L. M., R. Michelucci, et al. (2009). "SCARB2 mutations in progressive myoclonus epilepsy (PME) without renal failure." Ann Neurol **66**(4): 532-6.
- Dower, W. J., J. F. Miller, et al. (1988). "High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation." Nucleic acids research **16**(13): 6127-45.
- Eskelinen, E. L., Y. Tanaka, et al. (2003). "At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins." Trends in cell biology **13**(3): 137-45.
- Estojak, J., R. Brent, et al. (1995). "Correlation of two-hybrid affinity data with in vitro measurements." Molecular and cellular biology **15**(10): 5820-9.
- Fields, S. (2005). "High-throughput two-hybrid analysis. The promise and the peril." The FEBS journal **272**(21): 5391-9.
- Fields, S. and O. Song (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." Nature **340**(6230): 245-6.
- Foncke, E. M., C. Klein, et al. (2003). "Hereditary myoclonus-dystonia associated with epilepsy." Neurology **60**(12): 1988-90.
- Forgac, M. (1998). "Structure, function and regulation of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases." FEBS letters **440**(3): 258-63.

- Forgac, M. (1999). "Structure and properties of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases." The Journal of biological chemistry **274**(19): 12951-4.
- Forster, S. and J. B. Lloyd (1988). "Solute translocation across the mammalian lysosome membrane." Biochim Biophys Acta **947**(3): 465-91.
- Funato, K., W. Beron, et al. (1997). "Reconstitution of phagosome-lysosome fusion in streptolysin O-permeabilized cells." J Biol Chem **272**(26): 16147-51.
- Futerman, A. H. and G. van Meer (2004). "The cell biology of lysosomal storage disorders." Nature reviews. Molecular cell biology **5**(7): 554-65.
- Gamp, A. C., Y. Tanaka, et al. (2003). "LIMP-2/LGP85 deficiency causes ureteric pelvic junction obstruction, deafness and peripheral neuropathy in mice." Human molecular genetics **12**(6): 631-46.
- Gluzman, Y. (1981). "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants." Cell **23**(1): 175-82.
- Harauz, G., V. Ladizhansky, et al. (2009). "Structural polymorphism and multifunctionality of myelin basic protein." Biochemistry **48**(34): 8094-104.
- Hare, J. F. (1990). "Mechanisms of membrane protein turnover." Biochim Biophys Acta **1031**(1): 71-90.
- He, M., L. Zhang, et al. (2009). "Inhibition of renin/prorenin receptor attenuated mesangial cell proliferation and reduced associated fibrotic factor release." European journal of pharmacology **606**(1-3): 155-61.
- Hilgers, K. F. (2009). "[The renin-angiotensin system]." Der Urologe. Ausg. A **48**(8): 925-33; quiz 934-5.
- Honing, S., I. V. Sandoval, et al. (1998). "A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3." EMBO J **17**(5): 1304-14.
- Ichihara, A., Y. Kaneshiro, et al. (2006). "Nonproteolytic activation of prorenin contributes to development of cardiac fibrosis in genetic hypertension." Hypertension **47**(5): 894-900.
- Ichihara, A., M. Sakoda, et al. (2008). "Involvement of (pro)renin receptor in the glomerular filtration barrier." Journal of molecular medicine (Berlin, Germany) **86**(6): 629-35.
- Ishikawa, Y., M. Kimura-Matsumoto, et al. (2009). "Distribution of smooth muscle cells and macrophages expressing scavenger receptor BI/II in atherosclerosis." Journal of atherosclerosis and thrombosis **16**(6): 829-39.
- Ito, T., T. Chiba, et al. (2001). "A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(8): 4569-74.
- Jmoudiak, M. and A. H. Futerman (2005). "Gaucher disease: pathological mechanisms and modern management." British journal of haematology **129**(2): 178-88.
- Johnsson, N. and A. Varshavsky (1994). "Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**(22): 10340-4.
- Kaneshiro, Y., A. Ichihara, et al. (2007). "Slowly progressive, angiotensin II-independent glomerulosclerosis in human (pro)renin receptor-transgenic rats." Journal of the American Society of Nephrology : JASN **18**(6): 1789-95.

- Kaneshiro, Y., A. Ichihara, et al. (2006). "Increased expression of cyclooxygenase-2 in the renal cortex of human prorenin receptor gene-transgenic rats." Kidney international **70**(4): 641-6.
- Kaschina, E., H. Scholz, et al. (2009). "Transition from atherosclerosis to aortic aneurysm in humans coincides with an increased expression of RAS components." Atherosclerosis **205**(2): 396-403.
- Kestila, M., U. Lenkkeri, et al. (1998). "Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome." Molecular cell **1**(4): 575-82.
- Ketteler, R., S. Glaser, et al. (2002). "Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors." Gene therapy **9**(8): 477-87.
- Knipper, M., C. Claussen, et al. (2006). "Deafness in LIMP2-deficient mice due to early loss of the potassium channel KCNQ1/KCNE1 in marginal cells of the stria vascularis." J Physiol **576**(Pt 1): 73-86.
- Kornfeld, S. and I. Mellman (1989). "The biogenesis of lysosomes." Annual review of cell biology **5**: 483-525.
- Krebs, C., I. Hamming, et al. (2007). "Antihypertensive therapy upregulates renin and (pro)renin receptor in the clipped kidney of Goldblatt hypertensive rats." Kidney international **72**(6): 725-30.
- Kretzler, M., I. Koeppen-Hagemann, et al. (1994). "Podocyte damage is a critical step in the development of glomerulosclerosis in the uninephrectomised-desoxycorticosterone hypertensive rat." Virchows Archiv : an international journal of pathology **425**(2): 181-93.
- Kuronita, T., E. L. Eskelinen, et al. (2002). "A role for the lysosomal membrane protein LGP85 in the biogenesis and maintenance of endosomal and lysosomal morphology." Journal of cell science **115**(Pt 21): 4117-31.
- Lang, S. (2004). Konstruktion und Charakterisierung eines konstitutiv aktiven Zytokin Rezeptors: gp130.
- Ludwig, J., S. Kerscher, et al. (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**(18): 10939-47.
- Lundberg, K. S., D. D. Shoemaker, et al. (1991). "High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*." Gene **108**(1): 1-6.
- Lupas, A., M. Van Dyke, et al. (1991). "Predicting coiled coils from protein sequences." Science **252**(5010): 1162-4.
- Marshansky, V. and M. Futai (2008). "The V-type H<sup>+</sup>-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function." Current opinion in cell biology **20**(4): 415-26.
- Martinez-Zaguilan, R., R. M. Lynch, et al. (1993). "Vacuolar-type H<sup>(+)</sup>-ATPases are functionally expressed in plasma membranes of human tumor cells." The American journal of physiology **265**(4 Pt 1): C1015-29.
- Mason, J. M. and K. M. Arndt (2004). "Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications." ChemBiochem **5**(2): 170-6.

- Meivar-Levy, I., M. Horowitz, et al. (1994). "Analysis of glucocerebrosidase activity using N-(1-[<sup>14</sup>C]hexanoyl)-D-erythroglucosylsphingosine demonstrates a correlation between levels of residual enzyme activity and the type of Gaucher disease." The Biochemical journal **303** ( Pt 2): 377-82.
- MoBiTec (2010). Y2H Membrane Pairwise Interaction Kit Handbook; Online Support: putative false positive interactors in the Y2H membrane system. **Version 3.0**.
- Moriyama, Y., M. Maeda, et al. (1992). "The role of V-ATPase in neuronal and endocrine systems." The Journal of experimental biology **172**: 171-8.
- Mrowka, R., A. Patzak, et al. (2001). "Is there a bias in proteome research?" Genome research **11**(12): 1971-3.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods in enzymology **155**: 335-50.
- Nabi, A. H., A. Kageshima, et al. (2006). "Binding properties of rat prorenin and renin to the recombinant rat renin/prorenin receptor prepared by a baculovirus expression system." Int J Mol Med **18**(3): 483-8.
- Nguyen, G., F. Delarue, et al. (2002). "Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin." The Journal of clinical investigation **109**(11): 1417-27.
- Nguyen, G. and D. N. Muller (2010). "The biology of the (pro)renin receptor." Journal of the American Society of Nephrology : JASN **21**(1): 18-23.
- Peroz, D., N. Rodriguez, et al. (2008). "Kv7.1 (KCNQ1) properties and channelopathies." The Journal of physiology **586**(7): 1785-9.
- Phizicky, E. M. and S. Fields (1995). "Protein-protein interactions: methods for detection and analysis." Microbiological reviews **59**(1): 94-123.
- Quarles, R. H. (2002). "Myelin sheaths: glycoproteins involved in their formation, maintenance and degeneration." Cellular and molecular life sciences : CMLS **59**(11): 1851-71.
- Ramser, J., F. E. Abidi, et al. (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**(8): 1019-27.
- Ratushny, V. and E. Golemis (2008). "Resolving the network of cell signaling pathways using the evolving yeast two-hybrid system." BioTechniques **44**(5): 655-62.
- Re, R. N. (1984). "Cellular biology of the renin-angiotensin systems." Arch Intern Med **144**(10): 2037-41.
- Reczek, D., M. Schwake, et al. (2007). "LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase." Cell **131**(4): 770-83.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **74**(12): 5463-7.
- Schefe, J. H., M. Menk, et al. (2006). "A novel signal transduction cascade involving direct physical interaction of the renin/prorenin receptor with the transcription factor promyelocytic zinc finger protein." Circulation research **99**(12): 1355-66.

- Schroen, B., J. J. Leenders, et al. (2007). "Lysosomal integral membrane protein 2 is a novel component of the cardiac intercalated disc and vital for load-induced cardiac myocyte hypertrophy." J Exp Med **204**(5): 1227-35.
- Shan, Z., A. E. Cuadra, et al. (2008). "Characterization of a functional (pro)renin receptor in rat brain neurons." Experimental physiology **93**(5): 701-8.
- Slot, J. W. and H. J. Geuze (2007). "Cryosectioning and immunolabeling." Nat Protoc **2**(10): 2480-91.
- Southern, E. M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." J Mol Biol **98**(3): 503-17.
- Stagljar, I., C. Korostensky, et al. (1998). "A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(9): 5187-92.
- Steinman, R. M., I. S. Mellman, et al. (1983). "Endocytosis and the recycling of plasma membrane." J Cell Biol **96**(1): 1-27.
- Stevens, T. H. and M. Forgac (1997). "Structure, function and regulation of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPase." Annual review of cell and developmental biology **13**: 779-808.
- Szewczyk, E., T. Nayak, et al. (2006). "Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*." Nature protocols **1**(6): 3111-20.
- Tindall, K. R. and T. A. Kunkel (1988). "Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase." Biochemistry **27**(16): 6008-13.
- Tokuyasu, K. and S. Okamura (1959). "A new method for making glass knives for thin sectioning." The Journal of biophysical and biochemical cytology **6**: 305-8.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.
- Vega, M. A., B. Segui-Real, et al. (1991). "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**(25): 16818-24.
- Walter, P. and A. E. Johnson (1994). "Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane." Annu Rev Cell Biol **10**: 87-119.
- White, J. M. (1992). "Membrane fusion." Science (New York, N.Y.) **258**(5084): 917-24.
- Wiggins, J. (2009). "Podocytes and glomerular function with aging." Seminars in nephrology **29**(6): 587-93.
- Yamayoshi, S. and S. Koike (2011). "Identification of a Human SCARB2 Region That Is Important for Enterovirus 71 Binding and Infection." Journal of virology **85**(10): 4937-46.
- Yamayoshi, S., Y. Yamashita, et al. (2009). "Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71." Nat Med **15**(7): 798-801.
- Yoshikawa, A., Y. Aizaki, et al. (2011). "The (pro)renin receptor is cleaved by ADAM19 in the Golgi leading to its secretion into extracellular space." Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension **34**(5): 599-605.



## 8 Anhang

### 8.1 Material

#### 8.1.1 Geräte

Agarosegelkammer	(Mini) Sub-Cell GT, BioRad, München, D
Analysewaage	Modell 770-60, Kern & Sohn, Dürrwangen, D
Chemilumineszenzkamera	LAS-3000mini, Fujifilm, Tokyo, Japan
DNA-Photometer	GeneQuant pro, Biochrom Ltd, Cambridge, UK Nanodrop ND-1000, PegLab, Erlangen, D
Elektroporationsgerät	Gene Pulser™, BioRad, München, D
Elektroporationsküvetten	25x2 mm, PeqLab, Erlangen D
Horizontalschüttler	KL2, Bühler, Hechingen, D
Inkubatoren (Zellkultur)	Heraeus, Hanau, D
Inkubatoren (Bakterien)	Memmert, Schwabach, D Heraeus, Hanau, D Gallenkamp, Loughborough, UK
Inkubatoren (Hefen)	WTB, Binder, Tuttlingen, D Multitron II, Infors, Bottmingen, CH
Leica Knife Maker	Model KMR3, Leica, Solms, D
96-well- Mikrotiterplattenleser	Sunrise, Tecan, Grailsheim, D
Mikropipetten	Gilson, Middleton, WI, USA und Eppendorf, Hamburg, D
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M, Carl Zeiss, Jena, D Konfokale LSM Olympus IX81, Hamburg, D
Mikrotom	Cryo-Mikrotom, Leica SM2000R, Leica, Wetzlar, D und
PCR-Cycler	GeneAmp PCR system 2400, PerkinElmer, Wellesley, MA, USA
pH-Elektrode	Digital-pH-Meter 646, Krick, Langenselbold
SDS-PAGE Kammer	Mini-Protean 3-Elektrophoresis-System, BioRad, Hercules, USA
<i>Semi-dry-Blot</i> -Apparatur	Transblot SD, BioRad, München, D
Spannungsquelle	Powerpack 200/300, BioRad, München, D
Sterilbank	danLAF VFR 1806, Claus Damm A/S, Humlebaek, DK
<i>Tank-Blot</i> -Apparatur	Trans-Blot Cell, BioRad, München, D Mini Trans-Blot Cell, BioRad, München, D
Thermoblock	Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg, D
Ultraschallbad	Branson Sonifier 450, G.Heinemann, Schwäbisch-Gmünd, D
UV-Dokumentationsanlage	Gel Jet Imager, Intas, Göttingen, D
UV-Tisch	Reprostar, Camag, Muttenz, Schweiz
Zellzählgerät	CASY Model DT, innovatis AG, Reutlingen, D
Zentrifugen	Tischzentrifuge: Centrifuge 5415C und D, Eppendorf, Hamburg, D oder Biofuge vito, Heraeus, Hanau, D

Hämatokrit-Zentrifuge: EBA21, Hettich, Tuttlingen, D  
 Universal 32, Typ 1605, Hettich, Tuttlingen, D  
 Zentrifuge J2-21, Beckmann Fullerton, CA, USA  
 Zentrifuge GS-614R, Beckmann, Fullerton, CA, USA

### 8.1.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	rund, Durchmesser d = 13 cm, Assistent, Sondheim, D
Kunststoffverbrauchsmaterial	Sarstedt, Nümbrecht, D
Nitrocellulosemembran	Whatman Protran Nitrocellulose Transfer Membran, Whatman GmbH, Dassel, D
Objektträger	Menzel GmbH, Braunschweig, D
Parafilm „M“	American National Can™, Chicago, IL, USA
Plastik-Einmalpipetten	5/10ml, Sarstedt, Nümbrecht, D
Sterilfilter	Filtropur S 02, Sarstedt, Nümbrecht, D
Western-Blot-Papier	Whatman, Roth, Karlsruhe, D

### 8.1.3 Chemikalien

30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid	Rotiphorese Gel 30, Roth, Karlsruhe, D
Agarose	Ultra-Qualität, Roth, Karlsruhe, D
(low-melting) Agarose	Sigma Aldrich, Steinheim, D
APS	p.a., Roth, Karlsruhe, D
BSA	Albumin FraktionV, Protease-frei, ≥98%, Roth, Karlsruhe, D
Bromphenolblau	Canalco, Bethesda, MD, USA
Complete Protease-Inhibitor	Cocktail Tabletten (mit/ohne EDTA), Roche, Mannheim, D
DABCO	Sigma Aldrich, Steinheim, D
DAPI	Sigma Aldrich, Steinheim, D
ddH <sub>2</sub> O	Millipore, Billerica, USA, Membrapure, Bodenheim, D
DMSO	Sigma Aldrich, Steinheim, D
EDTA	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol	99,8%, p.a., Roth, Karlsruhe, D
Ethidiumbromidlösung	1 %-ig, Roth, Karlsruhe, D
FCS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, D
Glukose	> 97%, Sigma Aldrich, Steinheim, D
Glutaraldehyd	25 %, Merck, Darmstadt, D
Glycerol/Glycerin	≥ 86%, Ph.Eur., reinst, Roth, Karlsruhe, D
Glycin	≥ 99%, p.a., Roth, Karlsruhe, D
Isopropanol	p.a., Roth, Karlsruhe, D
Kaliumdihydrogenphosphat	≥ 99%, p.a., Roth, Karlsruhe, D
<i>Lysotracker Red</i>	DND-99, Invitrogen, Paisley, UK
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe, D
2-Mercaptoethanol	p.a., Roth, Karlsruhe, D
Methanol	Roth, Karlsruhe, D
Mowiol	4-88 Reagent, Calbiochem, LaJolla, CA, USA

Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe, D
Paraformaldehyd	purum, $\geq 95\%$ , Fluka, Buchs, Schweiz
Ponceau S-Lösung	0,1%-ig in 5% Essigsäure, Sigma Aldrich, Steinheim, D
Protein-A-Gold (PAG)	J. Klumperman, Utrecht; Größen: 10nm, 15nm, 20nm, (1:70)
Protein-G-Sepharose	Immobilized Protein G, Pierce, Rockford, IL, USA
Tris	Roth, Karlsruhe, D
Trypsin/EDTA	1x, PAA-Laboratories, Linz, Österreich

#### 8.1.4 Detergenzien

Saponin	rein, Roth, Karlsruhe, D
Triton X-100	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Tween-20	Sigma Aldrich, Steinheim, D

#### 8.1.5 Enzyme, Nukleotiden und DNA-Standards

cDNA m/h Reninrezeptor	GeneArt, Invitrogen, Paisley, UK
CIAP	Fermentas, St. Leon-Rot, D
DNA-Auftragspuffer	6x Loading Dye, Fermentas, St. Leon-Rot, D
DNA-1kb-Marker	DNA-Längenstandard X, Roche, Mannheim, D
DNA-Polymerase <i>Pfu</i>	Fermentas, St. Leon-Rot, D
DNA-Polymerase <i>Taq</i>	Fermentas, St. Leon-Rot, D
dNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Lachsspermien-DNA	10 mg/ml, Invitrogen, Paisley, UK
T4-DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot, D

#### 8.1.6 Kits zur Bearbeitung von DNA und Proteinen

BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford IL, USA
ECLadvanced WB detection System	Amersham, Little Chalfont, UK
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Fermentas, St. Leon-Rot, D
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche, Mannheim, D
Pure Yield Plasmid Midiprep System	Promega, Mannheim, D

#### 3.1.7 Vektoren

Vektorname	Resistenz	Protein	Tag	Herkunft
pAI-Alg5	Amp	Alg-NubG	-	MobiTec
pASDL-C/N-LimpII	Amp	mLIMP2	NubG	AG Schwake
pASDL-C/N-Renrez	Amp	mRenrez	NubG	AG Schwake
pASDL-hLIMP2	Amp	hLIMP2	NubG	AG Schwake
pASDL-LIMP2-CaseB	Amp	hLIMP2	NubG	AG Schwake
pASDL-LIMP2-CaseC	Amp	hLIMP2	NubG	AG Schwake
pASDL-LIMP2-deltaCC	Amp	hLIMP2	NubG	AG Schwake
pASDL-LIMP2-Porto	Amp	hLIMP2	NubG	AG Schwake
pASDL-LIMP2-Quebec	Amp	hLIMP2	NubG	AG Schwake

pBT3-C/N-mLimpII	Kan	mLIMP2	LexA	eigene Herstellung
pBT3-C/N-mRenrez	Kan	mRenrez	LexA	AG Schwake
pBT3-Suc-C-mRenrez	Kan	mRenrez	LexA	eigene Herstellung
pDL2-Alg5	Amp	Alg-Nubi	-	MobiTec
peGFP	Kan	eGFP	-	AG Schwake
pFROG-eGFP	Amp	eGFP	-	AG Schwake
pFROG-hCD36-Myc	Amp	hCD36	c-Myc	AG Schwake
pFROG-hLIMP2-Myc	Amp	hLIMP2	c-Myc	AG Schwake
pFROG-hRenrez-HA	Amp	hRenrez	c-HA	eigene Herstellung
pFROG-LAMP2-Myc	Amp	mLAMP2	c-Myc	AG Schwake
pFROG-LimpII-dsRed	Amp	mLIMP2	dsRed	AG Schwake
pFROG-LimpII-eGFP	Amp	mLIMP2	eGFP	AG Schwake
pFROG-LimpII-HA	Amp	mLIMP2	c-HA	AG Schwake
pFROG-LimpII-Myc	Amp	mLIMP2	c-Myc	AG Schwake
pFROG-LimpI-Myc	Amp	mLIMP1	c-Myc	AG Schwake
pFROG-mLIMP2-ER-Ret	Amp	mLIMP2	c-Myc	AG Schwake
pFROG-mLIMP2-mutCC	Amp	mLIMP2	c-Myc	AG Schwake
pFROG-mRenrez	Amp	mRenrez	-	eigene Herstellung
pFROG-mRenrez-C-term-HA	Amp	mRenrez	c-HA	eigene Herstellung
pFROG-mRenrez-N-term-HA	Amp	mRenrez	c-HA	eigene Herstellung
pFROG-mRenrez-TMD-HA	Amp	mRenrez	c-HA	eigene Herstellung
pFROG-Renrez-dsRed	Amp	mRenrez	dsRed	eigene Herstellung
pFROG-Renrez-eGFP	Amp	mRenrez	eGFP	eigene Herstellung
pFROG-Renrez-Myc	Amp	mRenrez	c-Myc	eigene Herstellung
pFROG-Renrez-HA	Amp	mRenrez	c-HA	eigene Herstellung
pFROG-Renrez-L152-P/D-HA	Amp	mRenrez	c-HA	eigene Herstellung
pFROG-Renrez-V5	Amp	mRenrez	c-V5	eigene Herstellung
pFROG-SP-HA-Renrez	Amp	mRenrez	HA	eigene Herstellung
pMOWS-eGFP	Amp	eGFP	-	Athena Chalaris
pMOWS-mRenrez-HA	Amp	mRenrez	c-HA	eigene Herstellung
pTLN-Renrez-HA	Amp	mRenrez	c-HA	eigene Herstellung
pTLN-Renrez-V5	Amp	mRenrez	c-V5	eigene Herstellung

### 3.1.8 Primer

Name	Klonierung	Sequenz
h-Renrez-CT-Fragment	pFROG-Renrez-C-term.	aag ctt atg agg aag tca agg acc atc
r-mRenrez-N-term-Furin	pFROG-Renrez-N-term.	gga tcc cac aag gga tgt gtc gaa
pF3-r (15)	pFROG-rück	gag act cca ttc ggg tgt tct
pFROG_HindIII_h (28)	pFROG-hin	ggc ttg tac ata ttg tcg tta g
h-mRenrez-EcoN1-start	pMOWS-Renrez	cac cta tta tag gat ggc tgt gct ggt cgt tct c
r-mRenrez-w/o-EcoN1	pMOWS-Renrez	tct ggg att cga tct cca ggt att gg
h-mRenrez-w/o-EcoN1	pMOWS-Renrez	tgg aga tcg aat ccc aga cgt agc
pMOWS-seq-hin	pMOWS-Renrez	taa gcc tcc gcc tcc tct tcc tc

mLimpII-pBT3-C-SfiI-h (97)	pBT3-C-LIMP2	cgg cca tta cgg cca aaa atg ggc aga tgc tgc ttc tac
mLimpII-pBT3-C-SfiI-r (98)	pBT3-C-LIMP2	cgg ccg agg cgg ccc tgg ttc gta tga ggg gtg ctc t
mLimpII-pBT3-N-SfiI-h (99)	pBT3-N-LIMP2	cgg cca tta cgg cca tgg gca gat gct gct tct ac
mLimpII-pBT3-N-SfiI-r (100)	pBT3-N-LIMP2	agc gta gtc tgg gac gtc gta tgg gta tgg cga tct taa tat gct aaa ttc
mRenrez-Sfi1-xN-suc-h (84)	pBT3-SUC-Renrez	ggg cca tta cgg ccg aat tta gca tat taa gat cg
mRenrez-Sfi1-xN-r (80)	pBT3-SUC-Renrez	ggg ccg agg cgg ccg aat cta ttc gaa tct tct gat ttg t
mRen.-Rez.HA-NT-h (91)	pFROG-SP-HA-Renrez	tac cca tac gac gtc cca gac tac gct ggg tct gtt gtt ttc cga aat gg
mRen.-Rez.HA-NT-r (92)	pFROG-SP-HA-Renrez	agc gta gtc tgg gac gtc gta tgg gta tgg cga tct taa tat gct aaa ttc
mRen.Rez.-L152P-h (115)	pFROG-Renrez-L152-P	gtc aca ccg cgg cag ctc cgt aac
mRen.Rez.-L152P-r (116)	pFROG-Renrez-L152-P	gtt acg gag ctg ccg cgg tgt gac
mRen.Rez.-L152D-h (117)	pFROG-Renrez-L152-D	gtc aca gat cgg cag ctc cgt aac
mRen.Rez.-L152D-r (118)	pFROG-Renrez-L152-D	gtt acg gag ctg ccg atc tgt gac
rRenrez-TMD-BamH1	pFROG-TMD-Renrez	ccg atc cca tat tcc aaa tgt tgt aag

### 8.1.9 Antikörper

#### 8.1.9.1 Primärantikörper

Bezeichnung	Herkunft	erzeugt in	IF	WB	EM
$\alpha$ -Aktin	DSHB, USA	Maus	-	1:5000	-
$\alpha$ -c-Myc (9B11)	Santa Cruz, USA	Maus	1:500	1:1000	-
$\alpha$ -HA (3F10)	Roche, Penzberg, D	Ratte	1:500	1:500	-
$\alpha$ -HA monoclon.	J. Klumperman, Utrecht	Maus	-	-	1:300
$\alpha$ -HA polyklonal	J. Klumperman, Utrecht	Maus	-	-	1:150
$\alpha$ -Ig1645	G. Nguyen	Kaninchen	-	1:1000	-
$\alpha$ -KDEL	Stressgen, Ann Arbor, USA	Maus	1:50	-	1:100
$\alpha$ -KDEL-Rez.	Stressgen, Ann Arbor, USA	Maus	1:500	-	-
$\alpha$ -LAMP1	J. Klumperman, Utrecht	Ratte	-	-	1:50
$\alpha$ -LAMP2	DSHB, Iowa City, USA	Ratte	1:50	1:500	-
$\alpha$ -LexA	Santa Cruz, USA	Maus	-	1:500	-
$\alpha$ -LIMP2	Eurogentec	Kaninchen	1:1000	1:2000	1:30
$\alpha$ -LIMP2 luminal	J. Klumperman, Utrecht	Kaninchen	-	-	1:70
$\alpha$ -PDI	Santa Cruz, USA	Kaninchen	1:50	-	-
$\alpha$ -TGN38	J. Klumperman, Utrecht	Schaf	-	-	1:15
$\alpha$ -V5	Invitrogen, Karlsruhe	Maus	1:500	1:3000	-

**8.1.9.2 Sekundärantikörper**

Bezeichnung	Herkunft	erzeugt in	IF/WB/EM
$\alpha$ -Kaninchen-IgG AF488, AF594	Invitrogen, Karlsruhe	Ziege	1:500
$\alpha$ -Kaninchen-POD	Santa Cruz, USA	Esel	1:10.000
$\alpha$ -Maus IgG	J. Klumperman, Utrecht	Kaninchen	1:300
$\alpha$ -Maus-IgG AF488, AF594	Invitrogen, Karlsruhe	Ziege	1:500
$\alpha$ -Maus-POD	Dianova, Hamburg	Schaf	1:10.000
$\alpha$ -Ratte IgG	J. Klumperman, Utrecht	Kaninchen	1:300
$\alpha$ -Ratten-IgG AF488, AF594	Invitrogen, Karlsruhe	Ziege	1:500
$\alpha$ -Ratte-POD	Dianova, Hamburg	Kaninchen	1:10.000
$\alpha$ -Ziege-POD	Dianova, Hamburg	Kaninchen	1:10.000

**8.1.10 Bakterien und Hefestämme**

XL1-blue Escherichia coli	Stratagene, LaJolla, CA, USA
NMY51 Yeast Reporter Strain	DUALmembrane Kit, Dualsystems Biotech, Schlieren, CH

**8.1.11 Zelllinien**

Name	Herkunft	Verwendung
Cos7	Grüne afrikanische Affen	WB (Abb. 4.5, 4.14, 4.26, 4.29), IF (4.10)
HEK293T	menschliche embryonale Nierenzelllinie	WB (Abb. 4.14 ) IF (Abb. 4.7-9, 4.13)
HEK 5/6	Stabil transfizierte HEK-Zelllinie mit murinen (Pro-) Reninrezeptor	WB (Abb. 4.15)
HEK 11/12	Stabil transfizierte HEK-Zelllinie mit humanem (Pro-) Reninrezeptor	WB (Abb. 4.15)
HeLa	menschliche epithelartige Zelllinie eines Zervix-Karzinoms	WB (Abb. 4.14)
LIMP2 (E5)	-/- embryonale Mausfibroblasten, spontan immortalisiert, Cathrin Claussen, Kiel	WB (Abb. 4.14), IF (Abb. 4.6, 4.11/12)
LIMP2 (583-3)	+/+ primäre embryonale Mausfibroblasten + retroviral transduzierter Reninrezeptor	WB (Abb. 4.16), EM (Abb. 4.17-4.22)
LIMP2 (583-2)	-/- primäre embryonale Mausfibroblasten + retroviral transduzierter Reninrezeptor	WB (Abb. 4.16), EM (Abb. 4.23/24)
MDCK	<i>Madin Darby canine kidney</i> ; Nierenepithelzellen vom Hund	WB (Abb. 4.14 )
PHÖNIX Eco	modifizierte HEK293T-Zellen, Verpackungszelllinie für den retroviralen Gentransfer	
PS1 +/+	embryonale Mausfibroblasten, immortalisiert mit dem großen SV-40-Antigen, D. Hartmann, Leuven, Belgien	WB (Abb. 4.14 )

### 8.1.12 Mäusstämmen

Wildtyp	CD53S <sup>+/+</sup> , Wildtyp mit einem gemischten genetischen Hintergrund aus C 57 BL/6J x 129SV/J; eigene Auszucht
LIMP2 <sup>-/-</sup>	LIMP2-defizienter Stamm mit einem gemischten genetischen Hintergrund aus C 57 BL/6Jx 129 SV/J; (Gamp et al. 2003), eigene Auszucht

### 8.1.13 Antibiotika

Ampicillin	Melford Laboratories, Chelworth, UK
Hygromycin	100x, PAA-Laboratories, Linz, Österreich
Kanamycin	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Ketamin (10%)	Bremer Pharma Healthcare
Penicillin/Streptomycin	100x, PAA-Laboratories, Linz, Österreich
Puromycin	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Rompum (2%)	Bayer Healthcare
Tetrazyklin	Roth, Karlsruhe, D

### 8.1.14 Puffer und Stammlösungen

#### EBC-Puffer (pH 7,4)

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

#### 10x Elektrodenpuffer

144,13g Glycin  
 30,29 g Tris  
 100 ml 10 %-iges SDS in H<sub>2</sub>O  
 ad 1000ml ddH<sub>2</sub>O (keinen pH-Wert einstellen)

#### LB-Medium (bei 4°C lagern)

10g Trypton/Pepton aus Casein  
 5g Hefeextrakt  
 10g NaCl  
 in 950ml ddH<sub>2</sub>O lösen, pH 7,0 einstellen

#### LB-Agarplatten (bei 4°C lagern)

10g Trypton/Pepton aus Casein  
 5g Hefeextrakt  
 10g NaCl  
 in 950ml ddH<sub>2</sub>O lösen, pH 7,0 einstellen  
 15 g Agar-Agar ad 1000 ml ddH<sub>2</sub>O  
 nach dem Autoklavieren auf 65° C abkühlen lassen und in 10 cm-Schalen gießen

### **Lysispuffer**

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

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

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

### **Mowiol/DABCO/DAPI**

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

### **4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS (15 ml Aliquots bei -20° C aufbewahren)**

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

### **10x PBS-Stammlösung**

80g NaCl  
11,5g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (wasserfrei)  
2g KCl  
2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
ad 1000 ml ddH<sub>2</sub>O (pH 7,4)

### **0,1M Phosphatpuffer pH7,4**

77,4ml 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
22,6ml 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
ad 1000ml ddH<sub>2</sub>O

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

2,5 ml Sammelgelpuffer  
1,6 ml 30 %-iges Acrylamid mit 0,8 % Bisacrylamid (37,6 : 1)  
5,8 ml ddH<sub>2</sub>O  
60 µl 10 %-iges APS  
30 µl 100 %-iges Temed

### **Sammelgelpuffer (bei RT aufbewahren)**

30,28 g Tris/HCL  
2 g SDS



ad 500 ml ddH<sub>2</sub>O, pH 6,8

**Stripping-Puffer**

20 ml 10 %-iges SDS in ddH<sub>2</sub>O  
6,25 ml 1 M Tris/HCl, pH 6,8  
0,83 ml 2-Mercaptoethanol  
73 ml ddH<sub>2</sub>O

**Tank-Blot-Puffer (pH 8,3)**

20 mM Tris  
1,6 M Glycin  
20 % Methanol

**50X TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)**

242g Tris  
57,1ml Eisessig  
100ml 0,5 M EDTA pH 8,0  
ad 1000ml ddH<sub>2</sub>O

**Trenngel (12,5 % Acrylamid, für ein 1,5 mm-Gel des Mini Protean Systems)**

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

**Trenngelpuffer (bei RT aufbewahren)**

90,85 g Tris/HCl  
2 g SDS  
ad 500 ml ddH<sub>2</sub>O, pH8,8

**10x TBS-Stammlösung (bei RT aufbewahren)**

48,72 g Tris  
40 ml 0,5 M EDTA  
163,6 g NaCl  
add 2000 ml ddH<sub>2</sub>O, pH 7,5

**TBST (bei RT aufbewahren)**

1000 µl Tween-20 ad 1000 ml 1x TBS

**8.1.15 Zellkulturmedien und Lösungen zur Arbeit mit eukaryoten Zellen**

CASY TON-Lösung	innovatis AG, Reutlingen, D
DMEM High Glucose	PAA Laboratories, Linz, Österreich
FCS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, D

RNAiMAX	Invitrogen, Paisley, UK
TurboFect	Fermentas, St. Leon-Rot, D

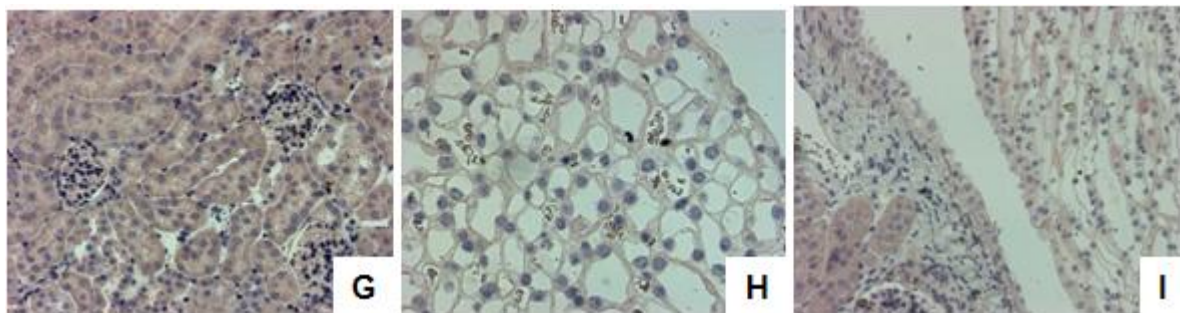
**8.1.16 EDV**

Adobe Photoshop	Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
Axiovision	Carl Zeiss, Jena, D
DNASTAR	Lasergene, Madison, WI, USA
Excel	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Fluoview v1.7b	Olympus, Hamburg D
ImageReader LAS-3000	Fujifilm, Tokyo, Japan
Multi Gauge V. 3.0	Fujifilm, Tokyo, Japan

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb.	Titel	Seite
1.1	Schematische Darstellung lysosomaler Membranproteine	2
1.2	Die vielfältigen Funktionen des Lysosoms	3
1.3	Die zelluläre Grundlage ausgewählter lysosomaler Speichererkrankungen	4
1.4	Die Glomerulosklerose bei einem Patienten mit AMRF -Syndrom	5
1.5	Schematische Darstellung der Mutationen in LIMP2, die zum AMRF Syndrom führen	6
1.6	Schematische Darstellung von LIMP2	7
1.7	Aufbau der vakuolären H <sup>+</sup> -ATPase	10
1.8	Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)	11
1.9	Schematische Darstellung des Reninrezeptors und seiner Schnittstelle	12
3.1	Die Polymerase-Kettenreaktion	16
3.2	Schematische Darstellung einer Fusions-PCR	17
3.3	Reaktionsansatz einer Kolonie-PCR	18
3.4	Schematische Darstellung der retroviralen Transduktion von MEF-Zellen	27
3.5	Schematische Darstellung des <i>Yeast Two-Hybrid Split-Ubiquitin</i> Systems	43
4.1	<i>Yeast Two-Hybrid Screen</i> : putative Interaktion zwischen LIMP2 und dem (Pro-)Reninrezeptor	48
4.2	Bestätigung der Interaktion zwischen LIMP2 und dem (Pro-)Reninrezeptor	49
4.3	Bestätigung der Interaktion zwischen dem (Pro-)Reninrezeptor und LIMP2	49
4.4	Überprüfung einer Interaktion des Reninrezeptors mit LIMP2 und ADAM10	50
4.5	Ko-Immünpräzipitation von LIMP2 und Reninrezeptor	51
4.6	Kolokalisation von LIMP2 und (Pro-)Reninrezeptor in LIMP2-defiziente Zellen (E5)	52
4.7	Kolokalisation von LIMP2 und (Pro-)Reninrezeptor in HEK293T Zellen	52
4.8	Kolokalisation von überexprimiertem LIMP2 und Reninrezeptor in HEK293T Zellen	53
4.9	Kolokalisation von endogenem LIMP2 und überexprimiertem Reninrezeptor in HEK293T	53
4.10	Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptors in Cos7 Zellen	54
4.11	Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptors in WT- und LIMP2-defizienten Zellen	54
4.12	Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptors in LIMP2-defiziente Zellen	55
4.13	Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptors in HEK293T Zellen	56
4.14	Der Reninrezeptor wird 24 Stunden nach Transfektion und in den Zelllinien Cos7, Hela und Hek293T am stärksten exprimiert	57
4.15	Stabile Expression des (Pro-) Reninrezeptors in Hek293T	58
4.16	Expressionskontrolle retroviral transduzierter MEF-Zellen	58
4.17	Lokalisation von endogenem LIMP2 in WT-Zellen	59

4.18	Lokalisation von LIMP2 im Vergleich zu KDEL und TGN38	60
4.19	Kolokalisation von LIMP2 und LAMP1	61
4.20	Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptors in WT- Zellen	62
4.21	Lokalisation des (Pro-)Reninrezeptors im Vergleich zu KDEL, LAMP1 und TGN38	63
4.22	Lokalisation von LIMP2 und Reninrezeptor in WT-Zellen	63
4.23	Lokalisation des Reninrezeptors in LIMP2-defizienten Zellen	64
4.24	Quantifizierung der Verteilung des Reninrezeptors in WT- und LIMP2-defizienten Zellen	65
4.25	Wahrscheinlichkeit einer <i>Coiled-Coil</i> -Domäne in der Struktur des (Pro-) Reninrezeptors	67
4.26	Ko-Immunpräzipitation von LIMP2 und Reninrezeptor bei mutierter <i>Coiled-Coil</i> Domäne	68
4.27	Schematische Darstellung der LIMP-2 Genstruktur sowie bekannter AMRF-Mutationen	69
4.28	Interaktion des Reninrezeptors mit LIMP2-Mutanten des AMRF-Syndroms	69
4.29	Ko-Immunpräzipitation von LIMP2 und N/C-terminalen Fragmenten des Reninrezeptor	70
4.30	Immunhistologie von LIMP2 im Kleinhirn von Wildtyp- und LIMP2-defizienten Mäusen	71
4.31	Immunhistologische Färbung von LIMP2 in der Niere von WT-Mäusen	72
4.32	Lokalisation von LIMP2 im juxtaglomerulären Apparat der Niere	73
4.33	Immunhistologische Färbung des (Pro-)Reninrezeptor in der Niere	73
8.1	Kontrolle der Immunhistologische Färbung von LIMP2 in der Niere LIMP2-defizienter Mäusen	101



**Abb. 8.1 Kontrolle der Immunhistologische Färbung von LIMP2 in der Niere LIMP2-defizienter Mäusen**  
 Nieren-Gewebeschnitte von LIMP2-defizienten Mäusen wurden mit  $\alpha$ -LIMP2 (1:1000) gefärbt und am Lichtmikroskop mit 40-facher Vergrößerung ausgewertet. Dabei zeigten sich die besten Ergebnisse mit einer Fixierung in DACO-Puffer. **G-H** In Schnitten LIMP2-defizienter Mäuse zeigte sich keine spezifische Färbung.

## 8.3 Tabellen

Absolut	WT1	WT2	WT3	WT4	WT-G	KO1	KO2	KO3	KO4	KO-G
ER	25	14	27	4	70	18	12	39	16	85
Golgi/TGN	15	1	6	11	33	2	8	26	7	43
SV	36	8	52	30	126	49	10	100	49	208
EE	29	4	19	13	65	17	4	16	4	41
MVB	85	35	146	66	332	31	16	144	39	230
Lysosomen	18	20	27	18	83	3	2	5	7	17
PM	12	8	29	7	56	5	1	26	9	41
Mitochondrien	4	2	8	3	17	6	2	15	3	26
Gesamt	224	92	314	152	782	131	55	371	134	691

**Tab. 8.1 Absolute Verteilung des (Pro-)Reninrezeptors in WT- und LIMP2-defizienten Zellen**

Quantitative Auswertung der Verteilung der Goldpunkte auf die einzelnen Kompartimente (ER= Endoplasmatisches Retikulum, Golgi =Golgi-Apparat, TGN= Trans-Golgi-Netzwerk, SV= small vesicles, EE= early endosomes, MVB= multivesicular bodies, Lysosomen, PM= Plasmamembran und Mitochondrien) in den Proben Wildtyp 1-4 (WT 1-4) sowie *knock out* 1-4 (KO 1-4). Nachfolgend die Gesamtzahl der gezählten Goldpunkte für Wildtyp (WT-G) und *Knock out* (KO-G).

Relativ	WT1	WT2	WT3	WT4	MW	SD	KO1	KO2	KO3	KO4	MW	SD	t-Test
ER	11,16%	15,22%	8,60%	2,63%	9,40%	5,27%	13,74%	21,82%	10,51%	11,94%	14,50%	5,05%	0,2120
Golgi/TGN	6,70%	1,09%	1,91%	7,24%	4,23%	3,18%	1,53%	14,55%	7,01%	5,22%	7,08%	5,48%	0,4120
SV	16,07%	8,70%	16,56%	19,74%	15,27%	4,67%	37,40%	18,18%	26,95%	36,57%	29,78%	9,07%	0,0408
EE	12,95%	4,35%	6,05%	8,55%	7,97%	3,74%	12,98%	7,27%	4,31%	2,99%	6,89%	4,44%	0,7210
MVB	37,95%	38,04%	46,50%	43,42%	41,48%	4,21%	23,66%	29,09%	38,81%	29,10%	30,17%	6,31%	0,0290
Lysosomen	8,04%	21,74%	8,60%	11,84%	12,55%	6,35%	2,29%	3,64%	1,35%	5,22%	3,12%	1,69%	0,0547
PM	5,36%	8,70%	9,24%	4,61%	6,97%	2,33%	3,82%	1,82%	7,01%	6,72%	4,84%	2,48%	0,2564
Mitochondrien	1,79%	2,17%	2,55%	1,97%	2,12%	0,33%	4,58%	3,64%	4,04%	2,24%	3,62%	1,00%	0,0517
Gesamt	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	0,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	0,00%	

**Tab. 8.2 Relative Verteilung des (Pro-)Reninrezeptors in WT- und LIMP2-defizienten Zellen**

Berechnung der relativen Verteilung der Goldpunkte auf die einzelnen Kompartimente in den Proben Wildtyp (WT1-4) und *Knock out* (KO 1-4). Berechnung des Mittelwerts (MW) sowie der Standardabweichung (SD) der Verteilung. In der letzten blauen Spalte die p-Werte des zweiseitig angewandten t-Tests.

## 9 Danksagung

Mein Dank richtet sich vor allem an PD Dr. Michael Schwake und Prof. Dr. Paul Saftig für ihre tatkräftige Unterstützung beim Verfassen meiner Dissertation, für die hilfreichen Diskussionen und guten Ideen.

Weiterer Dank geht an die Deutsche Forschungsgemeinschaft und das Graduiertenkolleg 1459, die meine Doktorarbeit finanziell unterstützt haben und mir die Möglichkeit gaben in viele Bereiche der molekularbiologischen Forschung Einblick zu bekommen sowie Erfahrung im Ausland zu sammeln. Dabei möchte ich speziell Catherine Meyer-Schwesinger am UKE in Hamburg danken, die mich in die Welt der Immunhistologie eingeführt hat. Zusätzlich gilt mein Dank dem Labor von Judith Klumperman am UMC in Utrecht. Durch Viola Oorschot konnte ich innerhalb kürzester Zeit einen Überblick über die wichtigen Methoden der Elektronenmikroskopie gewinnen und diese auch erlernen.

Außerdem möchte ich dem ganzen Team des Biochemischen Instituts, der Abteilung Molekularbiologie und transgene Forschung danken. Ohne die Hilfe von Kathi Stiebeling, Maïke Langer, Michelle Danaher, Christina Zachos, Johann Groth, Silvio Weber und vielen mehr wären Freude und Enttäuschung über die Forschungsergebnisse nicht halb so ertragbar gewesen.

Darüber hinaus möchte ich meinen engen Freunden Birte Lang, Jan Imgenberg und Anna Maaßen für ihr fleißiges Zuhören, ihre Unterstützung und Verständnis für meine Forschung danken.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Jan für die großartige Unterstützung, sein Verständnis für meine Interessen und seine Aufmunterungen bei Enttäuschungen.

Zu guter Letzt möchte ich auch meiner Familie danken, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht und mich in der Begeisterung für die Forschung bestärkt hat.

## 10 Lebenslauf

Name Miriam Svenja Oelbe, geb. Wagner  
Geboren 12.03.1988 in Sindelfingen

### Ausbildung

2006 – 2013 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität Kiel  
Frühjahr 2013: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1,5)  
Herbst 2008: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2,5)

Jan - März 2010 Cellular Microscopy Center, Utrecht, Niederlande

2008 – 2010 Doktorarbeit am Biochemischen Institut, Abteilung Molekularbiologie und transgene Forschung; als Stipendiantin des Graduiertenkollegs 1459

2000- 2006 Besuch des Matthias-Claudius-Gymnasium (MCG), Gehrden  
Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife (Note: 1,5)

Sep 02- Feb 03 Schüleraustausch Lycée Saint Magloire, Dol-de-Bretagne, Frankreich

1998 – 2000 Orientierungsstufe in der Burgbergschule, Gehrden

1997 – 1998 Grundschule am Castrum, Gehrden

1994 – 1997 Adalbert-Stifter-Schule (Grundschule), Ulm

### Praktisches Jahr

April - Juli 2012 Chirurgie am Krankenhaus Vendsyssel in Hjørring, Dänemark

Dez 11- April 12 Kinderheilkunde/Humangenetik am UKSH, Campus Kiel

Aug - Dez 2011 Innere Medizin am Diakonissenkrankenhaus Flensburg

### Famulaturen und Praktika

März 2011 Famulatur in der Universitäts-Kinderklinik, Kiel

Feb - März 2011 Famulatur in der Frauenklinik, Städtisches Krankenhaus Kiel

Sep - Okt 2010 Famulatur in der Allgemeinarztpraxis Dr. Dralle / Dr. Garbe, Gehrden

August 2010 Famulatur in der Kardiologie, Hospital Mexico, San José, Costa Rica

Jan - März 2010 Elektronenmikroskopischer Teil der Doktorarbeit am Cellular Microscopy Center, Utrecht, Niederlande

### Stipendien/Auszeichnungen

Mai 2010 2. Preis für die Präsentation der Forschungsergebnisse beim "1th International Symposium for PhD Students on Protein Trafficking in Health and Disease", Hamburg

Sep 08 - März 10 Stipendium der DFG im Rahmen des Graduiertenkollegs 1459

Juni 2006 Buchpreise des Matthias-Claudius-Gymnasiums für die guten Leistungen zum Abitur 2006 und zur Würdigung besonderer Schülerleistungen

## 11 Veröffentlichungen und Kongresse

- I. International Symposium on "Protein Trafficking in Health and Disease", Hamburg Mai 2010; **Vortrag:** "The Action Myoclonus and Renal Failure Syndrome - Searching for the missing link" (**Miriam Wagner**), **oral presentation award (2nd)**
- II. Pflugers Archiv: European Journal of Physiologie, Dezember 2012: "Parallel regulation of renin and lysosomal integral membrane protein 2 in renin-producing cells: further evidence for a lysosomal nature of renin secretory vesicles." Schmid J, **Oelbe M**, Saftig P, Schwake M, Schweda F.