

Charakterisierung des
Heme-Responsive Gene 1-Proteins (HRG-1)
als Interaktionspartner des Lysosomal-
Assoziierten Membranproteins Typ 2
(LAMP-2)

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

Vorgelegt von
Mirka Allerding
Kiel 2014

Erste/r Gutachter/in: Prof. Dr. Paul Saftig

Zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Thomas Roeder

Tag der mündlichen Prüfung: 20.05.2014

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 23.05.2014

gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl (Dekan)

ATGATTCGGAAGGCAGCGTCGATCGAGCGAGACATAAATGGATAA

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Das Lysosom.....	1
1.1.1 Die lysosomale Membran.....	2
1.1.2 Lysosomal-assoziierte Membranproteine (LAMPs).....	3
1.1.2.1 LAMP-2.....	4
1.1.2.2 LAMP-2 defiziente Mäuse.....	5
1.1.3 Danon Erkrankung.....	7
1.1.4 Postulierte Funktionen für LAMP-2.....	7
1.1.4.1 Cholesteroltransport.....	7
1.1.4.2 Autophagozytose.....	8
1.1.5 Phagozytose.....	11
1.1.6 HRG-1 (Slc48a1).....	12
1.2 Häm.....	13
1.2.1 Synthese und Transport.....	13
1.2.2 Abbau und Export.....	15
1.3 Eisenrecycling.....	17
1.4 Protein-Interaktionsscreens.....	18
1.5 Zielsetzung.....	21
2 Material & Methoden	22
2.1 Material.....	22
2.1.1 Chemikalien.....	22
2.1.2 Mauslinien.....	22
2.1.3 Zelllinien & Bakterienstämme.....	22
2.1.4 Plasmide und Konstrukte.....	23
2.1.5 Primär- und Sekundärantikörper.....	24
2.2 Methoden.....	24
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	24
2.2.1.1 RNA Isolierung.....	24

2.2.1.2	cDNA Umschrift	25
2.2.1.3	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	25
2.2.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
2.2.1.5	Agarosegelelektrophorese.....	27
2.2.1.6	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegel.....	27
2.2.1.7	Restriktionsverdau und Dephosphorilierung.....	28
2.2.1.8	Ligation	28
2.2.1.9	Erzeugung elektrokompenter <i>E. coli</i> XL1-Blue.....	29
2.2.1.10	Transformation durch Elektroporation.....	29
2.2.1.11	Plasmidisolierung aus transformierten <i>E. coli</i> XL1-Blue.....	30
2.2.1.12	Sequenzierung	30
2.2.1.13	Quantitative <i>Real Time</i> PCR (qRT-PCR)	30
2.2.2	Maus- / Gewebepreparation	31
2.2.3	Zellbiologische Methoden	32
2.2.3.1	Zellkultur	32
2.2.3.2	Transfektion von Zellen	33
2.2.3.3	<i>Knockdown</i> Versuche mittels siRNA	33
2.2.3.4	Inhibitorversuche.....	34
2.2.3.5	Generierung von Murinen Embrionalen Fibroblasten (MEFs).....	34
2.2.3.6	Gewinnung von Knochenmarkmakrophagen (<i>Bone Marrow-Derived Macrophages</i> , BMDMs)	35
2.2.3.7	Immunfluoreszenz	35
2.2.3.8	Durchflußzytometrie (<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> , FACS)	36
2.2.3.9	Erythrophagozytose (EP)-Assay	37
2.2.4	<i>Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screen</i>	39
2.2.4.1	Erzeugung kompetenter <i>S. cerevisiae</i> (NMY51)- Zellen.....	40
2.2.4.2	Transformation von kompetenten NMY51-Zellen.....	40
2.2.4.3	Interaktionstest des mLAMP-2A- und mLAMP-2B-Bait-Konstrukts.....	41
2.2.4.4	<i>Large-Scale</i> Transformation.....	41
2.2.4.5	Isolierung von Plasmiden aus Hefeklonen	42
2.2.5	Proteinbiochemische Methoden	42
2.2.5.1	Erzeugung von Zell- und Gewebelysaten.....	42
2.2.5.2	BCA-Assay	43
2.2.5.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	43
2.2.5.4	Western Blot	44
2.2.5.5	Proteindetektion.....	45
2.2.5.6	Strippen von Membranen.....	46
2.2.5.7	Ko-Immunpräzipitation (CoIP)	46
2.2.6	Histologische Methoden.....	47

2.2.6.1	<i>Free-float</i> -Schnitte	47
2.2.6.2	Hämatoxylin & Eosin- Färbung.....	47
2.2.6.3	Berlinerblau-Reaktion nach Perls.....	48
2.2.6.4	Diaminobenzidin (DAB)- Färbung	48
3	Ergebnisse	50
3.1	<i>Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screen</i>	50
3.1.1	Vektorgenerierung und Interaktionstests	50
3.1.2	LAMP-2B interagiert mit HRG-1 in Hefe	51
3.1.3	Validierung der HRG-1 Interaktion gegen mLAMP-2A, mLAMP-2B und mLIMP-2 in Hefe.....	52
3.1.4	Der C-Terminus von HRG-1 ist nicht für die Interaktion mit LAMP-2B verantwortlich	53
3.2	Validierung der Proteininteraktion in humanen Zellen	54
3.3	Subzelluläre Lokalisation von mHRG-1	56
3.3.1	HRG-1 ist nach Überexpression lysosomal lokalisiert.....	56
3.4	Antikörpergenerierung gegen HRG-1	57
3.5	Der α -HRG-1 Antikörper zeigt ein spezifisches Signal.....	58
3.5.1	Endogenes HRG-1 ist lysosomal lokalisiert.....	59
3.6	HRG-1 wird N-terminal prozessiert.....	63
3.6.1	Die Prozessierung von HRG-1 läßt sich durch Cysteinproteaseinhibitoren beeinflussen.....	64
3.7	N-terminale Prozessierung von HRG-1 erfolgt direkt vor der ersten Transmembrandomäne.....	66
3.8	Lysosomale Sortierungsmotive in HRG-1.....	67
3.8.1	Der C-Terminus ist wichtig für die HRG-1 Lokalisation.....	67
3.8.2	C-terminale Sortierungsmotive spielen keine Rolle für die lysosomale Lokalisation von HRG-1	69
3.9	HRG-1 Konzentration in Wildtyp und LAMP-2 <i>Knockout</i> Mäusen	70
3.9.1	HRG-1 Proteinmenge in Wildtyp und LAMP-2 <i>Knockout</i> Mäusen.....	71
3.9.2	<i>Hrg-1</i> Expression auf mRNA-Ebene in Wildtyp und LAMP-2 <i>Knockout</i> Mäusen	72
3.10	Histologischer Vergleich von Wildtyp und LAMP-2 <i>Knockout</i> Milzen	73
3.10.1	Erhöhte HRG-1 Niveaus in LAMP-2 <i>Knockout</i> Splenozyten.....	74
3.10.2	LAMP-2 <i>Knockout</i> führt zur Eisenakkumulation in der Milz.....	75
3.10.3	Eisenhaltige Zellen sind HRG-1 positiv	76
3.11	Die Hämoxygenase-1 Konzentration steigt in LAMP-2 <i>Knockout</i> Milzen.....	77
3.12	Blutbilduntersuchung von Wildtyp und LAMP-2 <i>Knockout</i> Mäusen.....	79
3.13	Anstieg an CD11b ⁺ -Zellen in LAMP-2 <i>Knockout</i> Milzen.....	81
3.14	Erythrophagozytose durch Knochenmarkmakrophagen	82
3.14.1	Phagozytose von Erythrozyten und Latexkügelchen.....	83

3.14.2	Fluoreszenzintensität entlang von Phagosomenquerschnitten.....	84
3.14.3	Fluoreszenzintensität entlang der Phagosomenmembran.....	87
4	Diskussion.....	89
4.1	Neue Interaktionspartner von LAMP-2.....	89
4.1.1	HRG-1 als Interaktionspartner von LAMP-2B im <i>Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screen</i> identifiziert.....	90
4.1.1.1	Interagiert HRG-1 mit LAMP-2 über seinen C- oder N-Terminus?.....	93
4.1.2	Validierung der Interaktion von LAMP-2 und HRG-1 in humanen Zellen.....	95
4.2	HRG-1.....	96
4.2.1	HRG-1 ist in der lysosomalen Membran lokalisiert.....	96
4.2.1.1	Die lysosomale Sortierung von HRG-1.....	98
4.2.2	HRG-1 wird N-terminal prozessiert.....	99
4.2.3	LAMP-2 <i>Knockout</i> Gewebe haben einen geringeren HRG-1-Gehalt.....	101
4.3	Hämdegradation in LAMP-2 <i>Knockout</i> Mäusen.....	102
4.3.1	LAMP-2 <i>Knockout</i> Milzen zeigen eine verstärkte Eisenakkumulation.....	102
4.3.2	Hämoxygenase 1 ist in LAMP-2 <i>Knockout</i> Milzen hochreguliert.....	106
4.3.3	LAMP-2 <i>Knockout</i> Mäuse zeigen Hinweise auf eine Anämie.....	106
4.4	Erythrophagozytose durch Makrophagen.....	107
5	Zusammenfassung.....	111
6	Summary.....	112
	Literaturverzeichnis.....	113
	Anhang.....	127
	Abbildungsverzeichnis.....	131
	Tabellenverzeichnis.....	133
	Lebenslauf.....	134
	Danksagung.....	135
	Eidesstattliche Erklärung.....	136

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
[v/v]	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
[w/v]	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
°C	Grad Celsius
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
A	Ampere (Stromeinheit)
A.U.	<i>Arbitrary Unit</i> (willkürliche Einheit)
Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
Ak	Antikörper
ALA	δ-Aminolävulinat
ALAS1	δ-Aminolävulinatsynthase 1
Amp	Ampicillin
AP	Adaptorprotein
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BD	Bindedomäne
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
C-	Carboxy-
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cm	Zentimeter
CMA	Chaperon-vermittelte Autophagie
CoIP	Ko-Präzipitat
CPgenIII	Coproporphyrinogen III
CTF	C-terminales Fragment
Ctrl	Kontrolle
Cub	C-terminales Ubiquitin Fragment
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>D. rerio</i>	<i>Danio rerio</i>

Da	Dalton (Masseneinheit von Proteinen)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DABCO	Diazobicyclooctan
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid
ddH ₂ O	<i>doppelt deionisiertes Wasser</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEA1	<i>early endosome antigen 1</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
Fc-Fragment	<i>Fragment crystallizable</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FECH	Ferrochelatase
FLVCR1	<i>Feline Leukemia Virus subgroup C Receptor 1</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
g	Gramm
g	Erdschwerebeschleunigung (Maßeinheit der Zentrifugalkraft)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
h	human
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HCT	Hämatokrit
HD	Häm-defizient
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HeLa	Henrietta Lacks
HGB	Hämoglobin
His	Histidin
HIS3	Imidazolglyzerol-Phosphat-Dehydratase

HMW	<i>High Molecular Weight</i>
HO	Hämoxygenase
HRG	<i>Heme-Responsive Gene</i>
HRP	<i>Horse-Radish-Peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
Hygro	Hygromycin
l	Liter
IF	Immunfluoreszenz
IHC	<i>Immuno Histo Chemistry</i>
IP	Präzipitat
IVC	<i>Individually Ventilated Cage</i>
k	Kilo (10^3)
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaar
KO	<i>Knockout</i>
l	Liter
LAMP	Lysosomal-assoziiertes Membranprotein
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LBPA	Lysobisphosphatidsäure
Leu	Leucin
LIMP	Lysosomales integrales Membranprotein
LMP	Lysosomales Membranprotein
LPS	Lipopolysaccharid
LSD	lysosomale Speichererkrankung
m	Meter
m	murin
M	molar
m	Milli (10^{-3})
MCH	mittleres korpuskuläres Hämoglobin
MCHC	mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MCV	mittleres Erythrozytenvolumen
MEF	murine embryonale Fibroblasten
min	Minute
MPV	durchschnittliches Thrombozytenvolumen
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Mittelwert

n	Probenanzahl
n	Nano (10^{-9})
N-	amino-
NCD	nicht-codierende Sequenz
Neo	Neomycin
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NTF	N-terminales Fragment
NubG	N-terminales Ubiquitin Fragment mit Glycin
Nubl	N-terminales Ubiquitin Fragment mit Isoleucin
OD	Optische Dichte
OOF	<i>out-of-frame</i> (nicht im Leserahmen)
p	<i>probability</i> (Wahrscheinlichkeit)
p.a.	<i>pro analysis</i> (für analytische Zwecke)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PB	Phosphatpuffer
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PCT	Thrombokrit
PDW	Thrombozytenvolumenverteilung
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	<i>pondus Hydrogenii</i> (<i>pondus</i> , Gewicht; <i>hydrogenium</i> , Wasserstoff)
PLT	Thrombozyt
POD	Peroxidase
PPIX	Protoporphyrin IX
qRT-PCR	quantitative <i>Real-Time</i> PCR
RBC	<i>Red Blood Cell</i> (Erythrozyt)
RDW-CV	Variationskoeffizient der Erythrozytenverteilungsbreite
RDW-SD	Standardabweichung der Erythrozytenverteilungsbreite
RES	Retikuloendotheliales System
rmM-CSF	<i>recombinant murine Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> (rekombinantermuriner Monozytenkolonien-stimulierender Faktor)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rP	rote Pulpa

rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Reverse-Transkriptase PCR</i>
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae, SC</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
sec	Sekunde
SEM	<i>Standard Error of Mean</i> (Standardfehler des Mittelwerts)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SP	Signalpeptid
SSC	<i>Sideward Scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS(T)	<i>Tris Buffered Saline</i> (+Tween 20)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TfR	Transferrinrezeptor
TM	Transmembrandomäne
Trp	Tryptophan
U	<i>Unit</i> (Einheit der enzymatischen Aktivität)
ü.N.	über Nacht
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
UBP	Ubiquitin-spezifische Protease
UPL	<i>Universal Probe Library</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
WB	Western Blot
wP	weiße Pulpa
WT	Wildtyp
YPD-Medium	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>
α-	anti
β-GC	β-Glucocerebrosidase
λ	Lambda (Wellenlänge)
Ω	Ohm (Widerstand)

1 Einleitung

1.1 Das Lysosom

Die 1959 erstmals von Christian de Duve beschriebenen Lysosomen sind hydrolytisch aktive Organellen der tierischen Zelle, welche der Vakuole von Hefen und pflanzlichen Zellen entsprechen. Die zumeist globulären, bis zu einem Mikrometer großen Kompartimente repräsentieren circa 5% des intrazellulären Lumens (Luzio *et al.*, 2007). Sie sind von einer einzelnen 7-10 nm dicken Phospholipiddoppelmembran begrenzt, welche das stark saure Lumen des Lysosoms vom neutralen (pH 7,2) Millieu des Zytosols der Zelle trennt (Lloyd und Forster, 1986). Der pH-Wert von 4,5-5 im Inneren des Lysosoms wird mit Hilfe einer membranständigen V-Typ H^+ -ATPase, welche Protonen in das Lumen pumpt, und eines H^+/Cl^- -Antiporters aufrechterhalten (Forgac, 2007; Scheel *et al.*, 2005; Steinberg *et al.*, 2010). Die Azidifizierung des Lumens ist wahrscheinlich notwendig, um die volle enzymatische Aktivität der mehr als 60 verschiedenen, lysosomalen Hydrolasen zu gewährleisten. Zelluläre Bestandteile im Zytosol werden durch die räumliche Trennung vom Lumen, sowie das niedrige pH-Optimum der Hydrolasen, vor ungewollter Degradation geschützt.

Aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher saurer Hydrolasen, wie zum Beispiel der Proteinasen, Nukleasen und Lipasen (Gelb *et al.*, 2001; Hirshhorn und Reusser, 2001; Moser *et al.*, 2001; Schuchman und Desnick, 2001), können Makromoleküle, ganze Organellen (z.B. defekte Mitochondrien) und komplexe, zellfremde Komponenten (z.B. Bakterien, Erythrozyten) im Lysosom in ihre Grundbausteine zerlegt werden (Kornfeld und Mellman, 1989). Die daraus resultierenden Monomere (z.B. Aminosäuren und Saccharide) und Ionen, werden auf diesem Weg für die Zelle recycelt und für die Proteinbiosynthese erneut nutzbar gemacht.

Störungen innerhalb dieses Abbauprozesses können zu lysosomalen Speichererkrankungen (LSDs) führen. Von ihnen sind inzwischen mehr als 50 verschiedene beschrieben worden (Berkovic *et al.*, 2008; Futerman und van Meer, 2004; Sawkar *et al.*, 2006; Town *et al.*, 1998; Verheijen *et al.*, 1999). Sie sind durch die Akkumulation von unverdauten Metaboliten im Lysosom definiert und veranschaulichen die Bedeutung der lysosomalen Degradation für die „normale“ Physiologie der Zelle (Futerman und van Meer, 2004). Bekannte Beispiele für LSDs sind Morbus Gaucher, Morbus Pompe und unterschiedliche Mukopolysaccharidosen, in denen es durch Mutationen in spezifischen sauren Hydrolasen zur Speicherung der entsprechenden Substrate (Glucoceroside, Glykogen, Glykosaminoglykane) kommt.

Die funktionellen Zusammenhänge zwischen der Akkumulation von unverdauten Metaboliten im Lysosom und den pathologischen Symptomen, ist für die meisten lysosomalen Speichererkrankungen bis heute wenig verstanden (Futerman und van Meer, 2004).

1.1.1 Die lysosomale Membran

Für die Membran der Lysosomen wurden mehr als 120 Membranproteine (LMPs) identifiziert, deren Funktionen zwar vielfältig aber bei weitem nicht abschließend geklärt sind (Abb. 1; Bagshaw *et al.*, 2005; Chapel *et al.*, 2013; Schröder *et al.*, 2007).

Die charakteristische Zusammensetzung biologischer Membranen muss durch einen stetigen, regulierten Transport ihrer Komponenten aufrechterhalten werden. Der Transport von Membranproteinen vom trans-Golgi-Netzwerk zum Lysosom erfolgt entweder direkt über endosomale Vesikel (Green *et al.*, 1987; Janvier und Bonifacino, 2005) oder anhand eines indirekten Transportweges über die Plasmamembran und damit verbundenen zusätzlichen Exo- und Endozytoseschritten (Akasaki *et al.*, 1995; Carlsson und Fukuda, 1992; Lippincott-Schwartz und Fambrough, 1986; Nabi *et al.*, 1991).

Ausschlaggebend für die lysosomale Lokalisation von Membranproteinen sind nahe der Transmembrandomäne gelegene Sortierungsmotive, die sich innerhalb der zytoplasmatischen Proteintermini befinden (Rohrer *et al.*, 1996). Diese zumeist aus einem oder mehreren Tyrosin- und Di-Leucin-basierten Motiven bestehenden Sequenzbereiche (Bonifacino und Traub, 2003) werden über Adaptorproteinkomplexe (AP1 bis AP4) erkannt. Die Adaptorproteinkomplexe interagieren ihrerseits mit Clathrin (Dell'Angelica *et al.*, 1998). Dies ermöglicht den Transport von Adaptorproteinkomplex-assoziierten Proteinen mittels Clathrin-beschichteter Vesikel in die endosomale Membran (Shih *et al.*, 1995). Auf diese Weise sortierte Proteine können, wie im Fall des lysosomalen integralen Membranproteins 2 (LIMP-2), ihrerseits als Transporter für lysosomale Hydrolasen (z.B. β -Glucocerebrosidase (β -GC)) fungieren (Reczek *et al.*, 2007). Allerdings ist dies eine Ausnahme und die meisten löslichen lysosomalen Enzyme werden Mannose-6-Phosphatrezeptor-abhängig mittels Clathrin-beschichteter Vesikel zu Endosomen transportiert, wo sie aufgrund des niedrigeren pH-Wertes von diesem dissoziieren (Braulke und Bonifacino, 2009).

Lysosomale Membranproteine sind zumeist stark glykosyliert, weshalb ihre Anlagerung an die luminalen Seite der Membran eine 5-12 nm dicke Glykokalyx ausbildet (Fukuda, 1991; Neiss, 1984). Aufgrund dieser Eigenschaft wurde der Schutz der Membran vor Desintegration durch die luminalen Hydrolasen als ihre Hauptaufgabe postuliert (Fukuda, 1991). Darüberhinaus spielen sie eine wichtige Rolle im Vesikeltransport durch die Zelle (Huynh *et al.*, 2007) und bei Vesikelfusionen im Verlauf der Maturierung von zum Beispiel frühen Endosomen hin zu Endolysosomen (Huotari und Helenius, 2011). Während dieser Prozesse sind sie an der Interaktion mit Motorproteinen des Zytoskeletts,

sowie an Membranfusionen beteiligt (Huynh *et al.*, 2007; Munro, 2004). Des Weiteren scheinen sie für den Import der abzubauenen Makromoleküle und den Export der daraus resultierenden Produkte über die lysosomale Membran verantwortlich (Fukuda, 1991; Peters und von Figura, 1994; Sagne und Gasnier, 2008).

Trotz der großen Anzahl unterschiedlicher Abbauprodukte und dem Einhergehen damit verbundener lysosomaler Speichererkrankungen wurden erst wenige Cargo-spezifische Transportproteine identifiziert. Zu ihnen zählen der Cysteinexporter Cystinosin (CTNS), der Sialinsäuretransporter Sialin (Slc17a5) und der Aminosäuretransporter LYAAT-1 (Slc36a1) (Liu *et al.*, 2012; Town *et al.*, 1998; Verheijen *et al.*, 1999).

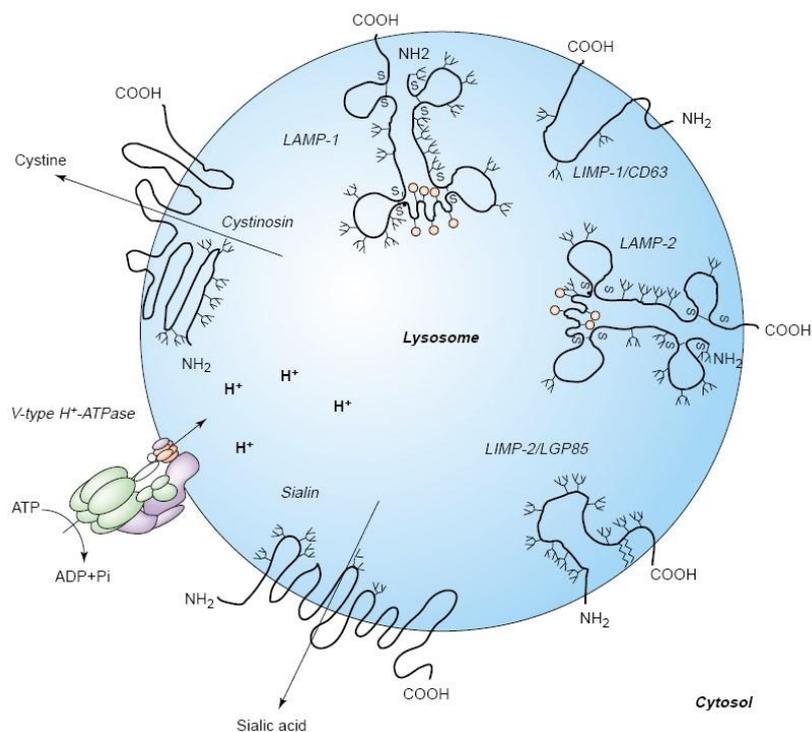


Abb. 1: Schematische Darstellung des Lysosoms mit einigen lysosomalen Membranproteinen. Abbildung aus Eskelinen *et al.* (2003).

1.1.2 Lysosomal-assoziierte Membranproteine (LAMPs)

Die Familie der lysosomal-assoziierten Membranproteine (LAMPs) besteht in Mensch und Maus aus fünf Mitgliedern. Es handelt sich durchgehend um Typ-1 Transmembranproteine, die durch eine konservierte „LAMP“-Aminosäuresequenz direkt vor der Transmembrandomäne charakterisiert sind (Wilke *et al.*, 2012). Durch Untersuchungen der Kristallstruktur dieser Domäne wurde eine bisher unbekannte β -Prismafaltblatt Sekundärstruktur entdeckt. Sie ermöglichte in *in silico* Versuchen eine kompakte, membranliegende Konformation des N-Terminus und bildet eine mögliche Proteininteraktionsstelle (Wilke *et al.*, 2012). Neben den zellspezifisch exprimierten Proteinen

LAMP-3 (interdigitierende dendritische Zellen; de Saint-Vis *et al.*, 1998), BAD-LAMP (Neuronen und plasmazytoide dendritische Zellen; Defays *et al.*, 2011) und dem Gewebe-Makrophagen/Monozyten-spezifischen CD68 (Rabinowitz und Gordon, 1991), sind vor allem die ubiquitär vorkommenden Mitglieder LAMP-1 und LAMP-2 im Körper prävalent.

Die erstmals von Chen *et al.* 1985 näher beschriebenen Proteine LAMP-1 und LAMP-2 weisen neben einer 37 prozentigen Aminosäuresequenzhomologie auch strukturell starke Ähnlichkeiten miteinander auf. Dies unterstreicht, trotz einer Lokalisation auf zwei unterschiedlichen Chromosomen, ihre evolutionäre Verwandtschaft (Fukuda, 1991; Granger *et al.*, 1990). Beide Proteine werden hauptsächlich in Lysosomen, späten Endosomen und zu geringen Teilen an der Plasmamembran gefunden und stellen circa 50 Prozent aller lysosomalen Membranproteine dar (Hunziker *et al.*, 1996).

1.1.2.1 LAMP-2

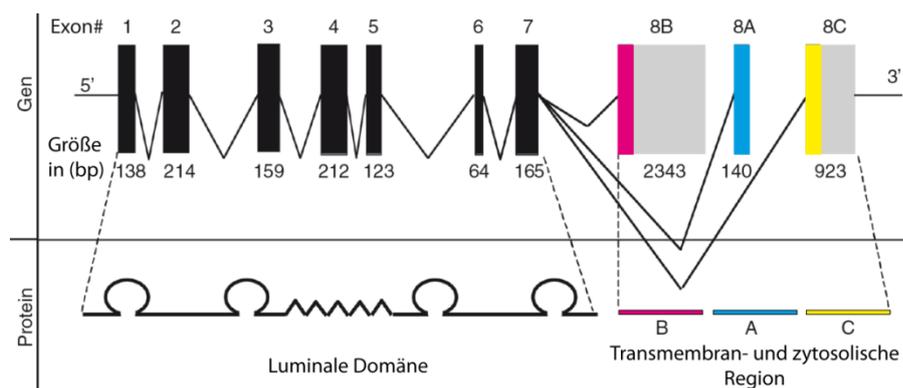


Abb. 2: Exonstruktur des murinen *lamp-2* mit den durch alternatives Spleißen entstehenden Isoformen. In schwarz und farbig die für das Protein codierenden Regionen, in hellgrau nicht-codierende 3'-Regionen. Abbildung modifiziert nach Eskelinen *et al.* (2005).

Das humane *lamp-2* Gen besitzt neun und das murine acht Exons, welche durch alternatives Spleißen des letzten Exons drei verschiedene mRNAs codieren (Abb. 2; Konecki *et al.*, 1995). Die hieraus resultierenden Isoformen des Proteins (LAMP-2A, LAMP-2B, LAMP-2C) besitzen ein N-terminales Signalpeptid und sind in den darauf folgenden 347 (human) bzw. 354 (murin) Aminosäuren der luminalen Domäne zu 100% homolog (Gough *et al.*, 1995). Sie unterscheiden sich lediglich in ihrer kurzen Transmembranregion und dem 11 Aminosäuren langen, zytosolischen C-Terminus (Abb. 3; Fambrough *et al.*, 1988; Lewis *et al.*, 1985). In ihm ist ein, in allen drei Isoformen leicht unterschiedliches, Tyrosin-basiertes Sortierungsmotiv (GYXX ϕ) lokalisiert (Braulke und Bonifacio, 2009). Dieses wird durch den Adaptorproteinkomplex(AP)-1 (am trans-Golgi-Netzwerk) bzw. AP-2 (an der Plasmamembran) erkannt (Honing *et al.*, 1996; Ohno *et al.*, 1995) und hat die unterschiedliche Lokalisation der drei Isoformen zur Folge (Fujiwara *et al.*, 2013; Furuta *et al.*, 1999; Konecki *et al.*,

1995). So wurde LAMP-2B ausschließlich an der lysosomalen Membran detektiert, während LAMP-2A und LAMP-2C in bestimmten Zellen auch anteilhaft an der Plasmamembran zu finden sind (Gough und Fambrough, 1997). Zusätzlich zur Lokalisation in der Zelle, konnten Unterschiede im Expressionsniveau und der Gewebeverteilung der LAMP-2 Isoformen nachgewiesen werden (Konecki *et al.*, 1995). So wurde LAMP-2A als die prädominante Isoform in Hepatozyten und LAMP-2B in Myozyten beschrieben (Konecki *et al.*, 1995). Diese, durch den kurzen C-Terminus bedingte isoformspezifische Verteilung, lässt auf verschiedene Interaktionspartner und damit eine funktionelle Spezialisierung schließen.

Die luminaire Domäne von LAMP-2 besteht aus zwei großen, stark N-glykosylierten Bereichen (Carlsson und Fukuda, 1990), innerhalb derer jeweils zwei konservierte Disulfidbrücken lokalisiert sind. Beide Bereiche werden über eine bewegliche, O-glykosylierte *Hinge-Region* verbunden (Carlsson und Fukuda, 1989). Die hohe Anzahl an N- und O-Glykosylierungsstellen macht LAMP-2 zu einem der am stärksten glykosylierten Proteine überhaupt (Carlsson und Fukuda, 1990) und zu einem Hauptbestandteil der schützenden, luminalen Glykokalyx (Granger *et al.*, 1990; Neiss, 1984). Umso verwunderlicher ist, dass die Deglykosylierung von LAMP-1 und LAMP-2 durch Endoglykosidase H die lysosomale Membranstabilität nicht beeinflusst (Kundra und Kornfeld, 1999).

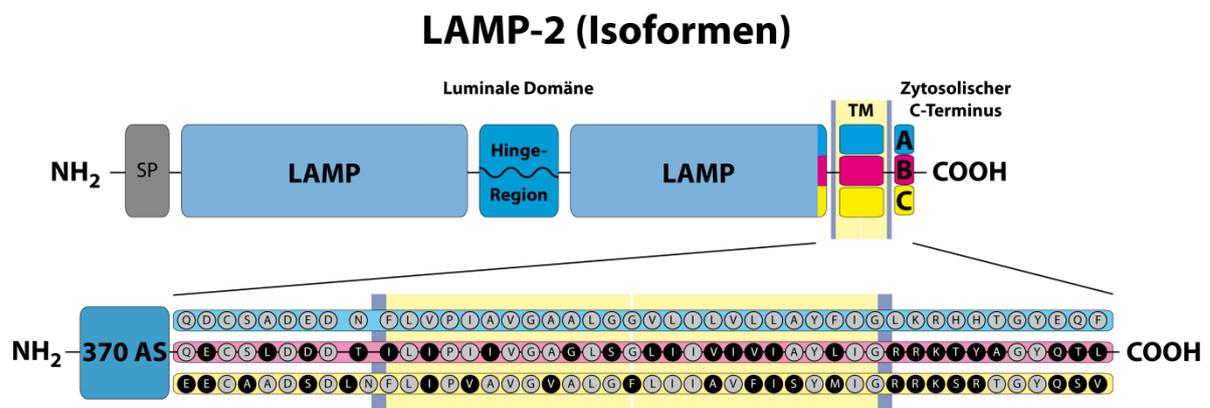


Abb. 3: Schematische Darstellung der LAMP-2 Proteinisoformen. Sequenzunterschiede zur LAMP-2A Isoform sind durch schwarze Aminosäuren hervorgehoben. SP = Signalpeptid, LAMP = LAMP-Domäne, TM = Transmembrandomäne.

1.1.2.2 LAMP-2 defiziente Mäuse

Die Untersuchung von *lamp-1* und *lamp-2* defizienten Mäusen, sowie *lamp-1/lamp-2* doppeldefizienten Mausfibroblasten, ermöglichte eine Reihe neuer Erkenntnisse.

Während doppeldefiziente Tiere vor dem Embryonaltag 15 versterben (Eskelinen *et al.*, 2004), zeigen LAMP-1 defiziente Mäuse, neben einer leichten Astrogliose und einer erhöhter LAMP-2 Proteinsynthese in Nieren-, Herz- und Milzgewebe, keine weiteren Auffälligkeiten (Andrejewski *et al.*, 1999).

Auch die LAMP-2 defizienten Tiere zeigen, trotz einer um 50% erhöhten Letalität 20 bis 40 Tage nach der Geburt, im weiteren Verlauf normale Lebenserwartungen. Ihr Phänotyp ist jedoch, im Vergleich zu LAMP-1 Mäusen, deutlich stärker ausgeprägt und zeigt sich bereits durch ihre im Vergleich zu Wildtyptieren geringere Größe und ein im Verhältnis zum Körpergewicht vergrößertes Herz (Stypmann *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2000). Die physiologische Bedeutung von LAMP-2 wird durch eine starke Akkumulation von autophagozytotischen Vakuolen (1.1.4.2) in einer Vielzahl von Geweben wie z.B. Herz, Leber, Milz, Niere, Skelettmuskulatur, nicht aber dem Gehirn, unterstrichen. Die Vakuolen zeigen unter dem Elektronenmikroskop einen polymorphen Inhalt, bestehend aus partiell verdauten Zytoplasmakomponenten (Tanaka *et al.*, 2000). Als Ursache für die Anreicherung der Vakuolen wird deren verzögerte Maturierung beschrieben, während eine vermehrte Biogenese als Grund der Autophagosomenakkumulation ausgeschlossen wird (Eskelinen *et al.*, 2002). Störungen in der Lysosomenfusion mit Phagosomen führen in LAMP-2 *Knockout* Granulozyten zu einer verlangsamten Phagozytose von Pathogenen und können der Grund für eine vermehrte Parodontitis in diesen Mäusen sein (Beertsen *et al.*, 2008). Dementgegen ist in LAMP-2-defizienten Makrophagen keine Störung der Vesikelfusion beobachtet worden (Huynh *et al.*, 2007). Sowohl LAMP-1 als auch die V-Typ H^+ -ATPase können in der Lysosomenmembran nachgewiesen werden, was mit einem normalen pH-Wert des Lumens verbunden ist. Vergleichbar mit der Hochregulation von LAMP-2 in LAMP-1 *Knockout* Mäusen kommt es in LAMP-2 Tieren teilweise zu einer kompensatorischen Hochregulation des LAMP-1 Proteingehalts. LAMP-2 defiziente Hepatozyten zeigten eine vermehrte Sekretion lysosomaler Enzyme und eine Störung der Cathepsin D Prozessierung (Eskelinen *et al.*, 2002).

Anders als LAMP-1 und LAMP-2 einzel-defiziente Tiere, sind doppel-defiziente Mäuse nicht lebensfähig. Für Untersuchungen dieses Genotyps konnten embryonale Fibroblasten (MEFs) gewonnen werden. In ihnen sind eine starke Anreicherung autophagozytotischer Vakuolen, eine Störung des Cholesterinstoffwechsels sowie morphologisch auffällige Lysosomen zu beobachten (Eskelinen *et al.*, 2004). Ein Phänotyp, der in einzel-defizienten Fibroblasten nicht auftritt und die redundanten Funktionen beider LAMP Proteine verdeutlicht. Es konnte gezeigt werden, dass in doppel-defizienten MEFs Phagosomen nicht in der Lage sind das Membranprotein Rab7 zu rekrutieren, wodurch die Maturierung zu Phagolysosomen unterbunden wird (Binker *et al.*, 2007; Huynh *et al.*, 2007). Die lysosomale Enzymaktivität ist weder in einzel- noch doppel-defizienten Zellen im Vergleich zum Wildtyp verändert (Eskelinen *et al.*, 2004).

Obwohl der LAMP-2 *Knockout* Phänotyp in der Maus auf eine physiologische und durch die Zelle nicht kompensierbare Rolle von LAMP-2 in speziell autophagozytotischen Prozessen (1.1.4.2) hindeutet, konnte dessen Funktion bislang nicht weiter konkretisiert werden. Ein Grund mögen die

Eigenschaften von LAMP-1 und anderen lysosomalen Membranproteinen sein, die den Ausfall von LAMP-2 ausgleichen und dadurch die Untersuchung der eigentlichen Funktion erschweren.

1.1.3 Danon Erkrankung

Besondere Bedeutung erlangt der LAMP-2 Phänotyp in Verbindung mit der seltenen X-chromosomal vererbten Danon Erkrankung, die erstmals 1981 von Moris Danon beschrieben wurde (Danon *et al.*, 1981). Diese, durch Defekte in dem für LAMP-2 codierenden Gen hervorgerufene Erkrankung führt bei betroffenen Patienten zu tödlich verlaufenden Kardiomyopathien, sowie Skelettmuskelmyopathien und unterschiedlich stark ausgeprägter geistiger Retardierung. Die Danon Erkrankung ist damit das erste beschriebene Beispiel einer durch die Mutation eines lysosomalen Membranproteins hervorgerufenen Kardio- und Skelettmuskelmyopathie im Menschen (Nishino *et al.*, 2000).

Wie in den LAMP-2 defizienten Mäusen, konnte in den Patienten eine Akkumulation von autophagozytotischen Vakuolen in Herz- und Skelettmuskulatur beobachtet werden (Danon *et al.*, 1981; Nishino *et al.*, 2000; Saftig *et al.*, 2001). Interessanterweise zeigte ein Patient, bei dem ausschließlich die LAMP-2B Isoform betroffen war, gleichfalls alle Symptome (Nishino *et al.*, 2000). Dies gibt einen Hinweis darauf, dass hauptsächlich diese Isoform für die abschließende Reifung der autophagozytotischen Vesikel während der Makroautophagie (1.1.4.2) verantwortlichen sein könnte.

Während ein Großteil der lysosomalen Speichererkrankungen durch Mutationen und Veränderungen innerhalb der abbauenden luminalen Enzyme hervorgerufen wird, unterstreicht die Danon Erkrankung die Bedeutung der lysosomalen Membranproteine für die Funktionalität des Lysosoms. Obwohl die Kausalität zwischen Mutationen im *lamp-2* Gen und der Akkumulation an autophagozytotischen Vakuolen erkannt wurde, sind die zellulären Prozesse, welche zu den pathologischen Symptomen führen, bislang wenig verstanden.

1.1.4 Postulierte Funktionen für LAMP-2

Trotz einem jahrelangen Interesse an LAMP-2 wurden bisher nur wenige Mechanismen beschrieben, in denen das Protein definierte Funktionen übernimmt. Hierzu zählen die im Weiteren erläuterten Abläufe des Cholesteroltransports (1.1.4.1; Schneede *et al.*, 2011) sowie der Autophagozytose (1.1.4.2; Cuervo und Dice, 1996).

1.1.4.1 Cholesteroltransport

Wie bereits erwähnt zeigen LAMP-1 und -2 doppel-defiziente Fibroblasten eine spät-endosomale/lysosomale Akkumulation von Cholesterol. Zusammen mit der lysosomalen

Speichererkrankung Niemann-Pick C, hervorgerufen durch Mutationen im Gen von NPC1 oder NPC2 (Vanier und Millat, 2003), verweist dies auf die zentrale Bedeutung des Lysosoms im Cholesterolfstoffwechsel.

Es konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation von unverestertem Cholesterol in späten Endosomen und Lysosomen nur durch die Expression von *lamp-2*, nicht aber *lamp-1*, aufgehoben werden kann. Die Wirksamkeit jeder LAMP-2 Isoform deutet auf eine zentrale Rolle der luminalen Domäne hin, welche in allen drei Proteinen konserviert ist. Mit Hilfe von LAMP-2 Chimären konnte der hierfür entscheidende Bereich auf die membranproximale luminal Domäne eingegrenzt werden. Zwar wird eine direkte Interaktion zwischen der luminalen Domäne von LAMP-2 und Cholesterol als unwahrscheinlich eingestuft (Schneede *et al.*, 2011), jedoch könnten andere am Export beteiligte Proteine durch die Glykokalyx stabilisiert oder festgehalten/positioniert werden. Eine solche Funktion wurde bereits für das lysosomale Membranprotein TAPL (ABCB9) durch LAMP-1 und LAMP-2B beschrieben (Demirel *et al.*, 2012).

1.1.4.2 Autophagozytose

Für die Regulierung des intrazellulären Proteingehalts sind sowohl die Proteinbiosynthese, als auch die Proteindegradation von entscheidender Bedeutung. Beide Prozesse sind miteinander verknüpft und unterliegen einer Vielzahl von Kontrollmechanismen.

Neben dem Abbau von Ubiquitin markierten Proteinen an Proteasomen des Zytosols und des Zellkerns, findet die intrazelluläre Degradation vor allem durch Autophagozytose statt.

Unter Autophagozytose oder auch Autophagie wird ein evolutionär konservierter Prozess verstanden, der die proteolytische Degradation von zytosolischen Komponenten im Lysosom der Zelle zur Folge hat (*auto phagein* = selbst verzehren). Während ein autophagozytotischer Grundumsatz in allen Zellen detektiert werden kann, kommt es unter Stressbedingungen zu einem deutlichen Anstieg dieser Stoffwechselaktivität (Kuma *et al.*, 2004). Besonders unter Nährstoffentzug ermöglicht er die optimale Verwertung der bereits in der Zelle vorhandenen Synthesebausteine und Energiequellen (Eskelinen *et al.*, 2005). Es sind drei unterschiedliche Hauptunterarten der Autophagie beschrieben: Mikroautophagie (Sahu *et al.*, 2011), Makroautophagie (Abb. 4; Mizushima und Komatsu, 2011) und Chaperon-vermittelte Autophagie (Abb. 4; Cuervo und Dice, 1996; Mizushima *et al.*, 2008).

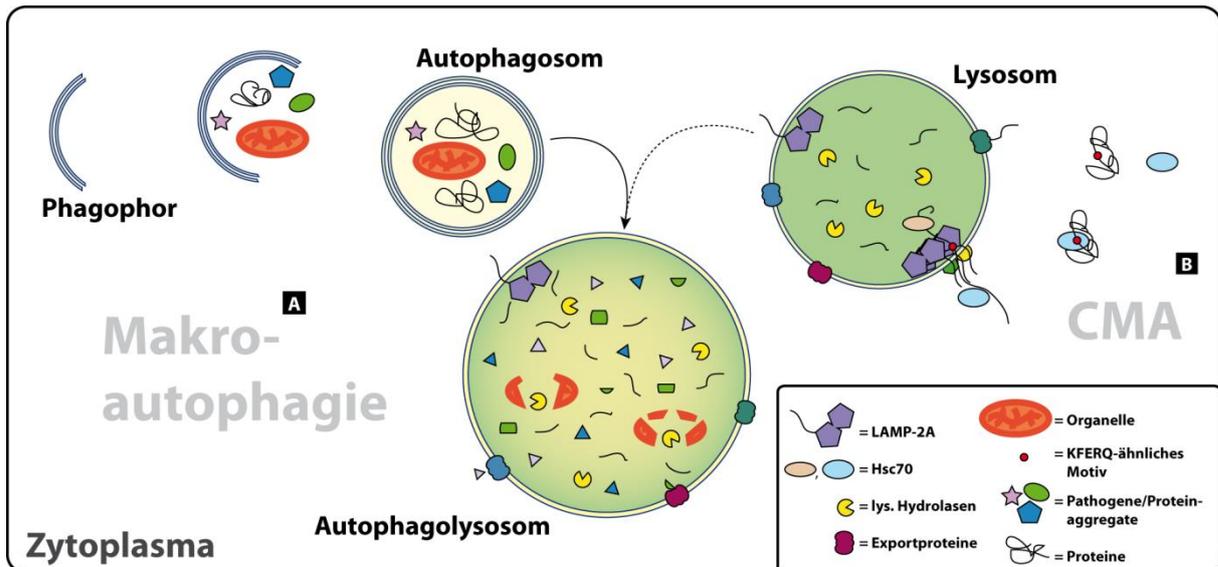


Abb. 4: Schematische Darstellung der Makro- und Chaperon-vermittelten Autophagie. **A)** Während der Makroautophagie werden Proteine, Organellen und Pathogene aus dem Zytosol in einem Autophagosom eingeschlossen, und nach dessen Fusion mit einem Lysosom im Autophagolysosom degradiert. **B)** Während der Chaperon-vermittelten Autophagie (CMA) werden Proteine über ihr KFERQ-ähnliches Motiv von Hsc70 erkannt, zum Lysosom transportiert und dort über einen LAMP-2A Proteinkomplex ins Lumen transloziert und anschließend verdaut.

Makroautophagie

Während der Makroautophagie kommt es zum Verdau zytosolischer Bestandteile bis hin zu ganzen Organellen (Dunn, 1990). Neben der Bereitstellung neuer Biosyntheseressourcen dient die Degradation akkumulierter Proteine und beschädigter Organellen (z.B. Mitophagie) der störungsfreien Zellhomöostase (Hara *et al.*, 2006). In Folge von kurzzeitigem Nährstoffentzug wird Makroautophagie als Überlebensmechanismus aktiviert, was bereits 15 bis 30 Minuten nach Induktion zu detektieren ist (Kabeya *et al.*, 2000). Des Weiteren konnte eine konservierte Rolle der Makroautophagie während der Zelldifferenzierung und –Entwicklung beschrieben werden (Mizushima und Levine, 2010).

Die für den Ablauf verantwortlichen Gene (*autophagy-related genes, atgs*) wurden zuerst in der Hefe entdeckt, sind jedoch evolutionär stark konserviert, wodurch homologe Gene auch in hochentwickelten, eukaryotischen Zellen zu finden sind (Reggiori, 2006).

Im Verlauf der Makroautophagie kommt es zur *de novo* Entstehung einer Doppelmembran (Phagophor) im Zytosol. Durch deren Verlängerung werden Teile des Zytoplasmas umschlossen und in Form von autophagozytotischen Vesikeln (Autophagosomen) für den anschließenden Abbau separiert (Lock und Debnath, 2008). Zur Erlangung hydrolytisch aktiver, lysosomaler Enzyme erfolgt eine Reifung der Vesikel über die Fusion mit späten Endosomen und Lysosomen zu Autophagolysosomen (Klionsky und Emr, 2000). Erst in diesem Kompartiment können die Vesikelinhalte schlussendlich degradiert werden (Abb. 4).

Aufgrund der exzessiven Anreicherung von autophagozytotischen Vesikeln in Organen von Patienten mit der Danon Erkrankung besteht ein kausaler Zusammenhang zwischen LAMP-2 und den Abläufen

der Makroautophagie. Mutationen im *lamp-2* Gen, die ausschließlich LAMP-2B betreffen grenzen die verantwortliche Proteinisoform weiter ein (Nishino *et al.*, 2000).

Chaperon-vermittelte Autophagie

Unter langanhaltendem Nährstoffentzug nimmt die Makroautophagozytoseaktivität stetig ab und wird gleichsam durch die Chaperon-vermittelte Autophagie (*Chaperone mediated autophagy*, CMA) ersetzt (Cuervo und Dice, 1998; Fuertes *et al.*, 2003). Hierbei handelt es sich um einen Prozess, der die selektive Erkennung einzelner zytosolischer Proteine und, daraus resultierend, ihren Abbau bedingt. Die Degradierung ausgewählter Proteine setzt deren spezifische Erkennung voraus. Im Fall der CMA erfolgt dies mit Hilfe eines KFERQ-ähnlichen Motives, welches in etwa einem Drittel der zytosolischen Proteine gefunden werden kann (Backer *et al.*, 1983). Während das Pentapeptid in funktionsfähigen Proteinen zumeist nicht exponiert ist, kann ein Defekt mit anschließender Konformationsänderung das Motiv für andere Proteine zugänglich machen. Auf diese Weise fungiert die Chaperon-vermittelte Autophagie auch als eine Art Qualitätskontrolle.

Das KFERQ-ähnliche Motiv tragende Protein wird durch das zytosolische Chaperon Hsc70 erkannt, gebunden und von diesem zur lysosomalen Membran transportiert (Chiang *et al.*, 1989). Hier angekommen interagiert das Substrat mit dem zytosolischen C-Terminus von LAMP-2A, was zu dessen Multimerisierung mittels eines innerhalb der LAMP-2A Transmembrandomäne gelegenen GXXG-Motives führt. Mutationen innerhalb dieses konservierten Bereichs verhindern die Multimerisierung und verringern die CMA-Aktivität (Abb. 4; Bandyopadhyay *et al.*, 2008).

Neben LAMP-2A wurden zwei weitere stabilisierende Proteine (GFAP und EF1 α) als Teil des Translokationskomplexes beschrieben (Bandyopadhyay *et al.*, 2010). Es wird postuliert, dass für die Translokation über den 700 kDa großen Proteinkomplex das CMA-Substrat linearisiert (Salvador *et al.*, 2000) und unter Hilfe eines luminalen (lys-)Hsc70 Proteins durch die lysosomale Membran bewegt wird, bevor es im Lumen degradiert werden kann (Abb. 4; Cuervo und Dice, 1996; Cuervo und Dice, 1998). Störungen im Ablauf der CMA und eine damit verbundene Akkumulation der CMA-Substrate sind, wie im Fall von α -Synuclein (Morbus Parkinson), vor allem mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert (Thompson *et al.*, 2009; Xilouri *et al.*, 2013).

Doch auch eine natürliche Abnahme der CMA-Aktivität, wie sie mit steigendem Alter beobachtet werden kann, hat zelluläre Einschränkungen zur Folge, welche durch Überexpression von LAMP-2A ausgeglichen werden können (Zhang und Cuervo, 2008).

RNautophagie

Vor kurzem wurde eine weitere Unterform der Autophagie mit einer LAMP-2 Isoform in Verbindung gebracht. Fujiwara *et al.* (2013) beschreiben einen ATP-abhängigen Abbau von RNA über den C-Terminus von LAMP-2C.

In *Pulldown*-Versuchen wiesen sie die Interaktion zwischen einem Peptidkonstrukt der zytosolischen LAMP-2C Sequenz und RNA nach. Mit Hilfe von isolierten Lysosomen konnten sie in *Uptake-Assays* nach Überexpression von LAMP-2C, nicht aber LAMP-2A und LAMP-2B, eine erhöhte RNA Degradation nachweisen. Auch für endogenes LAMP-2C konnte dieser, als RNautophagie benannte Prozess, in murinen Gehirnlisaten durch *Pulldown*-Versuche bestätigt werden.

Aufgrund der starken Homologie zwischen humanem LAMP-2C und dem orthologen Gen von LAMP-2 in *C. elegans* und *D. melanogaster* postulieren sie diesen Vorgang als die ursprünglichste Funktion der LAMP-2 Proteine.

1.1.5 Phagozytose

Für den Transport der unterschiedlichen Substrate ins Lysosom werden die streng regulierten Prozesse von Endo-, Phago- (Funato *et al.*, 1997) oder Autophagozytose (Cuervo und Dice, 1998; Lawrence und Brown, 1992 ; siehe auch 1.1.4.2) genutzt. Hierbei spielt die schrittweise Reifung von frühen Vesikeln, durch Fusion mit unterschiedlich stark maturierten, sich in ihrer Proteinzusammensetzung unterscheidenden Endosomen, hin zu fertigen Lysosomen, eine entscheidende Rolle.

Die Phagozytose ist Teil der angeborenen Immunantwort und eine Unterart der Endozytose. Bei ihr werden große (>0,5 µm), extrazelluläre Stoffe wie Pathogene oder apoptotische Zellen (wie seneszente Erythrozyten) von spezialisierten Zellen aufgenommen und lysosomal zersetzt. Die zur Phagozytose befähigten Zellen werden Phagozyten genannt. Zu ihnen zählen Monozyten, Makrophagen, Neutrophile Granulozyten und Dendritische Zellen (Alberts, 2002).

Das rezeptorvermittelte Umschließen eines extrazellulären Fremdkörpers durch die Zellmembran führt zur Bildung eines intrazellulären Phagosoms (Luzio *et al.*, 2007), welches durch die Fusion mit weiteren endo- und lysosomalen Vesikeln zum Phagolysosom heranreift. Einhergehend mit der Maturierung des Phagosoms verändert sich die Protein- und Lipidzusammensetzung des vesikulären Lumens und der Membran (Desjardins *et al.*, 1997; Pitt *et al.*, 1992). Der Abbau extrazellulären Materials dient nicht alleine dem Schutz des Organismus (z.B. Pathogene), sondern führt auch zur Gewinnung neuer bzw. der Wiederverwendung von bereits vorhandenen Bausteinen für die Zelle.

Ein typisches Beispiel ist die Erythrophagozytose, während derer seneszente Erythrozyten über Phosphatidylserinrezeptoren von Makrophagen erkannt und zur Eisenresorption phagozytiert werden (Bratosin *et al.*, 1998).

1.1.6 HRG-1 (Slc48a1)

Ein weiteres lysosomales Membranprotein ist das 2008 von Rajagopal *et al.* beschriebene *Heme-responsive Gene-1* (HRG-1, Slc48a1). Es wurde ursprünglich in *Caenorhabditis elegans* durch die Hochregulation seines Transkriptionsprodukts unter Häm-mangelbedingungen anhand von Genexpressionsanalysen identifiziert. Seine pH-abhängige Funktion als Hämtransporter wurde mittels Häm-Uptake-Assays in *C. elegans*, *Xenopus* Oozyten (Rajagopal *et al.*, 2008) und HeLa-Zellen (O'Callaghan *et al.*, 2010) näher charakterisiert.

Während im hämautotrophen Nematoden *C. elegans* noch vier weitere homologe Gene (*hrg-3 bis hrg-6*) exprimiert werden, deren Genprodukte unterschiedlich in der Zelle lokalisiert sind (Rajagopal *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2012), besitzen alle Säugetiere und die meisten Vertebraten nur eine Variante (*hrg-1*). Das relativ kleine HRG-1 Protein (146 AS) weist evolutionär eine hohe Sequenzhomologie auf, die mit einer konservierten Funktionalität verbunden ist. Diese Konservierung konnte in *Danio rerio* Embryonen nach *hrg-1 Knockdown* durch die Überexpression von *C. elegans hrg-1* gezeigt werden (Rajagopal *et al.*, 2008). Die Deletion von *hrg-1* in *D. rerio* bedingt einen embryonal letalen Phänotyp, der durch eine schwere Anämie sowie Entwicklungsstörungen gekennzeichnet ist. Vor allem die Maturierung durch Hämoglobinbeladung ist in Erythrozyten gestört (Rajagopal *et al.*, 2008).

Überexprimiertes CeHRG-1 und hHRG-1 ko-lokalisiert laut Rajagopal *et al.* in Hek293-Zellen mit lysosomalem LAMP-1 und teilweise mit endosomalem Rab7 und Rab11, während O'Callaghan *et al.* eine Ko-Lokalisation mit der Plasmamembran, dem Transferrinrezeptor (TfR), EEA1, Rab7 und Rab11, nicht aber mit LAMP-1 in MCF-7-Zellen beschreiben.

Auch was die Topologie von HRG-1 betrifft schlagen Rajagopal *et al.* und O'Callaghan *et al.* zwei unterschiedliche Modelle vor. Beide schildern vier putative Transmembrandomänen, wobei zum einen C- und N-Terminus im Zytoplasma liegen (Rajagopal *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2012 ; Abb. 5) und zum anderen der C-Terminus extrazellulär bzw. luminal exponiert ist (O'Callaghan *et al.*, 2010). Innerhalb des C-Terminus sind sowohl ein Häm-bindemotiv (*C. elegans*=FARKY, murin=YAHRV), als auch ein Tyrosin- (YXXxφ) und ein Di-Leucin- (D/EXXxLL) basiertes-Sortierungsmotiv lokalisiert (Rajagopal *et al.*, 2008). Für den Hämtransport über die Membran wurden neben dem FARKY/YARKY-Motiv topologisch und evolutionär konservierte Histidinreste (human = H⁵⁶ und H¹⁰⁰) beschrieben (Abb. 5). Durch Mutation dieser Aminosäurereste wurde in Überexpressionsexperimenten in *S. cerevisiae* die Hämtransportaktivität von HRG-1 unterbunden (Yuan *et al.*, 2012).

Northern Blot Analysen von humanen und murinen Organen zeigten eine starke Expression von *hrg-1* in Gehirn, Herz, Niere, Skelettmuskulatur und Leber in Form zweier mRNA Varianten (O'Callaghan *et*

al., 2010; Rajagopal *et al.*, 2008). Eine ebenfalls starke Expression kann in Duodenum, Nieren, Knochenmark und Gehirn abstammenden Zelllinien beobachtet werden (Rajagopal *et al.*, 2008). Als Interaktionspartner von hHRG-1 konnte die c-Untereinheit der membranständigen V-Typ H^+ -ATPase (ATP6V0C) anhand eines *Yeast Two-Hybrid Screens* identifiziert und mittels Ko-Immunopräzipitation in Hek293-Zellen validiert werden. Über diese Interaktion nimmt HRG-1 laut O'Callaghan *et al.* (2010) Einfluss auf das pH-abhängige Rezeptorrecycling (z.B. TfR) sowie die Viabilität von Tumorzellen. In ihnen wurde eine erhöhte Lokalisation von HRG-1 und der V-Typ H^+ -ATPase an der Plasmamembran beobachtet, welche sich proportional zu deren Potenzial zur Metastasierung verhält (Fogarty *et al.*, 2013).

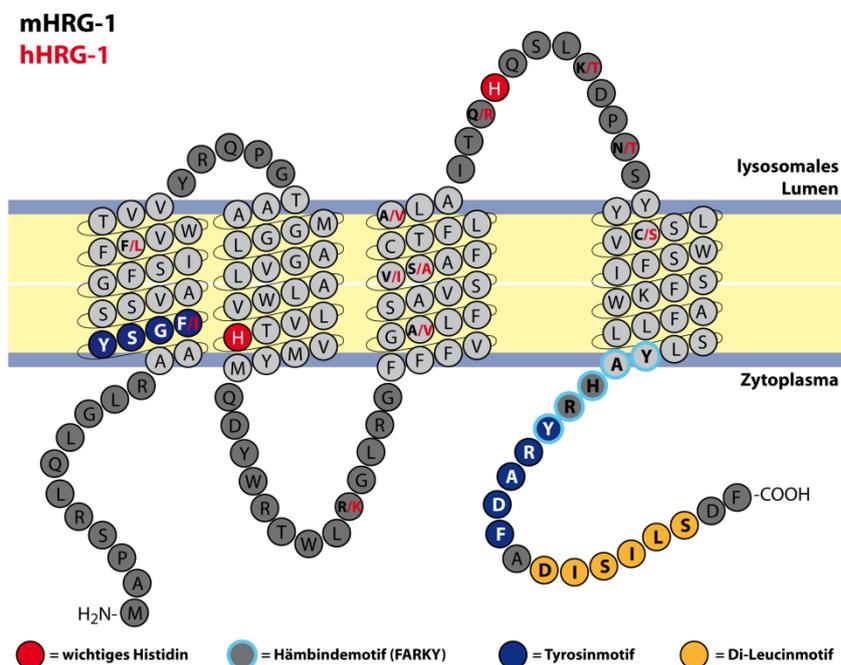


Abb. 5: Putative Topologie des HRG-1 Proteins. Die murine Aminosäuresequenz ist in schwarzer, die Unterschiede der humanen Sequenz in roter Schrift angezeigt. Abbildung modifiziert nach Yuan *et al.* (2012).

1.2 Häm

1.2.1 Synthese und Transport

Die prosthetische Hämgruppe ist eine Komplexverbindung, bestehend aus einem Porphyrinringsystem und einem zentralen Eisenatom (Fe^{2+}), die in jeder Zellkern-tragenden Zelle synthetisiert wird.

Die Synthese von Häm aus Glycin und Succinyl-CoA erfolgt in acht aufeinanderfolgenden enzymatischen Schritten, verteilt auf die Mitochondrien und das Zytoplasma. Die Synthese von δ -Aminolävulinat (ALA) im ersten Schritt erfolgt über die δ -Aminolävulinatsynthase 1 (ALAS1) und nur in den Erythroblasten des Knochenmarks über die ALAS2 (Anderson *et al.*, 2001). ALA wird ins Zytosol

der Zelle befördert und in vier weiteren Reaktionen in Coproporphyrinogen III (CPgenIII) umgewandelt, welches durch ABCB6 oder Slc25a11 zurück in den mitochondrialen Intermembranraum transportiert wird (Kabe *et al.*, 2006; Krishnamurthy *et al.*, 2006), bevor es dort in zwei weiteren Schritten zu Protoporphyrin IX (PPIX) konvertiert wird. Im letzten Schritt katalysiert die Ferrochelatase (FECH) die Insertion des zentralen Fe^{2+} -Ions zur finalen Erzeugung von Häm (Abb. 6). Über welche Wege die prosthetische Gruppe aus den Mitochondrien ins Zytosol gelangt, sowie es von dort in die unterschiedlichen Hämproteine integriert wird, ist ungeklärt.

Während es hunderte von Hämproteinen in der Zelle gibt, ist die am häufigsten im Körper vorkommende Variante das Hämoglobin der Erythrozyten. Es besteht aus vier Globinuntereinheiten mit je einer Hämgruppe (Häm b) und dient dem Sauerstoff- und Kohlendioxidtransport im Blut, hin zum Myoglobin der Muskelzellen (Munoz *et al.*, 2009). Während der embryonalen Entwicklung sind Leber und Milz der Hauptsyntheseort des fetalen Hämoglobins ($\alpha_2\gamma_2$). Erst nach der Geburt wird das sich durch seine verringerte Sauerstoffaffinität charakterisierte adulte Hämoglobin ($\alpha_2\beta_2$ bzw. $\alpha_2\delta_2$) im Knochenmark erzeugt.

In vielen weiteren fundamentalen Signaltransduktions- und Stoffwechselprozessen spielen Hämproteine wie Redox-aktive Cytochrome der Atmungskette, Monooxygenasen sowie antioxidativ wirkende Katalasen und Peroxidasen eine zentrale Rolle. Ihre Fähigkeit Sauerstoff, Stickstoff- und Kohlenstoffmonoxid zu binden erlaubt es ihnen zusätzlich als Gassensor zu fungieren (Tracz *et al.*, 2007). Freies, nicht an Proteine gebundenes Häm, ist in der Lage die Expression von Genen wie *alas1* und *hmx1* negativ zu regulieren und somit die eigene Synthese und Degradation zu beeinflussen (Anderson *et al.*, 2001; Lathrop und Timko, 1993; Qi *et al.*, 1999; Srivastava *et al.*, 1993).

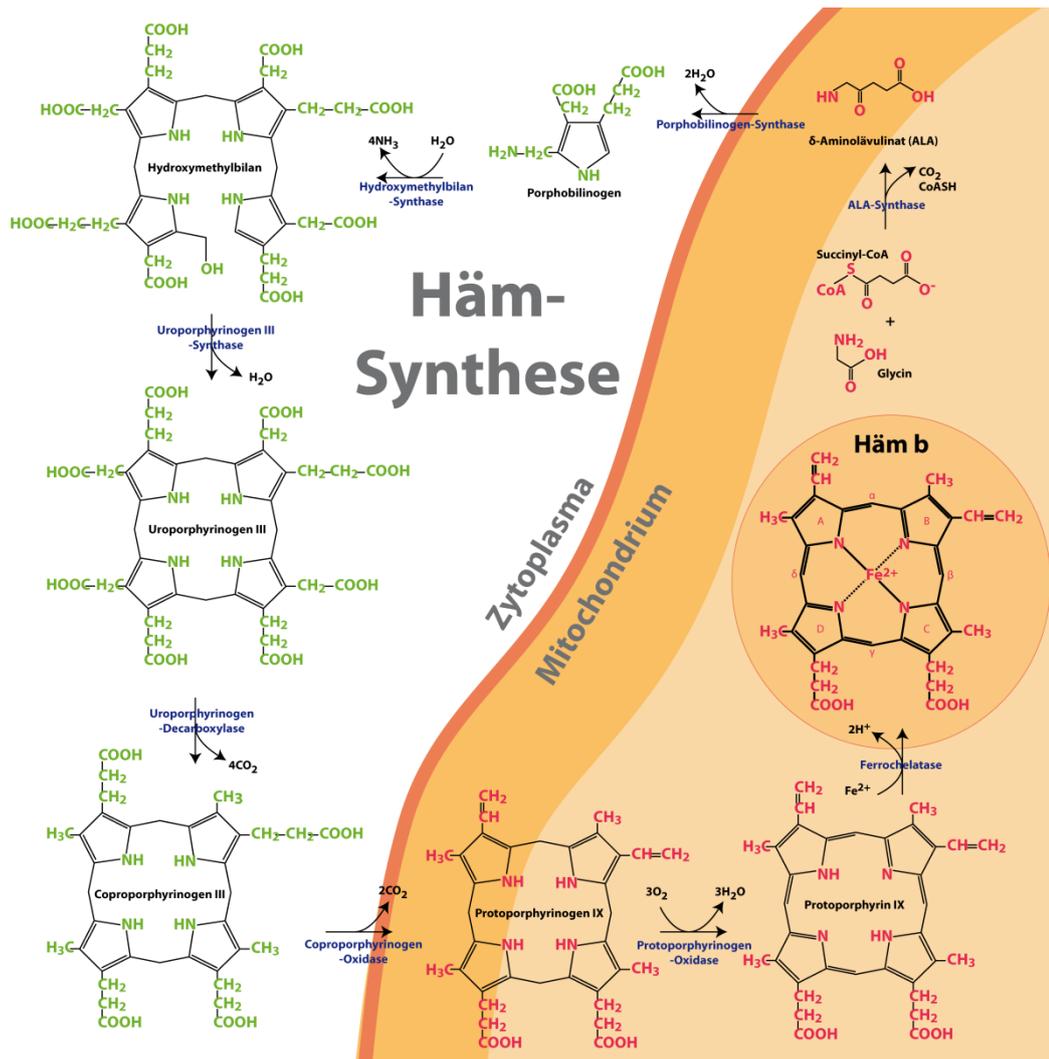


Abb. 6: Schematische Darstellung der Hämsynthese. Aus Glycin und Succinyl-CoA wird über acht aufeinanderfolgende Schritte, verteilt auf Mitochondrien und Zytoplasma, Häm b synthetisiert.

1.2.2 Abbau und Export

Zu einem verstärkten Überschuss an Hämproteinen kommt es z.B. während der Degradation von Erythrozyten. Jedes phagozytierte rote Blutkörperchen enthält circa eine Milliarde zytotoxischer Hämoleküle, deren Anreicherung in der Zelle vermieden werden muss.

Die Degradation von Hämproteinen in Lysosomen führt zur Freisetzung von Aminosäuren und den lipophilen Hämgruppen. Während die Aminosäuren aus den Lysosomen zur erneuten Proteinbiosynthese geleitet werden (Liu *et al.*, 2012), besitzt freies Häm aufgrund seiner hohen Reaktivität zytotoxische Eigenschaften. So katalysiert es die Bildung von Sauerstoffradikalen (Fenton-Reaktion), welche oxidative Lipid-, Protein-, DNA- und Gewebeschäden, sowie chronische Entzündungen bedingen können (Balla *et al.*, 2003; Ryter und Tyrell, 2000). Um dieser Gefahr zu entgehen, bedarf es entweder des Exports aus der Zelle mittels FLVCR1 (*feline leukemia virus subgroup C receptor 1*; Quigley *et al.*, 2004) oder, um den Verlust des zentralen Eisenatoms zu vermeiden, der oxidativen Spaltung des Porphyrinringsystems (Abb. 7).

FLVCR1 war der erste beschriebene Hämtransporter in Säugerzellen (Quigley *et al.*, 2004). Der über ihn ablaufende Hämexport wird über das extrazelluläre, Häm-bindende Protein Hemopexin reguliert (Yang *et al.*, 2010). Der *Knockout* von *flvcr1* ist in Mäusen embryonal letal (\leq E16,5), was hauptsächlich durch eine gestörte Erythropoese bedingt ist (Keel *et al.*, 2008). Auch die Degradation von Erythrozyten führt nach *Knockdown* von FLVCR1 in Makrophagen zu erhöhten Eisen- und Ferritinspiegeln (Khan und Quigley, 2013).

Die für die oxidative Spaltung des Porphyrinringsystems verantwortlichen Proteine sind die Hämoxigenasen (HO), von denen drei Isoformen beschrieben sind (Ponka, 1997; Tenhunen *et al.*, 1970). Es handelt sich um Typ-2 Transmembranproteine, die im glatten endoplasmatischen Retikulum verankert sind (Yanatori *et al.*, 2010). Ihr aktives Zentrum befindet sich im zytosolisch gelegenen N-Terminus. HO-1 und HO-2 werden beide ubiquitär exprimiert. Während die Expression von *ho-2* konstitutiv ist, wird *ho-1* sowohl durch Häm, als auch Schwermetalle, Sauerstoffmangel und oxidativen Stress induziert, was HO-1 zum limitierenden Faktor des Hämabbaus macht (Ryter und Tyrrell, 1997). Die Aktivität von HO-1 lässt sich über eine proteolytische Spaltung des N-Terminus negativ beeinflussen. Das inaktive N-terminale Fragment (NTF) kann durch die Translokation in den Nukleus indirekt die Expression von Genen regulieren, die für die Bekämpfung von oxidativem Stress benötigt werden (Lin *et al.*, 2007). Eine HO-3 Variante wurde bisher nur im Ratten Gehirn als Pseudogen beschrieben (Hayashi *et al.*, 2004).

Damit Häm unter Sauerstoffverbrauch zu Fe^{2+} -Ionen, Kohlenstoffmonoxid (CO) und Biliverdin degradiert werden kann, muss es zuerst ins Zytoplasma transportiert werden. Zwar ermöglichen die lipophilen Eigenschaften von Häm dessen Diffusion durch Zellmembranen, jedoch nur sehr langsam/bei physiologisch nicht ausreichenden Geschwindigkeiten (Light und Olson, 1990; Müller-Eberhard und Fraig, 1993).

Aufgrund seiner Affinität zu Häm und seiner Lokalisation in der lysosomalen Membran wurde HRG-1 (1.1.6) als ein möglicher Kandidat für diese Aufgabe beschrieben (Abb. 7; Delaby *et al.*, 2012; O'Callaghan *et al.*, 2010; Rajagopal *et al.*, 2008; White *et al.*, 2013).

Der Abbau von Häm unter Bildung von Fe^{2+} -Ionen und CO, zwei ebenfalls zytotoxischen Molekülen, setzt weiterführende, streng regulierte Transportprozesse voraus. Es wirft außerdem die Frage auf, weshalb große Mengen an Eisen (Fe^{2+}) erst aus Hämoglobin freigesetzt werden, während es zur gleichen Anzahl erneut für die Hämoglobinsynthese verwendet wird. Die Antwort hierfür liegt in der räumlichen Trennung der Hämoglobindegredation und -Synthese. Während der Großteil der Hämoglobin enthaltenden Erythrozyten in Milz und Leber phagozytiert werden, findet die Erythropoese im Knochenmark statt. Der Transport von sowohl Häm als auch Hämoglobin würde, aufgrund der starken Toxizität beider Stoffe, nicht zuletzt weitere Ex- und Importproteine voraussetzen (Sassa, 2004).

Während die meisten Enzyme, die in die komplexen Vorgänge der Hämbiosynthese und -Degradation verwickelt sind identifiziert wurden, sind bis auf wenige Ausnahmen die an dem Transport beteiligten Proteine und Mechanismen unbekannt (Severance und Hamza, 2009; Yuan *et al.*, 2013).

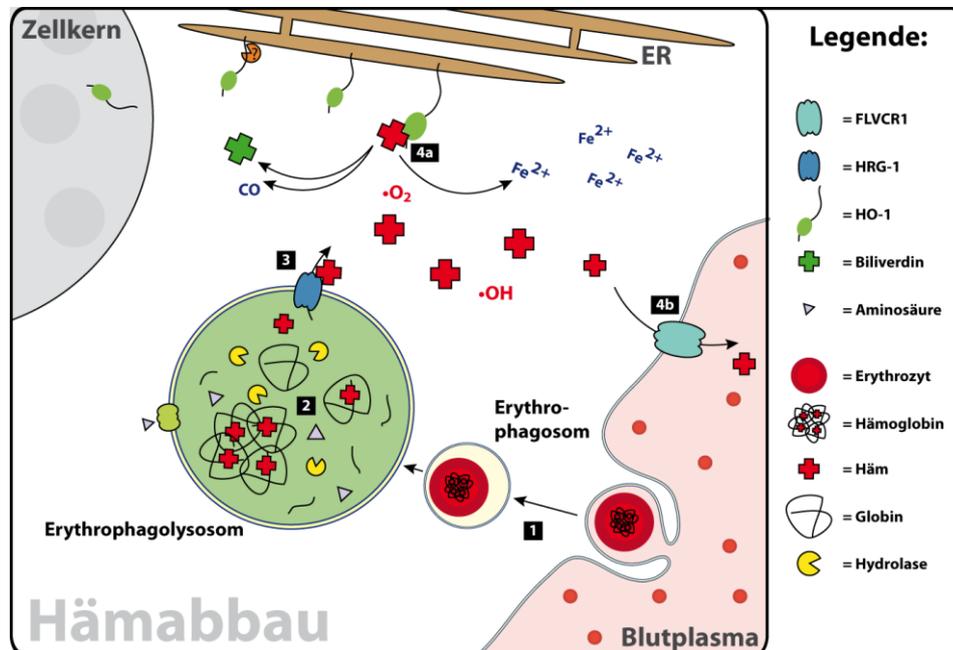


Abb. 7: Schematische Übersicht der Hämbiosynthese und -Degradation nach Erythrophagozytose. 1) Ein Erythrozyt wird aus dem Blutplasma in die Zelle phagozytiert und 2) im Erythro-phagosom degradiert, wobei Häm freigesetzt wird. 3) Mittels HRG-1 wird dieses ins Zytoplasma exportiert und 4a) durch HO-1 weiter zu Biliverdin, CO und Fe^{2+} degradiert bzw. 4b) über FLVCR1 aus der Zelle transportiert.

1.3 Eisenrecycling

Eisen ist ein essentielles Spurenelement mit zentraler Rolle in vielen biochemischen Reaktionen. Während der menschliche Körper 3-4 g Eisen enthält sind 70% des körpereigenen Eisens in Hämproteinen gebunden. Der Großteil im Hämoglobin der Erythrozyten.

Die Aufnahme von Eisen über die Nahrung erfolgt in Enterozyten des proximalen Duodenums hauptsächlich durch die Resorption von Häm (Raffin *et al.*, 1974). Dieses wird durch Hämoxxygenasen gespalten und Fe^{2+} über Ferroportin aus der Zelle ins Plasma exportiert (Conrad und Umbreit, 2000). Der Export von Eisen ins Blut kann über das hepatische Peptidhormon Hephästin unterbunden werden. Es wirkt als Hauptregulator in der Eisenabsorption über Enterozyten, dem Eisenrecycling aus Makrophagen, sowie der versorgenden Eisenausschüttung aus Hepatozyten (Nicolas *et al.*, 2003). Hierfür bindet es an den Eisenexporter Ferroportin und führt zu dessen Internalisierung und lysosomaler Degradation (Nemeth *et al.*, 2004b; Samaniego *et al.*, 1994).

Plasmaeisen wird durch Ceruloplasmin und Hephästin zu Fe^{3+} oxidiert und an Transferrin gebunden zur Leber und zum Knochenmark transportiert. Über den Transferrinrezeptor kann Fe^{3+} aus dem Blut zurück in die Zelle gelangen.

Zur Speicherung von Eisen dient zum einen Ferritin, welches einen scheibenförmigen Komplex bildet und durch seine Ferroxidase-Aktivität die Redox-Aktivität von Eisen inhibiert (Balla *et al.*, 1992), und mit steigendem Eisenspiegel in der Zelle zusätzlich Hämosiderin (Wixom *et al.*, 1980).

Hämosiderin ist eine unlösliche Aggregation aus Fe^{3+} und teils verdaulichem Ferritin sowie weiteren Proteinen, die der Zelle ein gesteigertes Eisenspeichervolumen ermöglicht, jedoch für die schnelle Wiederverwertung von Eisen ungeeignet ist (Fischbach *et al.*, 1971). Die meisten Hämosiderinablagerungen sind in Zellen des Retikuloendothelialen Systems (RES) zu finden (Bothwell und Charlton, 1979), zu dem hauptsächlich Monozyten und Gewebe-Makrophagen der Leber und der Milz zählen. Da Erythrozyten im Menschen eine Lebenserwartung von 120 Tagen und in der Maus von 50 Tagen (Saxena und Khandelwal, 2009) haben, findet in den sie phagozytierenden Zellen des RES eine stetige Degradation statt. Pro Tag werden 200 Milliarden seneszente Erythrozyten, vor allem in der roten Pulpa der Milz, abgebaut und damit verbunden, Eisen aus Hämoglobin recycelt (Knutson und Wessling-Resnick, 2003; Kovtunovych *et al.*, 2010).

Trotz dieses hohen Eisenumsatzes im Körper werden weniger als 1 mg Eisen über den Tag ausgeschieden (Knutson und Wessling-Resnick, 2003). Der Hauptgrund für Eisenmangelercheinungen ist eine unzureichende Aufnahme durch die Nahrung, aber auch ein erhöhter Blutverlust oder genetische Dispositionen können die Eisenhomöostase beeinflussen. Symptome für Eisenmangel (Anämie) können von Müdigkeit und Blässe bis hin zu körperlichen und mentalen Entwicklungsstörungen reichen (Andrews, 1999).

1.4 Protein-Interaktionsscreens

Die Interaktion zwischen Proteinen spielt eine entscheidende Rolle in allen physiologischen Prozessen der Zelle. Über die Charakterisierung des Proteininteraktoms werden sich Rückschlüsse auf zelluläre Signaltransduktionswege erhofft. Ein so gewonnenes, besseres Verständnis der Proteinfunktion für den Organismus verspricht Erkenntnisse zu pathologischen Symptomen von Genmutationen. Dies ist Grundvoraussetzung für eine gezielte Beeinflussung der gestörten zellulären Funktionen und die Heilung betroffener Patienten. Mit Hilfe von Hochdurchsatzverfahren lassen sich große Mengen an putativen Interaktionspartnern eines Proteins in verhältnismäßig kurzer Zeit testen.

Der *Yeast Two-Hybrid Screen* ist ein *in vivo* Proteinfragment-Komplementierungs-Assay. Für ihn wird sich des Transkriptionsfaktors GAL4 bedient, dessen N-terminale Domäne an UAS (*upstream activating sequence*)-Regionen vom Reporter gen (*LacZ*) binden kann, während die C-terminale Domäne für die Aktivierung von dessen Transkription verantwortlich ist (Keegan *et al.*, 1986).

Für den Nachweis einer Protein-Protein Interaktion werden je zwei Fusionsproteine in Hefezellen (*S. cerevisiae*) eingebracht. Die Hybridkonstrukte bestehen jeweils aus Protein X und dem N-terminalen Teil von GAL4 (BD) bzw. aus Protein Y und dem C-terminalen Teil von GAL4 (AD).

Durch die Bindung von BD an die UAS-Region befindet sich auch Protein X an dieser Stelle des Genoms. Bindet Protein Y an Protein X wird hierdurch ebenfalls die AD zum Reporter gen rekrutiert. Es kommt zu einer indirekten Komplementierung beider Hälften von GAL4, welches nun als Transkriptionsfaktor agieren kann (Abb. 8 a; Fields und Song, 1989).

Dieser Ansatz setzt die nukleare Lokalisation beider Hybridkonstrukte voraus, weshalb nur relativ kleine, zytosolische Proteine, die in den Zellkern translozieren können, geeignet sind.

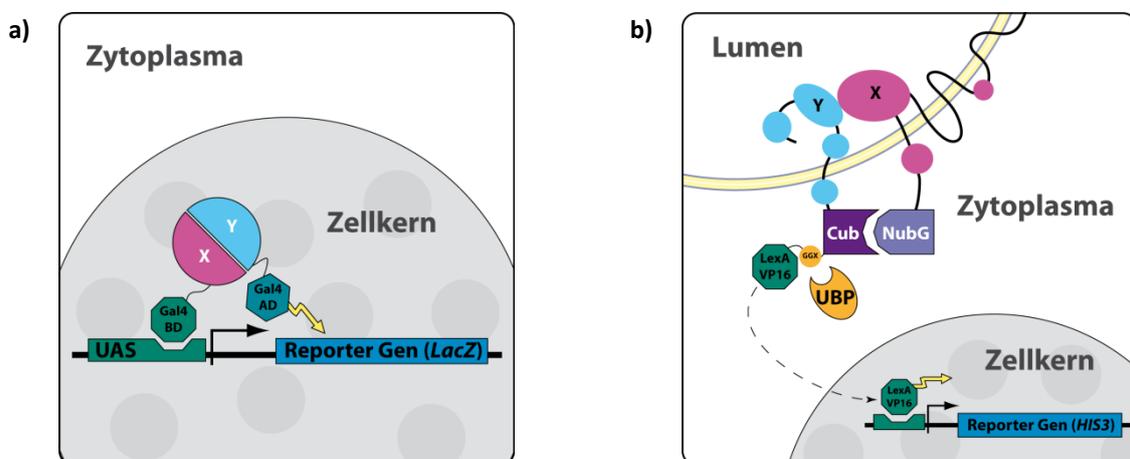


Abb. 8: Schematische Darstellung zweier Protein-Interaktionsscreens. a) Yeast Two-Hybrid Screen: Aktivierung eines Reportergens nach Interaktion zweier Proteinfragmente im Zellkern. **b) Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screen:** Aktivierung des Reportergens nach Komplementierung eines *Split-Ubiquitins* im Zytoplasma aufgrund der Interaktion zweier Proteine.

Der *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screen* ist eine Weiterentwicklung des *Yeast Two-Hybrid* Verfahrens (Stagljar *et al.*, 1998). Mit seiner Hilfe ist es möglich nicht nur die Interaktion zytosolischer, sondern auch membranständiger Proteine zu erforschen.

Hierfür wurden die GAL4 Fragmente des *Yeast Two-Hybrid Screens* (s.o.) durch ein C-terminales und ein N-terminales Ubiquitinfragment ersetzt. Die resultierenden Hybridkonstrukte bestehen aus Protein X und dem N-terminalen Teil von Ubiquitin (NubG) bzw. aus Protein Y und dem C-terminalen Teil von Ubiquitin (Cub). Durch eine Punktmutation im NubG-Fragment ist die natürliche Affinität beider Ubiquitinfragmente zueinander zerstört. An das Cub-Fragment ist zusätzlich ein Transkriptionsfaktor gekoppelt (LexA-VP16). Finden NubG und Cub durch Interaktion der an sie fusionierten Proteine X und Y zusammen, bilden sie ein *Split-Ubiquitin*-Protein (Johnsson und Varshavsky, 1994), welches durch Ubiquitin-spezifische Proteasen (UBPs) erkannt wird. Mit Hilfe der UBPs werden die Transkriptionsfaktoren vom Cub-Fragment abgespalten und immigrieren in den Zellkern, woraufhin ein Reporter gen (*HIS3*, *ADE2*, *LacZ*) transkribiert wird (Abb. 8 b).

Durch die Freisetzung des Transkriptionsfaktors im Zytosol ist die Translokation der untersuchten Proteine in den Zellkern nicht mehr nötig, was eine *in situ* Interaktionsstudie ermöglicht. Dies schafft den Vorteil, sowohl große Transmembranproteine unter physiologischen Bedingungen untersuchen zu können, als auch für die Interaktion wichtige, posttranslationale Modifikationen erhalten zu können.

Trotz der Möglichkeit die Stringenz der *Yeast Two-Hybrid* Interaktionsscreens zu erhöhen liefert diese Methode eine große Anzahl falsch-positiver Ergebnisse, was eine zusätzliche Validierung mittels Ko-Immunopräzipitation unumgänglich macht.

Ko-Immunopräzipitations-basierte Massenspektrometrische Analysen, wie von Jäger *et al.* (2011) beschrieben, sind eine weitere Form des Protein-Protein Interaktionsnachweises. Für den Hochdurchsatzansatz werden eukaryotische Zellen (z.B. Hek293) transient oder stabil mit einem getaggtten Proteinkonstrukt transfiziert. Anschließend werden das synthetisierte Protein, sowie alle daran gebundenen Proteine, mittels des Affinitätstags aus dem Zellhomogenat aufgereinigt und angereichert. Die so gewonnenen Proteine werden entweder direkt oder nach Auftrennung über eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) per Massenspektrometer identifiziert.

Während die zuvor beschriebenen *Yeast Two-Hybrid Screens* die Interaktion von genau zwei Proteinen miteinander nachweisen, erlaubt der massenspektrometrische Ansatz die Identifikation von indirekten Interaktionspartnern, wie sie in Proteinkomplexen gefunden werden. Der Aufbruch der Zellen setzt allerdings eine stabile Interaktion der Proteine voraus, die auch *in vitro* anhalten muss. Die *Yeast Two-Hybrid Screens* zeigen dem gegenüber vermehrt transiente Interaktionen an (Yu *et al.*, 2008).

1.5 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung neuer Interaktionspartner des lysosomal-assoziierten Membranproteins LAMP-2.

LAMP-2 zählt zu den häufigsten Proteinen in der lysosomalen Membran. Mutationen des Proteins sind die Ursache der Danon Erkrankung. Bei dieser lysosomalen Speichererkrankung kommt es in einer Vielzahl von Organen zur charakteristischen Akkumulation von autophagozytischen Vesikeln, wie es auch in LAMP-2 *Knockout* Mäusen beobachtet werden kann. Patienten mit der Danon Erkrankung leiden unter Kardiomyopathien, Skelettmuskulmyopathien und unterschiedlich stark ausgeprägten, geistigen Retardierungen. Funktionelle Zusammenhänge zwischen dem Verlust von LAMP-2 und dem resultierenden klinischen Bild sind bisher wenig verstanden.

Obwohl LAMP-2 seit längerem erforscht wird, sind bis heute nur zwei Interaktionspartner identifiziert worden. Aus diesem Grund wurde gehofft anhand neu identifizierter Interaktionspartner weitere zelluläre Prozesse bestimmen zu können, in denen LAMP-2 eine wichtige Rolle spielt. Hierfür sollten *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screens* mit den murinen LAMP-2 Isoformen LAMP-2A und LAMP-2B durchgeführt werden.

Nach der Identifizierung von HRG-1 (*heme-responsive gene 1*) als Interaktionspartner von LAMP-2, sollte eine nähere Charakterisierung der Interaktion dieser zwei Membranproteine der Lysosomen erfolgen, sowie der Einfluss von LAMP-2 auf HRG-1 in Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Mäusen untersucht werden. Hierbei sollte der mit HRG-1 assoziierte Häm- und Eisenstoffwechsel eine besondere Beachtung finden.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien stammten von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe, D), Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA), Merck (Darmstadt, D) und Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Sie erfüllten den Reinheitsgrad *p.a.*.

Alle Lösungen wurden mit ddH₂O (Millipore, Schwalbach) angesetzt. Die Lösungen und Gerätschaften wurden zur Sterilisierung autoklaviert (Tecnomara Integra Biosciences GmbH, Fernwald).

2.1.2 Mauslinien

Die für diese Arbeit genutzten Tiere wurden in belüfteten Käfigen (IVCs) bei einer Luftfeuchtigkeit von 45-60% und einer Temperatur von 19-21 °C unter einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die Tiere erhielten Trockenfutter (Ssniff Spezialitäten GmbH) und Wasser. Der Umgang erfolgte gemäß den Richtlinien der Christina-Albrechts-Universität zu Kiel.

Es wurden LAMP-2 defiziente Mäuse (Tanaka *et al.*, 2000) aus der eigenen Anzucht und ihre Wildtyp Geschwistertiere verwendet.

2.1.3 Zelllinien & Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurde mit den in Tabelle 1 aufgeführten eukaryotischen Zelllinien und dem prokaryotischen Bakterienstamm gearbeitet.

Tab. 1: Verwendete Zelllinien und Bakterienstämme.

Zelllinie	Referenz	
Eukaryotische Zellen		
Cos7	Niere der grünen Meerkatze	DMSZ, Braunschweig, D
Hek293T	Humane embryonale Nierengewebszellen	DKFZ, Heidelberg, D
HeLa	Humane Zervixkarzinomzellen	DMSZ, Braunschweig, D
MEFs	Murine Embryonale Fibroblasten	2.2.3.5
NMY51	Hefe-Reporterstamm	Dualsystems Biotech, Schlieren, CH
Prokaryotische Zellen		
<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> XL1 Blue	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

2.1.4 Plasmide und Konstrukte

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Plasmide, sowie die in Tabelle 3 beschriebenen Konstrukte verwendet.

Tab. 2: Verwendete Plasmide.

Name	Herkunft	Promotor	Resistenz	Tags	Größe (bp)
pCI-neo	Promega	CMV, SV40	Amp / Neo	/	5472
pcDNA TM 3.1/Hygro ⁽⁺⁾	Life Technologies	CMV, SV40	Amp / Hygro	/	5600
pcDNA TM 4/TO	Life Technologies	CMV, SV40	Amp / Zeo	3*FLAG	5078
pTMBV4	Dualsystems Biotech	Cub-LexA-VP16	Kan / Leu2	Cub	7850
pPR3-C	Dualsystems Biotech	BS	Amp / Trp1	NubG	6624
pDSL-Nx	Dualsystems Biotech		Amp / Trp1	NubG	6336
pPR3-N	Dualsystems Biotech	BS	Amp / Trp1	NubG, Library	6204
pAl-Alg5	Dualsystems Biotech	BS	Amp / Trp1	Alg5-Nubl	7696
pDL2-Alg5	Dualsystems Biotech	BS	Amp / Trp1	Alg5-NubG	7696
pFrog3 (mod)	(Gunther <i>et al.</i> , 1998)	CMV, SV40	Amp / Neo	HA / myc	~5720
pMSSVLT	(Schuermann, 1990)		Amp / Kan / G418		

Tab. 3: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte.

Name	Vektor	Tag	Genutzte Restriktions-schnittstellen
mLAMP-2A	pTMBV4	-Cub	Sfil / Sfil
mLAMP-2B	pTMBV4	-Cub	Sfil / Sfi/
pPR3-c Slc48a1	pPR3-C	-NubG	Sfil / Sfil
mHRG-1	pcDNA TM 3.1/Hygro ⁽⁺⁾		NheI / KpnI
hHRG-1	pcDNA TM 3.1/Hygro ⁽⁺⁾		NheI / KpnI
mHRG-1-HA	pcDNA TM 3.1/Hygro ⁽⁺⁾	-HA	XhoI / ClaI / XbaI
ΔNt-mHRG-1-HA	pcDNA TM 3.1/Hygro ⁽⁺⁾	-HA	XhoI / ClaI / XbaI
Myc-mHRG-1	pcDNA TM 3.1/Hygro ⁽⁺⁾	myc-	NheI / ClaI / KpnI
Myc-mHRG-1-ΔCt	pcDNA TM 3.1/Hygro ⁽⁺⁾	myc-	NheI / ClaI / KpnI
HA-mHRG-1	pFrog (mod)	HA-	BamHI / EcoRI
HA-mHRG-1Y133A	pFrog (mod)	HA-	BamHI / EcoRI
HA-mHRG-1ILS142-144AAA	pFrog (mod)	HA-	BamHI / EcoRI
HA-mHRG-1Y133A+ILS142-144AAA	pFrog (mod)	HA-	BamHI / EcoRI
hLAMP-2A 3*FLAG Ct	pcDNA TM 4/TO	3*FLAG	BamHI / XhoI
hLAMP-2A 3*FLAG h	pcDNA TM 4/TO	3*FLAG	BamHI / NotI
hLAMP-2B 3*FLAG Ct	pcDNA TM 4/TO	3*FLAG	BamHI / XhoI
hLAMP-2B 3*FLAG h	pcDNA TM 4/TO	3*FLAG	BamHI / NotI
hLAMP-1 3*FLAG Ct	pcDNA TM 4/TO	3*FLAG	BamHI / XhoI

2.1.5 Primär- und Sekundärantikörper

Die in Tabelle 4 und Tabelle 5 aufgeführten Primär- und Sekundärantikörper wurden für diese Arbeit verwendet.

Tab. 4: Verwendete Primärantikörper.

Primärantikörper						
Antigen	Bezeichnung	Erzeugt in	Hersteller	Verdünnung		
				IF	WB	IHC
mLAMP-2	AbI93	Ratte	DSHB	1:100	/	/
mLAMP-2	AbI93c	Ratte	DSHB	/	1:1000	1:1000
hLAMP-2	H4B4	Maus	DSHB	1:100	/	/
mLAMP-1	1D4B	Ratte	DSHB	1:250	/	/
hLAMP-1	H4A3	Maus	DSHB	1:100	/	/
HRG-1	HRG1 rab2	Kaninchen	Pineda	1:200	1:1000	1:1000
HO-1	HO-1	Kaninchen	Enzo	1:1000	1:1000	1:1000
LBPA	6C4	Maus	J. Gruenberg	1:50	/	/
TfR	TfR	Maus	Life Technologies	1:200	1:1000	/
hEEA1	EEA1	Maus	BD Biosciences	1:500	/	/
FLAG	M2	Maus	Sigma	1:1000	1:1000	/
myc	9B11	Maus	Cell Signaling	1:1000	1:2000	/
HA	3F10	Ratte	Roche	1:1000	1:1000	/
CD68	CD68	Ratte	AbD Serotec	1:500	/	1:3000
Siglec-1	CD169	Ratte	BioLegend	/	/	1:3000
α -Actin	Actin	Kaninchen	Sigma	/	1:3000	/
KDEL	KDEL	Maus	Enzo	1:200	/	/

Tab. 5: Verwendete Sekundärantikörper.

Sekundärantikörper						
Antigen	Bezeichnung	Erzeugt in	Hersteller	Verdünnung		
				IF	WB	IHC
Maus IgG	Maus-POD	Schaf	Santa Cruz	/	1:20000	/
Ratte IgG	Ratte-POD	Schaf	Santa Cruz	/	1:20000	/
Kaninchen IgG	Kaninchen-POD	Esel	Santa Cruz	/	1:20000	/
Maus IgG	Maus Alexa Fluor 594	Esel	Life Technologies	1:500	/	/
Ratte IgG	Ratte Alexa Fluor 488	Ziege	Life Technologies	1:500	/	/
Ratte IgG	Ratte Alexa Fluor 594	Esel	Life Technologies	1:500	/	/
Kaninchen IgG	Kaninchen Alexa Fluor 488	Ziege	Life Technologies	1:500	/	/
Kaninchen IgG	Kaninchen Alexa Fluor 594	Esel	Life Technologies	1:500	/	/

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 RNA Isolierung

Zur Gewinnung von mRNA aus Zellen oder Geweben wurde das *Nucleo-Spin® RNA II Kit* (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Hierfür wurden zunächst 30 mg Gewebe auf Trockeneis in ein 2 ml Schraubdeckelgefäß überführt und mit 600 µl Lysispuffer sowie ca. 20 Precellys-Keramik-Kügelchen (1,4 mm, PeqLab) versetzt. Die Gewebe wurden zweimal für 20 sec bei 6500 rpm in einem Precellys Homogenisator (PaqLab) mechanisch aufgebrochen, bevor die weiteren Schritte entsprechend der Herstellerangaben befolgt wurden.

Die gewonnene RNA wurde anschließend photometrisch auf ihre Konzentration und Reinheit (2.2.1.3) untersucht. Zudem wurde 1 µg RNA mit 6x Auftragspuffer auf einem frischgegossenen 1%igem Agarosegel (2.2.1.5) hinsichtlich der RNA Degradation begutachtet.

2.2.1.2 cDNA Umschrift

Die Umschrift von RNA (2.2.1.1) in cDNA erfolgte entsprechend Herstellerangaben über das *RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific).

Sollte die gewonnene cDNA als Template für qRT-PCR Versuche (2.2.1.13) genutzt werden wurden die *random* Hexamer-Oligonukleotide verwendet, für eine Klonierungs-PCR (2.2.1.3) die Oligo-dT-Nukleotide.

		PCR-Schritt	Temp.	Dauer	
2 µl	cDNA-Template (s.o.)	Initialdenaturierung	95 °C	5 min	} 35 Zyklen
5 µl	10x <i>Dream Taq</i> Puffer mit MgCl ₂	Denaturierung	95 °C	45 sec	
5 µl	dNTPs (2 mM; dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Anlagerung der Oligonukleotide	60 °C	30 sec	
1 µl	vorwärts (<i>forward</i>)- Oligonukleotide (10 µM)	Elongation	72 °C	1 min	
1 µl	rückwärts (<i>reverse</i>)- Oligonukleotide (10 µM)	Finale Elongation	72 °C	10 min	
2,5 µl	DMSO	Kühlung	10 °C	∞	
0,5 µl	<i>Dream Taq</i> - DNA- Polymerase (5 U/ µl)				
33 µl	ddH ₂ O				

2.2.1.3 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Nukleinsäurekonzentration wässriger Lösungen wurde photometrisch, unter zur Hilfenahme des Lambert-Beerschen Gesetzes, am *Synergy HT Multifunktionsplattenleser* (BioTek) entsprechend der Absorptionseigenschaften bei $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm bestimmt. Reine DNA weist hierbei eine OD_{260/280} von 1,8 und reine RNA von 2 auf.

2.2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasen-Kettenreaktion lassen sich gezielt DNA-Abschnitte von einem Template, welches als Matrize dient, amplifizieren und vervielfältigen (Mullis *et al.*, 1986). Als Template wurden je nach späterem Verwendungszweck Plasmid-DNA (Klonierung, 2.2.1.4.2), cDNA (Klonierung, 2.2.1.4.2; RT-PCR, 2.2.1.4.3) oder genomische DNA (Genotypisierung, 2.2.1.4.1) genutzt. Im Falle von Klonierungen wurde eine *proof-reading* DNA-Polymerase (*Pfu*, Thermo Fisher Scientific), in allen

anderen die *Taq*-Polymerase (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Zusätzlich wurden Oligonukleotide (Sigma-Aldrich) sowie Polymerasepuffer mit $MgCl_2$ und dNTPs (Thermo Fisher Scientific) benötigt. Die Reaktion erfolgte in *GeneAmp PCR System 2400* Thermocyclern (PerkinElmer).

2.2.1.4.1 LAMP-2 Genotypisierungs-PCR

Die Überprüfung von Mäusen auf ihren LAMP-2 Genotyp erfolgte über eine PCR (2.2.1.4.1) unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide (Tab. 6). Zum einen wurde die Insertion der Neo-Kassette (neo-PCR) nachgewiesen, zum anderen wurde die korrekte Lokalisation der Kassette im *lamp-2* Exon anhand einer Größenveränderung des PCR-Produkts validiert (Exon-PCR). Bei Mäusen die das neo-PCR- (374 bp) sowie beide Exon-PCR Amplifikate (480 bp, 1680 bp) zeigen handelt es sich um Heterozygote Tiere. Die das neo-PCR- und nur das 1680 bp große Exon-PCR Amplifikat zeigen sind *Knockout* Tiere. Mäuse ohne neo-PCR- und mit nur 480 bp großen Exon-PCR Amplifikaten sind Wildtypiere.

Tab. 6: Oligonukleotide der Genotypisierungs Polymerase-Kettenreaktionen.

Name	Sequenz (5' – 3')
Neo_forward	f GTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTG
Neo_reverse	r GCGAACAGTTCGGCTGGCGCGAGCCCCTGA
Exon_forward	f GTGGGCTTTTACTGATGTC
Exon_reverse	r CTTTAGCTACAGCACCAGGAAAT

neo-PCR (Amplifikat 374 bp)

	PCR-Schritt	Temp.	Dauer
2 µl Template	Initialdenaturierung	95 °C	5 min
5 µl 10x <i>DreamTaq</i> Puffer mit $MgCl_2$	Denaturierung	96 °C	15 sec
1 µl $MgCl_2$	Anlagerung der Oligonukleotide	58 °C	30 sec
1 µl dNTPs (10 mM; dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Elongation	72 °C	2 min
0,25 µl vorwärts (<i>forward</i>)- Oligonukleotide (10 µM)	Finale Elongation	72 °C	3 min
0,25 µl rückwärts (<i>reverse</i>)- Oligonukleotide (10 µM)	Kühlung	10 °C	∞
1 µl DMSO			
0,5 µl <i>DreamTaq</i> - DNA- Polymerase (5 U/ µl)			
ad 50 µl ddH ₂ O			

} 30 Zyklen

LAMP-2 Exon-PCR (Amplifikat 480 und 1680 bp)

	PCR-Schritt	Temp.	Dauer
2 µl Template	Initialdenaturierung	95 °C	5 min
5 µl 10x <i>DreamTaq</i> Puffer mit $MgCl_2$	Denaturierung	96 °C	15 sec
1 µl $MgCl_2$	Anlagerung der Oligonukleotide	58 °C	30 sec
1 µl dNTPs (10 mM; dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Elongation	72 °C	30 sec
1 µl vorwärts (<i>forward</i>)- Oligonukleotide (10 µM)	Denaturierung	96 °C	15 sec
1 µl rückwärts (<i>reverse</i>)- Oligonukleotide (10 µM)	Anlagerung der Oligonukleotide	55 °C	30 sec
2 µl DMSO	Elongation	72 °C	30 sec
0,5 µl <i>DreamTaq</i> - DNA- Polymerase (5 U/ µl)	Finale Elongation	72 °C	3 min
ad 50 µl ddH ₂ O	Kühlung	10 °C	∞

} 3 Zyklen

} 37 Zyklen

2.2.1.4.2 Klonierungs-PCR

	PCR-Schritt	Temp.	Dauer
5 µl Template (0,01 µg/µl)	Initialdenaturierung	95 °C	5 min
5 µl 10x <i>Pfu</i> -Polymerase Puffer mit MgCl ₂	Denaturierung	95 °C	30 sec
5 µl dNTPs (2 mM; dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Anlagerung der Oligonukleotide	55-62 °C	30 sec
2 µl vorwärts (<i>forward</i>)- Oligonukleotide (10 µM)	Elongation	72 °C	1 min
2 µl rückwärts (<i>reverse</i>)- Oligonukleotide (10 µM)	Finale Elongation	72 °C	10 min
2,5 µl DMSO	Kühlung	10 °C	∞
1 µl <i>Pfu</i> - DNA- Polymerase (5 U/ µl)			
ad 50 µl ddH ₂ O			

} 35 Zyklen

2.2.1.4.3 RT-PCR

	PCR-Schritt	Temp.	Dauer
2 µl cDNA Template	Initialdenaturierung	95 °C	5 min
5 µl 10x <i>Dream-Taq</i> Puffer mit MgCl ₂	Denaturierung	95 °C	45 sec
5 µl dNTPs (2 mM; dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Anlagerung der Oligonukleotide	60 °C	30 sec
1 µl vorwärts (<i>forward</i>)- Oligonukleotide (10 µM)	Elongation	72 °C	1 min
1 µl rückwärts (<i>reverse</i>)- Oligonukleotide (10 µM)	Finale Elongation	72 °C	10 min
2,5 µl DMSO	Kühlung	10 °C	∞
0,5 µl <i>Dream-Taq</i> - DNA- Polymerase (5 U/ µl)			
ad 50 µl ddH ₂ O			

} 35 Zyklen

2.2.1.5 Agarosegelelektrophorese

50x TAE-Puffer	2 M	Tris-HCl
	0,05 M	EDTA
	5,5%	Essigsäure

Zum Auftrennen von RNA- und DNA-Fragmenten entsprechend ihrer molekularen Größe wurden 1-2%ige [w/v] Agarosegele verwendet. Hierfür wurde 1x TAE-Puffer mit der entsprechenden Grammmzahl an Agarose (Lonza) versetzt und in der Mikrowelle bis zum vollständigen Auflösen der Agarose erhitzt. Nach Abkühlung auf <60 °C wurde dem noch flüssigen Gel Ethidiumbromid (0,05 µl/ml, Carl Roth) hinzugesetzt, dieses gegossen und ausgehärtet.

Die aufzutrennende Probe wurde mit 6x Probenauftragspuffer (Thermo Fisher Scientific) versetzt, auf das Gel aufgetragen und bei 120 V für 30 min in 1x TAE-Puffer aufgetrennt.

2.2.1.6 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegel

Über die Interkalation von Ethidiumbromid (2.2.1.5) mit dem Nukleotidstrang und einem zusätzlich aufgetragenen Molekularmassenmarker (*Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder* bzw. *100 bp Plus DNA Ladder*, Thermo Fisher Scientific) konnten die gewünschten Fragmente auf einem Reprostar UV-Tisch (CAMAG) bei 366 nm detektiert, in einem Gelstück ausgeschnitten und dieses mit dem *Gel Jet Imager*

(Intas) dokumentiert werden. Um die Nukleotidfragmente aus dem Agarosegelstück zu eluieren wurde das *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche) nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.1.7 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung

Um spezifische DNA-Abschnitte selektiv aus bzw. in einen Vektor zu transferieren wurde sich Restriktionsendonukleasen (Thermo Fisher Scientific) und ihrer spezifischen Erkennungssequenzen bedient. Durch die Alkalische Phosphatase, welche das 5'-Ende der Restriktionsschnittstellen dephosphoryliert, wurde eine spontane Religation der gewünschten Nukleotidstrangenden verhindert.

Es wurden 1-2 µg Plasmid bzw. der gesamte PCR-Ansatz (2.2.1.3) mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben und den für ihre enzymatische Aktivität optimalen 10x Puffer (Thermo Fisher Scientific) zusammenpipettiert und für 1 h bzw. über Nacht bei 37 °C, im Falle des Restriktionsenzym *Sfil* bei 45 °C, inkubiert. Nach dem Restriktionsverdau von Plasmidenvektoren wurde dem Ansatz 1 µl FastAP™ (Thermo Fisher Scientific) pro 1 µg Vektor-DNA hinzugesetzt und dieser für 10 min bei 37 °C inkubiert. Der erfolgreiche Verdau wurde anschließend über Agarosegelelektrophorese (2.2.1.5) beurteilt und nach Aufreinigung aus dem Gel (2.2.1.6) für Ligationen (2.2.1.8) verwendet.

2.2.1.8 Ligation

DNA-Ligasen sind in der Lage zwei DNA-Fragmente über die Veresterung eines Phosphatrestes und einer Desoxyribose unter Verbrauch eines Kofaktors zu verknüpfen.

Es wurden 1 µl linearisierter Vektor (2.2.1.7), 7 µl mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittene Insert-DNA (2.2.1.7), sowie 1 µl 10x Ligasepuffer (Thermo Fisher Scientific) und 1 µl T4-DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific) über Nacht bei 17 °C im Wasserbad inkubiert. Zur Inaktivierung der Ligase folgte eine Inkubation für 15 min bei 65 °C. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit 7 µl ddH₂O an Stelle der Insert-DNA.

2.2.1.9 Erzeugung elektrokompetenter *E. coli* XL1-Blue

LB-Medium	1% [w/v]	NaCl
	1% [w/v]	Trypton/Pepton aus Casein
	0,5% [w/v]	Hefeextrakt
		pH 7,0
LB-Agar-Platten (LB-Medium)	1% [w/v]	Agar-Agar

Es wurden *E. coli* XL1-Blue-Zellen auf Eis aufgetaut und mit Hilfe einer sterilen Impföse fraktioniert auf einer LB-Platte mit Tetrazyklinresistenz (20 µg/µl) ausgestrichen und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit einem einzeln gewachsenen Zellklon wurden 50 ml LB-Medium der gleichen Antibiotikaresistenz inokuliert und bei 200 rpm über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden zweimal 1 L vorgewärmtes LB-Medium mit 20 ml Vorkultur in einem zwei Liter Erlenmeyerkolben inokuliert und für ca. 2 h bis zu einer optischen Dichte von 0,6-0,8 (linearer Wachstum) bei 200 rpm und 37 °C herangezogen. Auf Eis wurde die Bakterienkultur in 250 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt, für 15 min bei 2400 g und 4 °C pelletiert und der Überstand verworfen. Zum Waschen wurden Pellets zweimal in 20 ml eiskaltem ddH₂O resuspendiert und auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt, welche mit eiskaltem ddH₂O aufgefüllt und erneut für 15 min bei 2400 g und 4 °C zentrifugiert wurden. Nach Verwerfen des Überstandes wurden beide Pellets in 20 ml eiskalter 10%iger Glycerin-Lösung resuspendiert und auf zwei 50 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die 250 ml Reaktionsgefäße wurden mit 40 ml eiskalter 10%iger Glycerin-Lösung ausgespült, diese den 50 ml Reaktionsgefäßen zugefügt und 20 min bei 2200 g und 0 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets in je 4 ml eiskalter 10%iger Glycerin-Lösung resuspendiert, zu 50 µl auf Trockeneis aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.10 Transformation durch Elektroporation

Es wurden 50 µl elektrokompetente *E. coli* XL1-Blue (2.2.1.9) auf Eis aufgetaut, mit 1 µl Vektor-DNA versetzt und in eine gekühlte Elektroporationsküvette (PeqLab) überführt. Die Küvette wurde einem elektrischen Puls bei 400 Ω, 2,5 kV und 25 µF ausgesetzt. Anschließend wurde der Ansatz in 1 ml vorgewärmtes LB-Medium aufgenommen und für 30 min bei 37 °C und leichtem Schütteln inkubiert. Nach 3 min Zentrifugieren bei 2100 g wurden 800 µl des Überstands verworfen, das Pellet im Restüberstand resuspendiert und gleichmäßig auf einer LB-Platte mit entsprechendem Selektionsantibiotikum (2.1.4) ausplattiert. Danach wurde die Platte bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.2.1.11 Plasmidisolierung aus transformierten *E. coli* XL1-Blue

Es wurden mit einer auf einer LB-Platten gewachsenen *E. coli* XL1-Blue-Kolonie (2.2.1.10) 3 ml (*Miniprep*) bzw. 150 ml (*Midiprep*) LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum (2.1.4) inokuliert und dieses über Nacht bei 37 °C in einem Drehrad bei 220 rpm inkubiert. Dem Vorkulturvolumen entsprechend folgte die Isolierung der Plasmid-DNA über das *GeneJet Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fisher Scientific) oder das *Pure Yield Plasmid Midiprep System* (Promega) nach Angaben des Herstellers.

2.2.1.12 Sequenzierung

Die Sequenzierung nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger wurde von der Firma GATC mittels eines *3730xl DNA Analyzer* (Life Technologies) durchgeführt. Hierfür wurden 20 µl Plasmid-DNA [30-100 µg/µl] sowie 20 µl Sequenzierungsprimer [10 µM] separat in 1,5 ml Reaktionsgefäßen eingeschickt. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte über das Freeware Programm BioEdit (Ibis Biosciences).

2.2.1.13 Quantitative *Real Time* PCR (qRT-PCR)

Für die quantitative Bestimmung von mRNA-Konstrukten wurde zuerst aus Organen die RNA gewonnen (2.2.1.1) und diese in cDNA umgeschrieben (2.2.1.2). Anschließend wurde die cDNA auf ihren mRNA Gehalt eines bestimmten Gens am *Light Cycler 480 II* (Roche) nach Herstellerangaben untersucht. Hierfür wurde der *Universal Probe Library (UPL)-Assay* von Roche genutzt.

Tab. 7: Übersicht der für qRT-PCR Ansätze verwendeten Oligonukleotide und UPL Proben.

Gen	Vorwärts Oligo.	Rückwärts Oligo.	Probe #	Amplikon (bp)
mHRG-1	catcaccagcatcagagtc	aagtaggaaggcccacttgaa	50	91
β-Aktin	ctaaggccaaccgtgaaaag	accagaggcatacagggaca	64	104

Mit Hilfe des *Assay Design Centers* (Roche, <http://www.roche-applied-science.com>) wurden Gen-spezifische Oligonukleotide (Sigma-Aldrich) und die dazu passende UPL Probe (Roche) ermittelt (Tab. 7). Die Bindestellen der Oligonukleotide müssen hierbei in dem entsprechenden Gen möglichst durch ein Intron getrennt werden und in der mRNA ein Amplikon von circa 100 bp erzeugen. Hierdurch wird die Unterscheidung der Ursprungsmatrizen (DNA, mRNA) gewährleistet. Die UPL Probe bindet an den zwischen den Oligonukleotiden liegenden Nukleotidstrang und ist an ein Fluorophor sowie dessen Quencher gekoppelt. Während der qRT-PCR wird die Probe aufgrund der Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase zerschnitten, wodurch Quencher und Fluorophor getrennt werden und ein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann. Tabelle 8 zeigt das verwendete Pipettierschema.

Tab. 8: Pipettierschema der qRT-PCR-Ansätze.

		Menge (µl)
UPL-Assay (für 32 Reaktionen)		
Vorwärts Oligo. [100 µM]	1	
Rückwärts Oligo. [100 µM]	1	
Probe (Roche)	3	
ddH ₂ O	11	
		Menge (µl)
cDNA Mix		
cDNA	0,5	
qRT-PCR Mix (Roche)	4,5	
UPL Mix		
UPL-Assay	0,5	
ddH ₂ O	4,5	

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der LightCycler Software (Roche). Es wurden die Cp-Werte der Doppelwertmessungen ermittelt und anhand einer cDNA-Verdünnungsreihe die Effizienz der einzelnen Primer berechnet. Die mRNA-Quantität wurden auf einen Kontrollgenwert (β -Aktin) normiert.

2.2.2 Maus- / Gewebepräparation

0,1 M Phosphatpuffer (PB)	77,4 mM	Na ₂ HPO ₄
	22,6 mM	NaH ₂ PO ₄
		pH 7,4

Mäuse wurden durch Inhalation von CO₂-Gas und einem anschließenden Genickbruch getötet. Das Blut wurde intrakardial mit einer 27G Kanüle (BD Biosciences) entnommen, in ein EDTA K Röhrchen (Sarstedt) überführt, um an einem XS-800i Hämatologiesystem (Sysmex) analysiert zu werden. Die Mäuse wurden eröffnet, die Organe entnommen und für Gewebelysate (2.2.5.1) und mRNA-Isolierung (2.2.1.1) in 2 ml Schraubdeckelgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Für histologische Präparate (2.2.6) wurden die entsprechenden Organe in 4% PFA/PB für 4 h bei RT inkubiert und nach zweimaligem Waschen in PB für bis zu drei Monate bei 4 °C in PB/0,02% NaN₃ gelagert. Für die Isolierung von Knochenmarkmakrophagen (2.2.3.6) wurden die Knochen frei präpariert und nur kurz in kaltem PBS zwischengelagert.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Zellkultur

PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	4,3 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,4 mM	KH ₂ PO ₄
		pH 7,4
Zellkulturmedium (DMEM)	10% [v/v]	FCS
	1% [v/v]	Penicillin
	1% [v/v]	Streptomycin

Alle eukaryotischen Zellen wurden in einem HERACELL 150i Inkubator (Thermo Fisher Scientific) bei 37 °C, 5% CO₂ in gesättigter Wasserdampfatmosfera gehalten.

2.2.3.1.1 Zellen auftauen

In flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen wurden auf Eis leicht angetaut, in 10 ml gekühltes Zellkulturmedium in einem 15 ml Schraubdeckelgefäß überführt und 5 min bei 100 g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert und auf eine 6-10 cm Schale ausgesät, leicht geschwenkt und unter Zellkulturbedingungen (2.2.3.1) in einen Inkubator gestellt.

2.2.3.1.2 Zellen passagieren

Die zu passagierenden Zellen wurden zweimal gründlich mit PBS gewaschen und anschließend für 10 min in 1 ml Trypsin/EDTA im Brutschrank inkubiert. Die nun von der Zellkulturschale gelösten Zellen wurden in Zellkulturmedium aufgenommen und entsprechen der gewünschten Dichte auf neue Zellkulturschalen gleichmäßig ausgesät.

2.2.3.1.3 Langzeitlagerung von Zellen

Einfriermedium (DMEM)	20% [v/v]	FCS
	10% [v/v]	DMSO
	1% [v/v]	Penicillin
	1% [v/v]	Streptomycin

Zur Langzeitlagerung von Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff überführt. Hierfür wurden die Zellen einer konfluent bewachsenen 10 cm Zellkulturschale trypsinisiert (2.2.3.1.2) in 4 ml Zellkulturmedium aufgenommen und in einem 15 ml Schraubdeckelgefäß für 5 min bei 100 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, in ein 2 ml Schraubdeckelgefäß überführt, langsam auf -80 °C heruntergekühlt und am nächsten Tag in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.3.2 Transfektion von Zellen

Zellen wurden nach Mediumwechsel bei einer Konfluenz von 70% (Lysatproben, 2.2.5.1) bzw. 30% (Immunfluoreszenz, 2.2.3.7) transient mit einem Plasmid transfiziert. Hierfür wurden 100 µl DMEM mit 3 µg (10 cm Schale), 1,5 µg (6 cm Schale) oder 1 µg (6-well Platte) Vektor-DNA und der dreifachen (FugeneHD, Promega) bzw. 1,5-fachen (Pei) µl-Menge an Transfektionsreagenz versetzt. Der Ansatz wurde gevortext und herunterzentrifugiert bevor er für 20 min bei RT inkubiert und anschließend tropfenweise auf die Zellen pipettiert und durch Schwenken gleichmäßig verteilt wurde. Die Zellen wurden nach Transfektion für 24-48 h bei 37 °C, 5% CO₂ bei gesättigter Wasserdampf-atmosphäre Brutschrank belassen. Die Transfektionsrate konnte mit Hilfe eines GFP-Konstrukts am Fluoreszenzmikroskop (*Axiocvert 200M*, Carl Zeiss) kontrolliert werden.

2.2.3.3 Knockdown Versuche mittels siRNA

Um die Translation von HRG-1 in murinen Zellen zu unterbinden wurden vier siRNAs (*small interfering RNA*, *FlexiTube GeneSolution siRNA*) gegen die prä-mRNA des Proteins bei der Firma Qiagen bestellt und für entsprechende Versuche in Zellen transfiziert.

mHRG-1 siRNA #1:	5'-AAGGACTTTTAAAGCAAATAAAA-3'
mHRG-1 siRNA #2:	5'-CAGCTTAGACCTTTCCAAATA-3'
mHRG-1 siRNA #3:	5'-ACCCAGCATCAGAGTCTCAAA-3'
mHRG-1 siRNA #4:	5'-ACCTGTGTTATGGGCACTTAA-3'

Es wurden 2×10^5 MEF-Zellen in 2,3 ml Zellkulturmedium (2.2.3.1) ausgesät. Zur Transfektion (2.2.3.2) wurden 100 µl DMEM mit 300 ng siRNA und 12 µl Lipofectamin® 2000 (Life Technologies) versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde nun tropfenweise auf die Zellen gegeben und vorsichtig durch Schwenken verteilt, wodurch eine siRNA Konzentration von 10 nM gegeben war. Die Transfektion der Zellen erfolgte nach 48 h und einem Mediumwechsel ein zweites Mal bevor die Zellen am vierten Tag für Zelllysate (2.2.5.1) oder Immunfluoreszenz (2.2.3.7) genutzt wurden. Als Negativkontrolle wurde die gleiche Menge an Kontroll-siRNA (Qiagen) verwendet.

2.2.3.4 Inhibitorversuche

Tab. 9: Liste der verwendeten Inhibitoren und die eingesetzten Konzentrationen.

Inhibitor	Eingesetzte Konzentration	Gelöst in	Hersteller
ALLN	3,4 nM	DMSO	Merck
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	50 mM	H ₂ O	Carl Roth
DAPT (Inhibitor IX)	200 nM	DMSO	Merck
E-64	10 µM	H ₂ O	Merck
E-64-d (EST)	50 µM	EtOH	Merck
GM 6001	500 nM	DMSO	Merck
Inhibitor X	320 nM	DMSO	Merck
Leupeptin	100 µM	H ₂ O	Sigma-Aldrich
Marimastat	3 µM	DMSO	Sigma-Aldrich
MG132	4 µM	DMSO	Sigma-Aldrich

Es wurden zu 70% konfluente Hek293T-Zellen mit einem murinen HRG-1-Konstrukt transient transfiziert (2.2.3.2). Nach 24 h Wachstum wurden die gepoolten Zellen auf 6 cm Zellkulturschalen mit 70% Konfluenz aufgeteilt (2.2.3.1.2) und nach Adhäsion an diese für 16 h (üN) mit der entsprechenden Konzentration an Inhibitor (Tab. 9) bzw. Lösungsmittelkontrolle inkubiert. Behandelte Zellen und unbehandelte Kontrollen wurden anschließend als Zelllysate (2.2.5.1) in Western Blot Analysen (2.2.5.4) genutzt.

2.2.3.5 Generierung von Murinen Embrionalen Fibroblasten (MEFs)

Unter sterilen Bedingungen wurden 13,5 Tage alte Embryonen aus LAMP-2 heterozygoten Muttertieren im Embryonenstrang entnommen und in PBS überführt. Die Embryonen wurden einzeln aus ihren Embryonensäcken präpariert und in je eine 6 cm Schale mit frischem PBS platziert. Für die Genotypisierung (2.2.1.4.1) der Embryonen wurden die Köpfe auf Eis zurückgestellt. Der restliche Embryo wurde nach Entnahme der fetalen, roten Organe mit einem Skalpell zerkleinert und in 2 ml Trypsin für 15 min im Zellinkubator bei mehrmaligem Schwenken inkubiert. Die vereinzelt embryonalen Zellen wurden anschließend in einem 15 ml Schraubdeckelgefäß in 10 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium aufgenommen. Nach Zentrifugation für 3 min bei 200 g wurde das Zellpellet erneut in 10 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert und auf eine 10 cm Zellkulturplatte überführt. Nach Zugabe von weiteren 2 ml FCS wurden die Zellen im Zellinkubator bei 37 °C kultiviert.

Die Immortalisierung der Zellen erfolgte anhand des *SV40 large T* Antigens und wurde durch die Transfektion (2.2.3.2) mit dem pMSSVLT-Vektor (Schuermann, 1990) erzielt.

2.2.3.6 Gewinnung von Knochenmarkmakrophagen (*Bone Marrow-Derived Macrophages*, BMDMs)

Makrophagenmedium (DMEM)	20% [v/v]	FCS
	1% [v/v]	Penicillin
	1% [v/v]	Streptomycin

Für die Gewinnung von Knochenmarkmakrophagen wurden die Humeri und Femora von Mäusen vom umliegenden Gewebe vorsichtig frei präpariert und zunächst in kaltem, sterilem PBS gelagert. Die Knochen wurden mit einer sterilen Schere unter der Sterilbank beidseitig dicht am Gelenk eröffnet. Mit einer Einwegspritze wurde das Knochenmark über eine 27G-Kanüle (BD Biosciences) mit kaltem Makrophagenmedium ausgespült und durch ein 100 µm Zellsieb (BD Biosciences) weiter in ein 50 ml Schraubdeckelgefäß vereinzelt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 110 g und 4 °C wurde das Pellet in Makrophagenmedium und 50 ng/ml rmM-CSF (ImmunoTools) resuspendiert, auf eine 10 cm Zellkulturschale ausgesät und in den Brutschrank gestellt. Am nächsten Tag wurden die bereits adhärenierten Zellen verworfen, die Zellen in Suspension für 10 min bei 110 g und 4 °C zentrifugiert und zu $1-2 \times 10^7$ Zellen in 7 ml Makrophagenmedium und 50 ng/ml rmM-CSF ausgesät. Nach vier Tagen wurden weitere 7 ml Makrophagenmedium und 50 ng/ml rmM-CSF auf die Zellen gegeben. Zwischen Tag sieben und neun wurden die nun ausdifferenzierten Makrophagen mit PBS gewaschen, in 1 ml Accutase (PAA) für 10 min inkubiert, und in der gewünschten Zellzahl in Zellkulturmedium neu ausgesät.

2.2.3.7 Immunfluoreszenz

Fixierungslösung (PBS)	4% [w/v]	PFA
Saponinlösung (PBS)	0,2% [v/v]	Saponin
DABCO-Stammlösung (PBS)	20% [w/v]	Diazobicyclooctan
Mowiol-Stammlösung	25% [w/v] + 3% [v/v]	Mowiol in PBS Glycerin pH 6-7
Einbettmedium	1/10 Vol. 1 Vol. 1/1000 Vol.	DABCO Mowiol DAPI (1 mg/ml)

Es wurden adhärenente Zellen auf Deckgläser (13 mm, Assistent) mit einer Konfluenz von ca. 30% ausgesät. Die Zellen wurden transfiziert (2.2.3.2) bzw. im endogenen Zustand auf den Deckgläsern zweimal kurz in PBS gewaschen und anschließend für 20 min in 1 ml 4%igem PFA/PBS fixiert. Die Zellen wurden erneut zweimal in PBS gewaschen und entweder für bis zu zwei Wochen bei 4 °C gelagert oder direkt für 5 min in 2 ml Saponinlösung zum Permeabilisieren inkubiert. Zum Maskieren von freien Aldehydgruppen folgte ein Inkubationsschritt für 10 min in 0,12% Glycin/Saponinlösung. Nach kurzem Waschen in Saponinlösung wurden die Zellen mit 10% FCS/Saponinlösung für 30 min blockiert bevor die Deckgläser über Nacht in einer dunklen Feuchtkammer bei 4 °C auf Parafilm® (Pechiney) mit 50 µl der in 10% FCS/Saponinlösung gelösten Primärantikörper (2.1.5) inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurden die Deckgläser durch fünfmaliges Tunken in Saponinlösung gewaschen und anschließend in einer dunklen Feuchtkammer bei RT für 1 h auf 50 µl der entsprechenden fluorophorgekoppelten Sekundärantikörper (2.1.5) in 10% FCS/Saponinlösung inkubiert. Zuletzt wurden die Deckgläser erneut fünfmal zum Waschen in Saponinlösung und einmal in ddH₂O getunkt, bevor sie auf einem Objektträger (VWR) in einem Tropfen Einbettmedium versiegelt wurden. Das Medium wurde, aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Fluoreszenzfarbstoffe, im Dunkeln über Nacht bei 4 °C ausgehärtet und anschließend gelagert.

Die Auswertung erfolgte an dem Konfokalmikroskop *FV 1000* (Olympus) mit Hilfe der *Axio Vision Software* (4.1 beta Version 08.2003, Olympus).

2.2.3.8 Durchflußzytometrie (*Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS*)

FACS-Puffer (PBS)	2% [v/v]	FCS
	0,1% [w/v]	NaN ₃
	2 mM	EDTA pH 7,4
Erylysepuffer	150 mM	NH ₄ Cl
	15 mM	Na ₂ CO ₃
	0,1 mM	EDTA pH 7,3

Es wurden Organe aus den zu untersuchenden Mäusen entnommen und in eiskalten FACS-Puffer überführt. Für die Vereinzelnung der Zellen wurden die Organe im FACS-Puffer zuerst mit einem Skalpell zerkleinert und anschließend vorsichtig durch ein 100 µm Zellsieb (BD Biosciences) zerstoßen. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 210 g und 4 °C pelletiert und in 500 µl Erylysepuffer aufgenommen. Nach 12 min Inkubation bei RT wurde die Lyse durch 5-10 ml FACS-Puffer gestoppt. Die Zellen wurden erneut für 10 min bei 210 g und 4 °C pelletiert. Nach

erfolgreicher Lyse der Erythrozyten (weißes Pellet) wurde das Pellet erneut in FACS-Puffer aufgenommen und mit diesem auf 5×10^3 Zellen pro μl Puffer eingestellt.

Pro Färbung wurden 100 μl Zellsuspension in eine 96-well Platte mit rundem Boden (Sarstedt) vorgelegt und mit den jeweiligen Antikörpern (α -CD11b (M1/70), BD Biosciences) in einer Verdünnung von 1:100 für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Eine anschließende Inkubation für 10 min mit je 0,5 μl Propidiumiodid (eBioscience) diente der Erkennung toter Zellen. Nach 2 maligem Waschen in kaltem FACS-Puffer konnten die Zellen am *LSRII Durchflusszytometer* (BD Biosciences) analysiert werden. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der *FlowJo Software* (Tree Star Inc.).

2.2.3.9 Erythrophagozytose (EP)-Assay

Das Recycling von Häm aus seneszenten Erythrozyten erfolgt über Phagozytose durch Makrophagen (Knutson und Wessling-Resnick, 2003). Die veränderten Proteinmuster auf der Zelloberfläche gealterter Erythrozyten werden rezeptorvermittelt erkannt und führen zur Phagozytose des Erythrozyten in die Zelle (Lang *et al.*, 1999). Durch Fusion der Erythrophagosomen mit Lysosomen gelangen die für die Degradation verantwortlichen Enzyme und der Erythrozyt in ein Kompartiment. Freigesetztes Häm wird aus dem Phagolysosom in das Zytoplasma transportiert und dort von der Hämoxygenase-1 zu Eisen (Fe^{2+}), Kohlenstoffmonoxid und Biliverdin abgebaut (Lin *et al.*, 2007).

2.2.3.9.1 Hämdefizientes (HD) -FCS

Es wurde FCS mit 10 mM Ascorbinsäure über Nacht bei 37 °C und 50 rpm inkubiert und das durch die Reduktion der Hämgruppe veränderte Absorptionsverhalten bei 405 nm am nächsten Tag am *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer* (PeqLab) verifiziert. In einer Slide-A-Lyzer™ Dialysekassette (MWCO = 2000 Da, Thermo Fisher Scientific) wurde das hierdurch freigesetzte Fe^{2+} aus dem behandelten FCS durch dreimaliges Waschen für 8 h in kaltem, sterilem PBS unter Rühren ausgetauscht. Das Häm- und Eisenfreie FCS wurde anschließend durch einen 0,2 μm *Filtropur S plus* (Sarstedt) sterilfiltriert.

2.2.3.9.2 Erythrozytenalterung

Alterungslösung (PBS)	0,4 mM 5 mM	CuSO_4 Ascorbinsäure
Waschlösung (PBS)	0,2% [v/v]	EDTA

Frisches in ein EDTA K Röhrchen (Sarstedt) gewonnenes humanes Blut wurde 5 min bei 1000 g in Plasma und die zum größten Teil aus Erythrozyten bestehenden zellulären Bestandteile aufgetrennt. Die Zellen wurden dreimal in PBS gewaschen, anschließend 1:25 in frische Alterungslösung aufgenommen und für 90 min bei 37 °C inkubiert. Die sich in der Alterungslösung befindenden Kupferionen sorgten zusammen mit der Ascorbinsäure für eine stete Bildung freier Radikale und damit oxidativem Stress. Es wird auf der Erythrozytenmembran die Öffnung von Kationenkanälen und der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen ausgelöst. Steigende Ca^{2+} -Ionenspiegel in der Zellen aktivieren die Scramblase und führen zu einer Exponierung von Phosphatidylserinresten an der äußeren Zellmembran (Lang *et al.*, 2004). Dies wiederum dient Makrophagen zur Erkennung der Zellen mittels ihrer Phosphatidylserinrezeptoren für deren spätere Phagozytose. Um die oxidative Wirkung der Kupferionen zu stoppen, wurden sie durch je dreimaliges Waschen mit Waschlösung und anschließend PBS aus der Zellsuspension entfernt. Die gealterten Erythrozyten wurden anschließend höchstens ein Tag bei 4 °C vor Verwendung gelagert.

2.2.3.9.3 IgG- Opsonierung von Latexkügelchen

Die Opsonierung von Latexkügelchen mit murinem IgG-Antikörper wird genutzt, um über die rezeptorvermittelte Erkennung des Fc-Teil des Immunglobulins die gerichtete Phagozytose der Latexkügelchen durch Makrophagen zu ermöglichen.

Es wurden 30 µl Latexkügelchen (3 µm, Sigma-Aldrich) mit 15 µl Maus-IgG und 420 µl PBS für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Kügelchen für 1 min bei 14500 g zentrifugiert, dreimal in PBS gewaschen und bei 4 °C gelagert.

2.2.3.9.4 Phagozytose

HD-Medium (DMEM)	10% [v/v] 1% [v/v] 1% [v/v]	HD-FCS (2.2.3.9.1) Penicillin Streptomycin
Erylyselösung	140 mM 17 mM	NH_4Cl Tris-HCl pH 7,6

Es wurden Knochenmarkmakrophagen (2.2.3.6) in 6-well Platten auf Deckgläser ($3 \cdot 10^5$ Zellen) bzw. auf 10 cm Schalen ($5 \cdot 10^6$ Zellen) ausgesät und über Nacht in HD-Medium mit LPS inkubiert. Die LPS stimulierten Makrophagen wurden in neuem Zellkulturmedium mit 20 µl IgG-opsonierten Latexkügelchen (2.2.3.9.3) bzw. gealterten Erythrozyten (2.2.3.9.2) in einem Verhältnis von 1:200

versetzt und nach Zentrifugation für 1 min bei 1500 rpm zum Phagozytieren für 90 min im Brutschrank inkubiert. Zum Beenden der Phagozytose wurden die Makrophagen mit PBS gewaschen und 5 min in hypotoner Erylselösung inkubiert, um die nicht phagozytierten Erythrozyten zu zerstören und von den Zellen zu lösen. Nach erneutem zweimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen 45 min lang zur Erholung in HD-Medium inkubiert und anschließend für Immunfluoreszenz fixiert (2.2.3.7) bzw. für Zelllysate (2.2.5.1) oder mRNA-Isolierung (2.2.1.1) auf Eis in PBS/Complete® geerntet.

2.2.4 Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screen

Eine Beschreibung des Prinzips der Methode ist unter 1.4 zu finden.

YPD-Medium	1% [w/v] 2% [w/v] 2% [w/v]	Bacto™ Yeast extract Bacto™ Pepton Glucose
LiSorb	100 mM 10 mM 1 mM 1 M	Li-Acetat Tris-HCl EDTA Sorbitol
LiPEG	100 mM 10 mM 1 mM 40% [v/v]	Li-Acetat Tris-HCl EDTA PEG 3350 pH 8,0
SC-Leu, -Leu/-Trp, -Leu/-Trp/-His -Medium	0,67% [w/v] 0,2% [w/v] 2% [w/v]	<i>Yeast nitrogen base w/o amino acids</i> <i>Drop-out Mix</i> Glucose
SC-Leu, -Leu/-Trp, -Leu/-Trp/-His- Platten (SC-X Medium)	1,5% [w/v]	Agar-Agar
Transformations-Mix	33% [v/v] 100 mM 2,8% [v/v]	PEG 3350 Li-Acetat Lachsspermien DNA (10 mg/ml)
Puffer 1	0,9 M 0,1 M 25% [w/v]	Sorbitol EDTA Zymolyase 20T pH 8,0
Puffer 2	50 mM 20 mM	Tris-HCl EDTA pH 7,4

10x SC-His/-Trp/-Leu/-Ura Drop-out Mix	je 20 g	Alanin, Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Cystein, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Isoleucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tyrosin, Valin
	20 g	Inositol
	5 g	Adenin
	2 g	Para-Aminobenzoesäure
Drop-out Mix	18,3 g	10x SC-His/Trp/Leu/Ura Drop-out Mix
	1 g	Histidin
	2 g	Leucin
	1 g	Uracil
	1 g	Tryptophan

2.2.4.1 Erzeugung kompetenter *S. cerevisiae* (NMY51)- Zellen

Es wurden 25 µl einer NMY51-Zellsuspension auf YPD-Platten mit sterilen Glasperlen ausgestrichen und für drei Tage bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 10 ml YPD-Medium mit den gewachsenen Hefeklonen inokuliert und bei 200 rpm und 30 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50 ml einer Zellsuspension mit der optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,4 in YPD-Medium erzeugt und für 5-6 h bis zu einer OD von 0,6-0,8 bei 200 rpm und 30 °C herangezogen. Die NMY51-Zellen wurden durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 4 °C und 900 g isoliert. Anschließend wurde das Zellpellet durch aufeinanderfolgendes Resuspendieren und Zentrifugieren (2 min bei 4 °C und 900 g) in zunächst kaltem ddH₂O und darauf folgend LiSorb gewaschen. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen 300 µl LiSorb resuspendiert und mit 30 µl zuvor für 5-10 min auf 95 °C erhitzte Lachsspermien DNA versetzt. Nach kurzem Vortexen wurden die nun chemisch kompetenten NMY51-Zellen sofort auf Eis gestellt und als 50 µl Aliquots auf Trockeneis und dann in -80 °C weggefroren.

Um die Kompetenz erneut herzustellen wurde bei bereits transformierten Hefezellen das gleiche Protokoll verwandt, mit der Abwandlung, dass an Stelle des YPD-Mediums ein dem transformierten Konstrukt angepasstes Selektionsmedium verwandt wurde.

2.2.4.2 Transformation von kompetenten NMY51-Zellen

Es wurden 25 µl kompetente NMY51-Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1 µl Vektor (*Bait*-Vektor: pTMBV4; *Prey*-Vektor: pPR3-N, pPR3-C; Positivkontrolle: pAI-Alg5; Negativkontrolle: pDL2-Alg5) und 300 µl LiPEG versetzt, gevortext und zuerst für 20 min bei RT und anschließend 15 min im Wasserbad bei 42 °C inkubiert. Nach einem einminütigem Zentrifugationsschritt bei 900 g wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 75 µl ddH₂O resuspendiert. Die Zellsuspension wurde im Anschluss

auf dem Vektor/en entsprechenden SC-Platten ausgestrichen und für drei Tage bei 30 °C selektioniert.

2.2.4.3 Interaktionstest des mLAMP-2A- und mLAMP-2B-Bait-Konstrukts

Es wurden NMY51-Zellen wie in 2.2.4.2 beschrieben mit mLAMP-2A (bzw. mLAMP-2B) im pTMBV4 *Bait*-Vektor transformiert und auf SC-Leu-Platten selektioniert. Nach erneutem Erzeugen chemischer Kompetenz (2.2.4.1) und Transformieren (2.2.4.2) mit dem *Prey*-Vektor, der Positivkontrolle (pAI-Alg5) oder der Negativkontrolle (pDL2-Alg5) wurden die Zellen auf SC-Leu/-Trp-Platten ausgestrichen und selektioniert. Mit den für beide Konstrukte positiven Zellen wurden 2 ml SC-Leu/-Trp-Medium inokuliert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Zur OD600 Messung wurden 20 µl der Zellsuspension 1:50 mit ddH₂O verdünnt. Anschließend wurde eine Verdünnung mit der optischen Dichte eins (1) sowie drei weitere Verdünnungsstufen (1:10, 1:100, 1:1000) erzeugt, von denen je 4 µl auf eine SC-Leu/-Trp- und eine SC-Leu/-Trp/-His-Platte ausgestrichen und für ein bis drei Tage bei 30 °C inkubiert wurden.

2.2.4.4 Large-Scale Transformation

Es wurden 10 ml SC-Leu-Medium mit den *Bait*-Vektor transformierten (2.2.4.2) NMY51-Zellen inokuliert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 150 ml SC-Leu-Medium mit Hilfe dieser Vorkultur auf eine OD von 0,2 eingestellt und für 4-5 h bis zu einer OD von 0,5 bei 200 rpm und 30 °C herangezogen. Nach Zentrifugieren für 5 min bei 900 g und 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Pellet in zweimal in 50 ml ddH₂O gewaschen. Daraufhin wurde das Pellet in 3 ml Lithiumacetat-Lösung (100 mM) resuspendiert und für 15 min bei 30 °C inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren (5 min, 900 g, 4 °C) und Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen vorsichtig in 5,4 ml Transformations-Mix resuspendiert. Als Negativkontrolle der Transformation wurden 50 µl der Suspension keine DNA zugesetzt. Für einen Test *Large-Scale Screen* zur Ermittlung der Transformationseffizienz wurden 15 µg Kontroll-Vektor (pDSL-Nx), für den *Large-Scale Screen* 15 µg cDNA-Bibliothek-DNA (*Mouse adult brain cDNA library (NubG-x)*, MoBiTec) in pPR3-N, dem Ansatz hinzugegeben. Nach kurzem Vortexen folgte zuerst eine Inkubation für 20 min bei RT und anschließend für 15 min im Wasserbad bei 42 °C. Nach Zentrifugieren (5 min, 900 g) und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 2 ml ddH₂O resuspendiert. Für einen Test *Large-Scale Screen* wurden 50 µl der unverdünnten Suspension, einer 1:10, einer 1:100 Verdünnung sowie die Negativkontrolle (s.o.) auf 10 cm SC-Leu/-Trp-Platten ausgestrichen. Über das Wachstum der Hefekolonien konnten im Folgenden Rückschlüsse auf die Transformationseffizienz geschlossen

werden. Hierfür wurde die theoretische Anzahl der Hefeklone, nach Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors, durch die eingesetzte DNA-Menge (μg) errechnet.

Für den *Large-Scale* Screen wurde der restliche Transformationsansatz zu je 100 μl auf zwanzig 15 cm SC-Leu/-Trp/-His-Platten ausgestrichen und diese für 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Es wurde ein Abstrich der einzelnen Hefeklone gemacht, wobei jeder Klon auf ein Sechstel einer SC-Leu/-Trp/-His-Platte ausgestrichen und erneut für 1-3 Tage bei 30 °C inkubiert wurde.

2.2.4.5 Isolierung von Plasmiden aus Hefeklonen

Mit Hefezellen wurden 500 μl von Puffer 1 inokuliert, für 1 h bei 37 °C inkubiert und dabei alle 20 min leicht geschüttelt. Nach Zentrifugieren (5 min, 900 g) und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 500 μl Puffer 2 vorsichtig resuspendiert. Es wurden 50 μl 10%iges SDS hinzugegeben und für weitere 30 min bei 65 °C inkubiert. Nach Zugabe von 200 μl einer 3 M Kaliumacetat-Lösung wurde der Ansatz gemischt und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde für 5 min bei 16000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Auf die Zugabe von 700 μl Isopropanol und einmaliges Invertieren folgte eine fünfminütige Inkubation bei RT und das Zentrifugieren bei 16000 g für 10 min. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 500 μl 70%igem Ethanol aufgenommen, 10 min bei RT inkubiert und erneut für 5 min bei 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 10 min bei 37 °C bei offenem Reaktionsgefäß getrocknet. Anschließend wurde das DNA-Pellet in 20 μl ddH₂O resuspendiert. Die DNA wurde anschließend in *E. coli* XL1-Blue transformiert (2.2.1.10), nach Vermehrung erneut isoliert (2.2.1.11), über einen Restriktionsverdau validiert (2.2.1.7) und Sequenziert (2.2.1.12).

2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.2.5.1 Erzeugung von Zell- und Gewebelysaten

Zellysispuffer (PBS)	0,5% [v/v]	Triton X-100 pH 7,4 + Complete® (Roche)
-----------------------------	------------	---

Zur Gewinnung von Proteinlysaten für Western Blots (2.2.5.4) wurden Zellen auf Eis zweimal in PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS/Complete® (10 cm Schale) bzw. 0,5 ml PBS/Complete® (6 cm Schale und 6-well Platte) mit Hilfe eines Zellschabers S (TPP) gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 2100 g und 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet je nach Größe in 30 bis 400 μl Zellysispuffer aufgenommen.

Gewebeproben wurden auf Eis ausgewogen, zusammen mit ca. 20 Precellys-Keramik-Kügelchen (1,4 mm, PeqLab) im zehnfachen Volumen Zelllysispuffer aufgenommen und zweimal für 20 sec bei 6500 rpm in einem Precellys Homogenisator (PqLab) mechanisch aufgebrochen.

Zum weiteren Zellaufbruch wurden Zellen- wie auch Gewebeproben bei 4 °C zweimal für 15 sec sonifiziert (*Output control* = 5, *Duty cycle* = 90%, Branson Sonifier 450, Emerson Industrial Automation), 1 h auf Eis inkubiert und erneut sonifiziert. Die lysierten Zellen wurden für 10 min bei 11000 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration gemessen (2.2.5.2).

2.2.5.2 BCA-Assay

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration eines Lysates (2.2.5.1) wurden 1:10 (Zelllysate) bzw. 1:50 (Gewebe lysate) –Verdünnungen hergestellt und diese gegenüber einer Albuminstandardreihe (Pierce) mit Hilfe des *BCA Protein Assay Kits* (Thermo Fisher Scientific) bei 562 nm photometrisch am *Synergy HT Multifunktionsplattenleser* (BioTek) gemessen.

2.2.5.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

10x SDS-PAGE-Laufpuffer	1,92 M 250 mM 35 mM	Glycin Tris-HCl SDS
Trenngelpuffer	1,5 M 0,4% [w/v]	Tris-HCl SDS pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M 0,4% [w/v]	Tris-HCl SDS pH 6,8
5x SDS-PAGE Auftragspuffer	1 M 86% [v/v] 10% [w/v] 500 mM	Tris-HCl Glycerin SDS DTT Bromphenolblau

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Größe erfolgte in SDS-Polyacrylamidgelen nach Laemmli (1970). An die Polypeptidketten denaturierter Proteine bindet hierbei das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) und erlaubt damit eine Auftrennung von Proteinen im Gel entsprechend ihrer Ladung, welche proportional zu ihrer Größe ist.

Es wurden 10 bis 40 µg Proteinlysate (2.2.5.1) mit 5x SDS-PAGE Auftragspuffer versetzt und für 15 min bei 37 °C (HRG-1 Proben) bzw. 55 °C zum Aufbruch von Sekundärstrukturen erhitzt. Anschließend wurden die Proben und ein Molekulargewichtsmarker (Thermo Fisher Scientific) auf 1,5 mm dicke SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen und bei 100-140 V für 2-3 h unter Verwendung des *Mini-Protean Elektrophorese-Systems* (BioRad) in SDS-PAGE Laufpuffer aufgetrennt. Je nach Polyacrylamidanteil im Gel (10%, 12,5%) wurde eine unterschiedliche Separation der Proteine erreicht.

	4,5%iges Sammelgel	10%iges Trenngel	12,5%iges Trenngel
Rotiphorese® Gel 30	1,75 ml	3,3 ml	4,2 ml
Sammelgelpuffer	1,35 ml	/	/
Trenngelpuffer	/	2,6 ml	2,6 ml
ddH ₂ O	6,85 ml	4,0 ml	3,1 ml
10% APS	60 µl	60 µl	60 µl
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl

Für Ko-Immunopräzipitationslysate (2.2.5.7) wurden 4-12%ige NuPAGE Gradientengele (Life Technologies) im *MES SDS Running Buffer* (Life Technologies) verwendet.

2.2.5.4 Western Blot

10x Tankblotpuffer	250 mM Tris-HCl 2 M Glycin pH 8,3
Tankblotpuffer	10% [v/v] 10x Tankblotpuffer 20% [v/v] Methanol

Die Übertragung der aufgetrennten Proteine aus einem SDS-Polyacrylamidgel (2.2.5.3) erfolgte über Western Blot in einer *Criterion™* Tankblotkammer (BioRad) über Nacht.

Nach Abtrennen des Sammelgels wurde das Trenngel in kaltem Tankblotpuffer luftblasenfrei auf eine *Protran Nitrocellulose Transfer Membran* (Porengröße 0,2 µm, Whatman) transferiert und beides zwischen je zwei Stücken *Gel Blotting* Papier (Whatman) in die mit kaltem Tankblotpuffer gefüllte Kammer eingespannt. Hierbei war die Nitrozellulosemembran der Anode, das Gel der Kathode zugewandt. Der Proteintransfer fand bei 4 °C über Nacht bei 20 V und anschließenden 30 min bei 70 V statt.

2.2.5.5 Proteindetektion

TBS-T	20 mM 150 mM 0,1% [v/v]	Tris-HCl NaCl pH 7,5 Tween20
Blockierlösung (TBS-T)	5% [w/v]	Milchpulver
Detektionslösung A	0,1 M 0,025% [w/v]	Tris-HCl pH 8,6 Luminol
Detektionslösung B (DMSO)	0,11% [w/v]	p-Coumarsäure
Detektionslösung	83% [v/v] 8% [v/v] 4,3% [v/v] 4,3% [v/v] 0,4% [v/v]	Detektionslösung A Detektionslösung B Lumigen™ TMA-6 A (GE Healthcare) Lumigen™ TMA-6 B (GE Healthcare) H ₂ O ₂

Zum Detektieren von Proteinen auf einer Nitrozellulosemembran wurde diese nach erfolgreichem Western Blot (2.2.5.4) für 1 h in Blockierlösung bei 80 rpm inkubiert. Auf diese Weise werden alle möglichen Epitope auf der Membran unspezifisch gebunden und die Detektionsstringenz erhöht. Die Membran wurde daraufhin mit einem spezifischen, ein bestimmtes Proteinepitop erkennenden Primärantikörper (2.1.5) inkubiert, welcher an dieser Stelle den unspezifischen Bindungspartner verdrängt. Dies geschah unter Schütteln, verdünnt (2.1.5) in Blockierlösung, für 1 h bei RT bis über Nacht bei 4 °C. Durch dreimal zehninütiges Waschen bei 80 rpm in TBS-T wurde überschüssiger Antikörper entfernt. Der Spezies spezifische Fc-Teil des Primärantikörpers wurde nun durch Inkubation der Membran mit einem entsprechendem in TBS-T gelösten Sekundärantikörper (2.1.5) gebunden. Nach erneutem Waschen in TBS-T konnte über die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase (HRP) das Substrat in einer auf die Membran aufgetragenen Detektionslösung umgesetzt werden und die daraus resultierende Chemilumineszenz am *ImageQuant Las 4000* (GE Healthcare) detektiert werden.

2.2.5.6 Strippen von Membranen

Glycin-Stripping-Puffer	100 mM	Glycin
	20 mM	Mg-Acetat
	50 mM	KCl
		pH 2,2

Für eine zusätzliche Detektion von Proteinen durch einem weiteren Primärantikörper (2.1.5) wurde die Membran zunächst von den daran gebundenen Antikörpern (2.2.5.5) befreit. Hierfür wurde die Membran für 1,5 h in Glycin-Stripping-Puffer bei 80 rpm und anschließend dreimal 10 min in TBS-T gewaschen, bevor die unter 2.2.5.5 beschriebenen Schritte erneut durchgeführt wurden.

2.2.5.7 Ko-Immunpräzipitation (CoIP)

EBC-Lysispuffer	120 mM	NaCl
	50 mM	Tris-HCl
	0,5% [v/v]	NP-40
		pH 7,4
		+ Complete® (Roche)

Die Interaktion von Proteinen in einer Suspension lässt sich mit Hilfe einer Ko-Immunpräzipitation und anschließendem Western Blot Verfahren (2.2.5.4) nachweisen. Unterschiedlich starke Proteinwechselwirkungen führen zu stabilen oder transienten Interaktionen. Unterschiedlichste Faktoren, wie post-translationale Modifizierungen oder der vorherrschende pH-Wert beeinflussen zudem die Nachweisbarkeit dieser Interaktion.

Zellen wurden in EBC-Lysispuffer lysiert (2.2.5.1). Es wurden 40 µg (2.2.5.2) des Gesamtlisates in 5x SDS-PAGE Auftragspuffer (2.2.5.1) bei -20 °C zurückgestellt und 500-1000 µg Protein mit EBC-Lysispuffer auf ein Endvolumen von 499 µl eingestellt. Es wurde 1 µl Primärantikörper (2.1.5) hinzugesetzt und über Nacht bei 4 °C in einem Drehrad inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50 µl Protein G Plus Agarosekügelchen (Thermo Fisher Scientific) 30 sec bei 2100 g zentrifugiert und dreimal in EBC-Lysispuffer gewaschen, bevor der Übernachtansatz für 1 h bei 4 °C im Drehrad auf die Kügelchen gegeben wurde. Die an das dem Protein spezifische Epitop gebundenen Antikörper wurden, durch Bindung der Agarosekügelchen an ihren Fc-Teil, über diese präzipitiert. Die Kügelchen, mit den an sie gebundenen Proteinen, wurden durch Zentrifugieren für 30 sec bei 1200 g von den restlichen Proteinen im Überstand getrennt. Der Überstand wurde bei -20 °C weggefroren. Unspezifisch an die Kügelchen gebundene Proteine wurden durch viermaliges Waschen in EBC-Lysispuffer für 4 min bei 4 °C im Drehrad und anschließendes Zentrifugieren für 30 sec bei 1200 g

entfernt. Nach rückstandlosem Abnehmen des Überstandes wurden die Kügelchen in 40 µl 1x SDS-PAGE Auftragspuffer mit 200 mM DTT (2.2.5.1) aufgenommen und für 20 min bei 37 °C erhitzt, um die Bindungen zwischen Protein, Antikörper und Kügelchen zu lösen. Gleichfalls werden auch Protein-Protein Interaktionen zwischen dem über den Primärantikörper präzipitierten Protein und möglichen weiteren, unbekanntem Proteinen dissoziiert. Die im 1x SDS-PAGE Auftragspuffer gelösten Proteine wurden zusammen mit den Gesamtlysaten (s.o.) auf ein SDS-Polyacrylamidgel (2.2.5.3) geladen, *geblottet* (2.2.5.4) und detektiert (2.2.5.5).

2.2.6 Histologische Methoden

Um neben den Proteinkonzentrationen (Western Blot, 2.2.5.4) in Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Organen eine morphologische Übersicht zu gewinnen, so wie die zelluläre Lokalisation der Proteine aufzuklären wurden histologische *Free-float*-Schnitte angefertigt.

2.2.6.1 *Free-float*-Schnitte

Saccharoselösung (0,1 M PB (2.2.2))	30% [w/v]	Saccharose
--	-----------	------------

Die 4% PFA/PB fixierten Organe (2.2.2) wurden in einer Saccharoselösung so lange bei 4 °C inkubiert, bis das Organ gesättigt und auf den Grund des Gefäßes gesunken war. Das Organ wurde in der gewünschten Orientierung durch ein Saccharosekissen mit Trockeneis auf dem stetig gekühlten Objektisch des SM 2000R Mikrotoms (Leica) fixiert und 10 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden in 0,02% NaN₃/PB zur weiteren Lagerung bei 4 °C überführt.

2.2.6.2 Hämatoxylin & Eosin- Färbung

Wässriges Eosin	0,1% [v/v] 1:200	EosinG Eisessig filtrieren
------------------------	---------------------	----------------------------------

Durch die Verwendung von Hämatoxylin und Eosin ermöglicht dieser Färbung eine Differenzierung von Zytoplasma, Organelle und Speicherstoffen. Während Hämatoxylin mit Nukleinsäuren, Glykosaminoglykanen und Proteinen interagiert, färbt das saure Eosin vor allem Zytoplasma von Zellen an (Jorundsson *et al.*, 1999).

Es wurden 10 µm dicke Milz *free-float*-Schnitte (2.2.6.1) auf Objektträger gezogen, kurz in ddH₂O gewaschen, 7 min in Hämalanlösung sauer nach Mayer (Carl Roth) inkubiert und in ddH₂O gespült. Danach wurden die Schnitte für 10 bis 15 min in fließendes Leitungswasser gestellt, erneut in ddH₂O gespült, für 5 min in 0,1% wässrigem Eosin inkubiert und zweimal in ddH₂O gewaschen. Dann wurden sie in zweiminütigen Inkubationsschritten über eine aufsteigende Alkoholreihe (50%, 70%, 90%, 100% Ethanol) entwässert, zweimal in Roti®-Histol (Carl Roth) inkubiert und in Eukitt® (Sigma-Aldrich) eingedeckelt.

Die Auswertung erfolgte am Differenzialinterferenzkontrastmikroskop BX50 (Olympus) mit Hilfe der *analySIS* Software (Tv19, Build 24).

2.2.6.3 Berlinerblau-Reaktion nach Perls

Perls-Reaktionslösung	2% [w/v] 1% [v/v]	Hexacyanoferrat-II HCl
Perls-Kernechtrot-Aluminiumsulfat	0,1% [v/v] 5% [w/v] 1-2 Tropfen	Kernechtrot Al ₂ (SO ₄) ₃ C ₂ H ₄ O ₂

Für den Nachweis von Fe³⁺-Ionen im sauren Milieu durch Hexacyanoferrat-II wurde eine Berlinerblau-Reaktion nach Perls durchgeführt.

Es wurden 10 µm dicke Milz *free-float*-Schnitte (2.2.6.1) auf Objektträger gezogen, für 40 min in frisch angesetzter Perls-Reaktionslösung inkubiert und anschließend sorgfältig in ddH₂O ausgewaschen. Eine Gegenfärbung der Zellkerne und des Zytoplasmas erfolgte durch Inkubation für 5 bis 10 min in Perls-Kernechtrot-Aluminiumsulfat. Nach Spülen der Schnitte in ddH₂O wurden sie in zweiminütigen Inkubationsschritten über eine aufsteigende Alkoholreihe (50%, 70%, 90%, 100% Ethanol) entwässert, zweimal in Roti®-Histol (Carl Roth) inkubiert und in Eukitt® (Sigma-Aldrich) eingedeckelt.

Die Auswertung erfolgte am Differenzialinterferenzkontrastmikroskop BX50 (Olympus) mit Hilfe der *analySIS* Software (Tv19, Build 24).

2.2.6.4 Diaminobenzidin (DAB)- Färbung

TBS	20 mM 150 mM	Tris-HCl NaCl pH 7,5
------------	-----------------	----------------------------

Blockierlösung	4% [w/v]	NGS
	0,2% [w/v]	BSA
	0,25% [v/v]	Triton-X 100
Verdünnungslösung	1,5% [w/v]	NGS
	0,2% [w/v]	BSA
	0,25% [v/v]	Triton-X 100
Waschpuffer (PBS)	0,25% [v/v]	Triton-X 100

Die Lokalisation eines Proteins in einem Gewebeschnitt lässt sich mit Hilfe eines spezifischen Antikörper und eine mit diesem gekoppelte Farbreaktion nachweisen. Die Umsetzung von Diaminobenzidin (DAB) durch eine Meerrettichoxidase (HRP) stellt hierbei einen indirekten, lokalen Nachweis des Proteins dar.

Gewebeschnitte (2.2.6.1) wurden zweimal für 5 min PBS (2.2.3.1) gewaschen und anschließend für 30 min in 1,6% H₂O₂/TBS inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen für 5 min in PBS wurden sie für 1 h in Blockierlösung und anschließend über Nacht in in Verdünnungslösung entsprechend gelöstem Primärantikörper (2.1.5) bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte viermal für 10 min mit Waschpuffer gewaschen, anschließend in 1:500 verdünntem, biotinyliertem Sekundärantikörper (Vector Labs) für 1 h inkubiert und erneut fünfmal für 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Bei der hierauf folgenden 1 h Inkubation mit ABC-Lösung (#PK-6200, Vector Labs) werden die biotinylierten Sekundärantikörper durch Streptavidin erkannt und spezifisch gebunden, wodurch eine Meerrettichperoxidase (HRP), welche wiederum an das Streptavidin gebunden ist, indirekt an den Primärantikörper gebunden wird. Die Schnitte wurden nun viermal für 10 min in PBS gewaschen und dann mit DAB *stain* (Vector Labs) inkubiert bis es zu einer erkennbaren Detektionsreaktion kam. Durch Zugabe von PBS wurde die Reaktion gestoppt. Die Schnitte wurden zweimal für 10 min in PBS gewaschen und anschließend in zweiminütigen Inkubationsschritten über eine aufsteigende Alkoholreihe (50%, 70%, 90%, 100% Ethanol) entwässert, zweimal in Roti[®]-Histol (Carl Roth) inkubiert und in Eukitt[®] (Sigma-Aldrich) eingedeckelt.

Die Auswertung erfolgte am Differenzialinterferenzkontrastmikroskop BX50 (Olympus) mit Hilfe der *analySIS* Software (Tv19, Build 24).

3 Ergebnisse

3.1 *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screen*

Trotz der Erkenntnis, dass Mutationen im *lamp-2* Gen für die Danon Erkrankung ursächlich sind konnte dem Protein bislang keine eindeutige Funktion zugeschrieben werden. Aus diesem Grund wurde gehofft die Rolle von LAMP-2 in der Zelle über dessen Assoziation mit neuen, charakterisierten Interaktionspartnern näher bestimmen zu können.

Um neue Interaktionspartner des Typ-1-Transmembranproteins LAMP-2 zu finden wurde ein *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screen* durchgeführt. Dieser Ansatz erlaubt es die Interaktion zweier Ubiquitinfragmente, die zum einen C-terminal an murines LAMP-2A bzw. LAMP-2B (*Bait*) und zum anderen N-terminal an zahlreiche Konstrukte einer cDNA-Bibliothek (*Prey*) kloniert wurden, nachzuweisen. Das C-terminale (Cub) und N-terminale (Nub) Ubiquitinfragment können sich spontan im Zytoplasma zu einem *Split-Ubiquitin*-Protein wieder zusammenfinden. Dieses wird durch Ubiquitin-spezifische Proteasen (UBPs) erkannt, welche ein GGX Motiv am C-Terminus des Cub-Fragmentes spalten und die hierüber gebundenen Transkriptionsfaktoren (LexA, VP16) freisetzen. Die Transkriptionsfaktoren translozieren in den Zellkern, wo sie die Transkription des HIS3-Gens bewirken und es der Hefe ermöglichen auf Histidinmangelplatten zu wachsen. Durch eine Punktmutation im Nub-Fragment (Ile13 -> Gly13 = Nubl -> NubG) wird die Affinität beider Proteinfragmente zueinander unterbunden. Nur durch die anhaltende Nähe des Cub- und NubG-Fragmentes, bedingt durch die Interaktion der an sie gebundenen Proteine, kann in diesem Fall Ubiquitin noch gebildet werden (Abb. 8 b).

Die stabile Interaktion zwischen LAMP-2 und einem Proteinprodukt der cDNA-Bibliothek wird somit durch das Wachstum von Hefeklonen auf SC-Leu/-Trp/-His-Selektionsplatten sichtbar.

3.1.1 Vektorgenerierung und Interaktionstests

Das murine LAMP-2A und das murine LAMP-2B wurden über die SfiI-Schnittstellen (bp 512, bp 560) in den *Bait*-Vektor pTMBV4 eingebracht. Hierfür wurde die Signalpeptidsequenz (bp 4-69) in beiden cDNAs zuvor deletiert, um eine mögliche Fehlsortierung der Proteine zu verhindern. Außerdem wurden die jeweiligen Stoppcodons von LAMP-2A (TAG) und LAMP-2B (TAA) entfernt, um keinen Translationsstopp vor dem, dem 3'-Ende folgendem Ubiquitinfragment (Cub) zu erhalten. Zwei beliebige Nukleotide wurden vor die C-terminale SfiI-Schnittstelle eingebracht, um LAMP-2 und die Cub-LexA-VP16-Sequenz in einem Leserahmen zu erhalten.

Die Expression des jeweiligen Konstrukts wurde nachgewiesen und auf eine mögliche Selbstaktivierung getestet, indem die Interaktion des an LAMP-2 gebundenen Cub-Fragments, mit einer entsprechenden, ko-exprimierten Positiv- (Nubl, pAl-Alg5, 2.1.4) und Negativkontrolle (NubG, pDL2-Alg5, 2.1.4) untersucht wurde. Die erfolgreiche Ko-Transformation von Nubl und NubG in die mLAMP-2A bzw. mLAMP-2B positiven Zellen konnte durch das Wachstum auf SC-Leu/-Trp-Selektionsplatten gezeigt werden (Abb. 9). Das Wachstum auf SC-Leu/-Trp/-His-Selektionsplatten zeigte die gelungene Translation des HIS3-Genes aufgrund der Interaktion von Cub mit Nubl (Abb. 9), während das ausgebliebene Wachstum der NubG ko-transformierten Zellen auf diesem Medium eine Autoaktivierung des Genes ohne vorausgegangene Proteininteraktion ausschließt (Abb. 9).

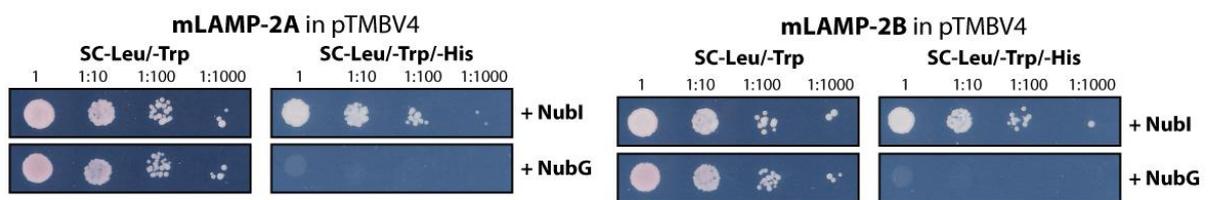


Abb. 9: Validierung des mLAMP-2A bzw. mLAMP-2B tragendem Bait-Vektors pTMBV4. Verdünnungsreihe der mLAMP-2A bzw. mLAMP-2B tragenden und Nubl bzw. NubG ko-transformierten Hefeklone auf SC-Leu/-Trp und SC-Leu/-Trp/-His Selektionsplatten.

Die finalen *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screens* gegen eine N-terminal getaggte cDNA-Bibliothek aus adultem Mäusegehirn (MoBiTec) resultierten in je ca. 120 gewachsenen Hefeklonen. Jeder einzelne repräsentierte einen putativen LAMP-2-Interaktionspartner. Zur Validierung der Interaktion mussten die Klone auf SC-Leu/-Trp/-His-Platten ausgestrichen, bei ausreichendem Wachstum die DNA isoliert, in *E. coli* XL1-Blue zur Vermehrung transformiert, isoliert und sequenziert werden.

3.1.2 LAMP-2B interagiert mit HRG-1 in Hefe

Tab. 10: Ergebnisauswertung der Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screens. Die jeweilige Anzahl an Interaktionstreffern wird angegeben. In Klammern stehende Zahlen entsprechen der Anzahl putativer Interaktionspartner, deren Nukleotidsequenz nicht vollständig im Bibliotheks-Plasmid codiert wurde. NCD = nicht-codierende Sequenz; OOF = nicht im Leserahmen (*out-of-frame*); STOPP = Stoppcodon befindet sich zwischen Proteinsequenz und NubG-Tag.

	mLAMP-2A	mLAMP-2B
Anzahl der Hefeklone	120	120
cDNA-Sequenzen	68	81
Individuelle Proteine	44	54
<i>Im Leserahmen</i>	7 (+6)	22 (+16)
Falsch-Positiv	7 (+2)	7 (+6)
Putativ-Positiv	0 (+4)	15 (+10)
NCD / OOF / STOPP	6 / 18 / 7	5 / 9 / 2

Die einzelnen gewachsenen Hefeklone der *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screens* (3.1.1) wurden im Zuge der *Screen*-Analyse durch Nukleotidsequenzenvergleiche (BLAST, NCBI) und mit Hilfe von Lasergene 8 SeqMan (DNASTAR) ausgewertet.

Für den mLAMP-2A *Screen* wurden 68 cDNA-Sequenzen ermittelt, die 44 unterschiedliche Proteine repräsentieren (Tab. 10; Anhang: Tab. 11). Der mLAMP-2B *Screen* ergab 81 Sequenzen, korrespondierend zu 54 individuellen Proteinen (Tab. 10; Anhang: Tab. 12).

Es wurde untersucht, ob sich die entsprechende Proteinsequenz mit dem NubG-Konstrukt im gleichen Leserahmen befindet und die vollständige Translation nicht durch ein Stoppcodon unterbrochen wird. Außerdem wurden Proteinsequenzen, die als bereits bekannte falsch-positive Treffer beschrieben wurden oder ebenfalls in früher durchgeführten *Screens* aufgetaucht waren, für weitere Analysen ausgeschlossen. Im mLAMP-2A *Screen* erfüllten nur vier Proteine, bei denen allerdings nicht die gesamte codierende Sequenz, sondern entweder nur das 5'- oder 3'-Ende der Sequenz im Leserahmen (*in-Frame*) waren, diese Kriterien (Tab. 10). Der mLAMP-2B *Screen* ergab 15 vollständige und zehn zusätzliche Teilsequenzen (Tab. 10).

Ungewöhnlich zu beobachten war, dass in beiden *Screens* ein großer Anteil der putativen Interaktionspartner auf der Nukleotidsequenzebene ausgeschlossen werden mussten. Die sequenzierten *Prey*-Plasmide enthielten nicht-codierende Bereiche (NCD) bzw. für ein Protein codierende Nukleotidsequenzen, die nicht im Leserahmen (OOF) mit dem darauf folgenden NubG-*Tags* oder durch ein Stoppcodon (STOPP) von diesen getrennt waren (Tab. 10). Dies führte zu einer auffälligen Anzahl positiver Interaktionen von LAMP-2 mit nur wenige Aminosäuren langen, unspezifischen Peptidsequenzen. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigte keine erkennbaren Motive, welche die Proteine gemeinsam gehabt hätten.

3.1.3 Validierung der HRG-1 Interaktion gegen mLAMP-2A, mLAMP-2B und mLIMP-2 in Hefe

Auf die Interaktionsanalyse (3.1.2) folgte, zur weiteren Bestätigung der Spezifität der Proteininteraktion, eine erneute Validierung gegen mLAMP-2A und mLAMP-2B, sowie zusätzlich gegen mLIMP-2 (*Bait*), einem ebenfalls in der lysosomalen Membran lokalisierten Protein. Hierbei zeigten alle vier verbliebenen putativen Interaktionspartner (*Prey*) aus dem mLAMP-2A *Screen* und zwölf der 13 getesteten putativen Interaktionspartner (*Prey*) aus dem mLAMP-2B *Screen* ebenfalls eine Interaktion mit mLIMP-2 (Daten nicht gezeigt). Lediglich N-terminal getaggetes mHRG-1 (Slc48a1) zeigte weiterhin nur mit mLAMP-2B eine positive Interaktion (Abb. 10).

Zwölf der putativen Interaktionspartner von mLAMP-2B wurden in dieser Validierung nicht berücksichtigt. Ihre Lokalisation, z.B. im Zellkern oder der inneren mitochondrialen Membran,

machte eine endogene Interaktion der Proteine unwahrscheinlich. Auch Proteine von denen bisher keine funktionellen Eigenschaften bekannt waren wurden für diese Studie außer Acht gelassen.

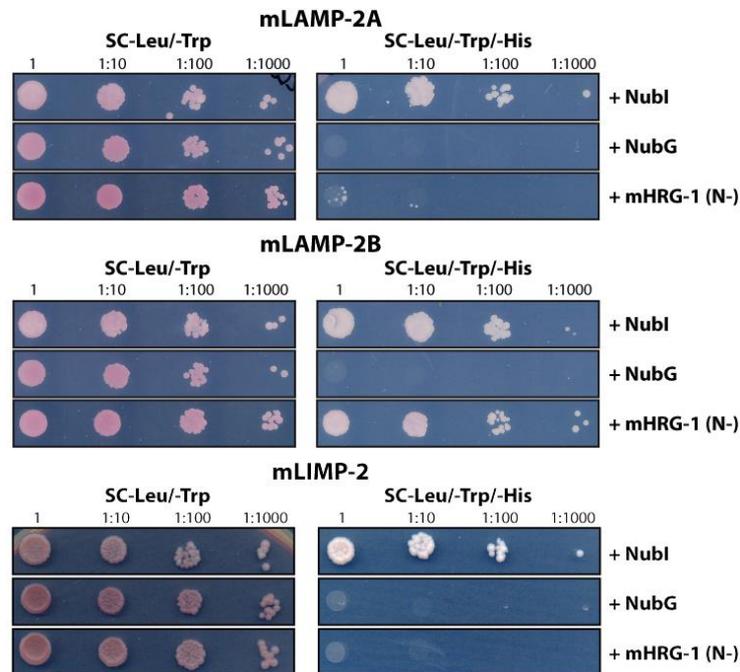


Abb. 10: Interaktionsvalidierung von N-terminal getagtem mHRG-1 mit mLAMP-2A, mLAMP-2B und mLIMP-2. Verdünnungsreihe der mLAMP-2A, mLAMP-2B bzw. mLIMP-2 tragenden und Nubl (Positivkontrolle), NubG (Negativkontrolle) bzw. HRG-1 ko-transformierten Hefeklone auf SC-Leu/-Trp und SC-Leu/-Trp/-His Selektionsplatten.

3.1.4 Der C-Terminus von HRG-1 ist nicht für die Interaktion mit LAMP-2B verantwortlich

Das *Heme-responsive Gene-1* (HRG-1) ist ein endosomal, lysosomal lokalisiertes Membranprotein, welches zum ersten Mal 2008 von Rajagopal *et al.* beschrieben wurde. Es wird vor allem als ein pH-abhängiger Hämexporter beschrieben (1.1.6).

Die Topologie von mHRG-1 ist nicht eindeutig geklärt und es wurden zwei verschiedene Strukturmodelle vorgestellt, bei dem sich zum einen der C- und N-Terminus im Zytoplasma (Rajagopal *et al.*, 2008) und zum anderen nur der N-Terminus im Zytoplasma und der C-Terminus im Lumen (O'Callaghan *et al.*, 2010) befinden sollen. Da die *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid* Methode als Interaktionsscreen nur funktioniert, wenn beide Ubiquitin-Fragmente (Cub und NubG) im Zytoplasma lokalisiert sind, könnte eine positive Interaktion zwischen C-terminal getagtem mHRG-1 (*Bait*) und dem mLAMP-2B Konstrukt (*Prey*) Aufschluss über die Topologie von mHRG-1 geben. Deshalb wurde mHRG-1 in einen Vektor umkloniert, der in einem C-terminal gebundenem NubG-Fragment resultiert (pPR3-C; 2.1.4). Trotz erfolgreicher Expression dieses Konstruktes (Abb. 11; SC-Leu/-Trp) konnte weder durch Ko-Transformation mit mLAMP-2A, noch mit mLAMP-2B, eine

Proteininteraktion anhand gewachsener Hefekulturen auf SC-Leu/-Trp/-His-Selektionsplatten gezeigt werden (Abb. 11), was ein Hinweis für die Richtigkeit der von O'Callaghan *et al.* beschriebenen Topologie sein könnte.

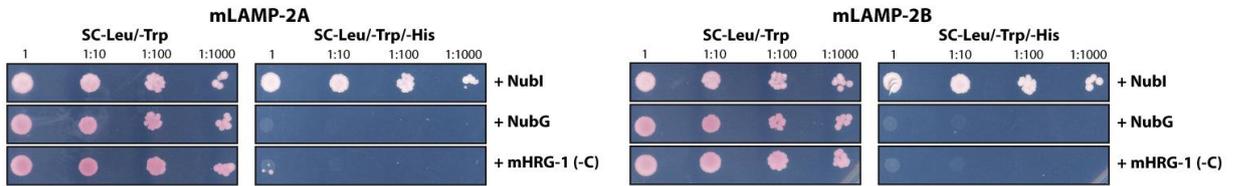


Abb. 11: Interaktionsvalidierung zwischen C-terminal getaggttem mHRG-1 (pPR3-C) mit mLAMP-2A und mLAMP-2B. Verdünnungsreihe der mLAMP-2A bzw. mLAMP-2B tragenden und Nubl (Positivkontrolle), NubG (Negativkontrolle) bzw. HRG-1 ko-transformierten Hefekulturen auf SC-Leu/-Trp und SC-Leu/-Trp/-His Selektionsplatten.

3.2 Validierung der Proteininteraktion in humanen Zellen

Die isoformspezifische Interaktion zwischen mHRG-1 und mLAMP-2B konnte mit Hilfe des *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid* Systems erkannt und reproduziert werden (Abb. 10; 3.1). Die Validierung der Interaktion dieser zwei lysosomalen Membranproteine erfolgte in einem humanen Zellsystem mittels Ko-Immunopräzipitation. Hierfür wurde hHRG-1 cDNA in einen für eukaryotische Zellen optimierten Expressionsvektor (pcDNATM3.1/Hygro⁽⁺⁾) kloniert und zusammen mit je einem dreifach C-terminal (Ct) FLAG-getaggttem hLAMP-1, hLAMP-2A oder hLAMP-2B bzw. dreifach in der luminalen Hinge-Region (h) FLAG-getaggttem hLAMP-2A oder hLAMP-2B Konstrukt transient in Hek293T-Zellen ko-transfiziert. Die Proben wurden mit einem α -HRG-1 bzw. α -FLAG Primärantikörper präzipitiert und mit allen spezifisch daran gebundenen Proteinen über SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf einem Western Blot mit dem entsprechenden Antikörper detektiert.

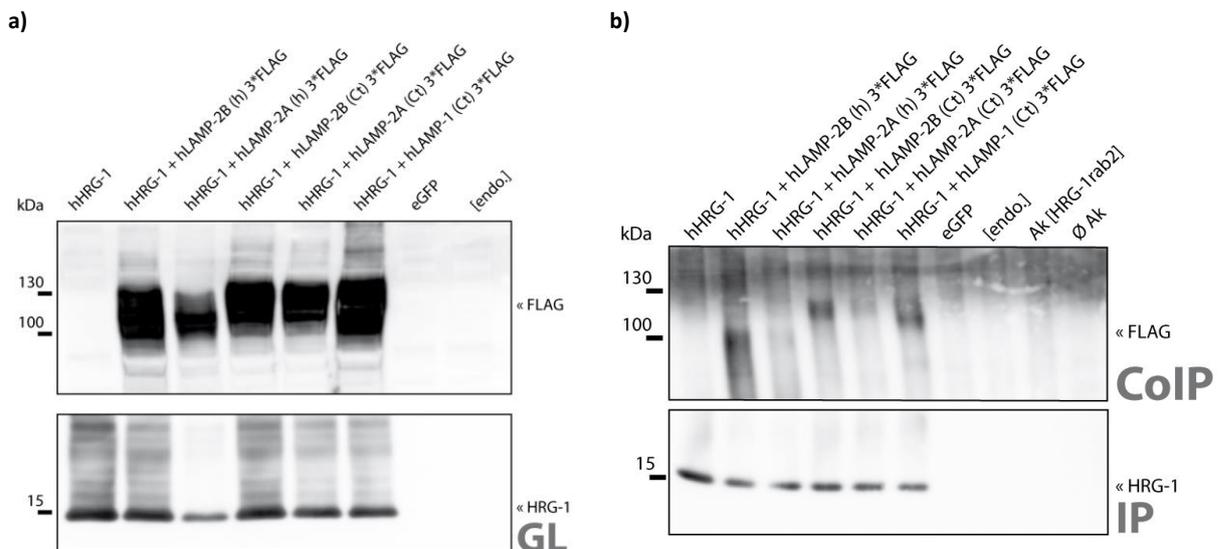


Abb. 12: Ko-Immunopräzipitation mit transient transfiziertem hHRG-1. a) Proteinlysate (40 μ g/Spur), b) HRG-1 Antikörper Präzipitat (IP) und Ko-Präzipitat (CoIP) von transient transfizierten Hek293T-Zellen wurden über eine 4-12%ige SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mittels eines α -HRG-1 und eines α -FLAG Antikörpers.

Die erfolgreiche Transfektion der Hek293T-Zellen und die Expression aller Konstrukte wurde in Gesamtlysatsproben bestätigt (Abb. 12 a; Abb. 13 a). Über den α -HRG-1 Antikörper konnte in allen hHRG-1 transfizierten Proben hHRG-1 präzipitiert werden, während dies in den untransfizierten Proben nicht möglich war (Abb. 12 b). Endogenes hHRG-1 konnte weder im Gesamtlysat (Abb. 12 a) noch im Präzipitat (Abb. 12 b IP) nachgewiesen werden, was auf eine deutlich geringere Expressionsstärke hinweist.

Mit einem α -HRG-1 gerichteten Antikörper konnte sowohl hLAMP-2B, hLAMP-2A als auch hLAMP-1 ko-präzipitiert werden (Abb. 12 b CoIP). Gleichfalls erlaubte die Verwendung eines α -FLAG-Antikörpers die Ko-Präzipitation von hHRG-1 mit hLAMP-2B-, hLAMP-2A- und hLAMP-1-FLAG-Konstrukten (Abb. 13 b). Das deutlich schwächere HRG-1 Signal nach Ko-Präzipitation mit hLAMP-1 (Abb. 13 b CoIP) beruht in diesem Fall wahrscheinlich auf einem geringeren Ausgangsgehalt von HRG-1 in der Probe, wie es im Gesamtlysat zu detektieren ist (Abb. 13 a).

Die Signalstärke des Ko-Präzipitats war in den Hinge-getaggtten (h) Konstrukten von LAMP-2B und LAMP-2A stärker als in den C-terminal getaggtten (Abb. 12 b CoIP).

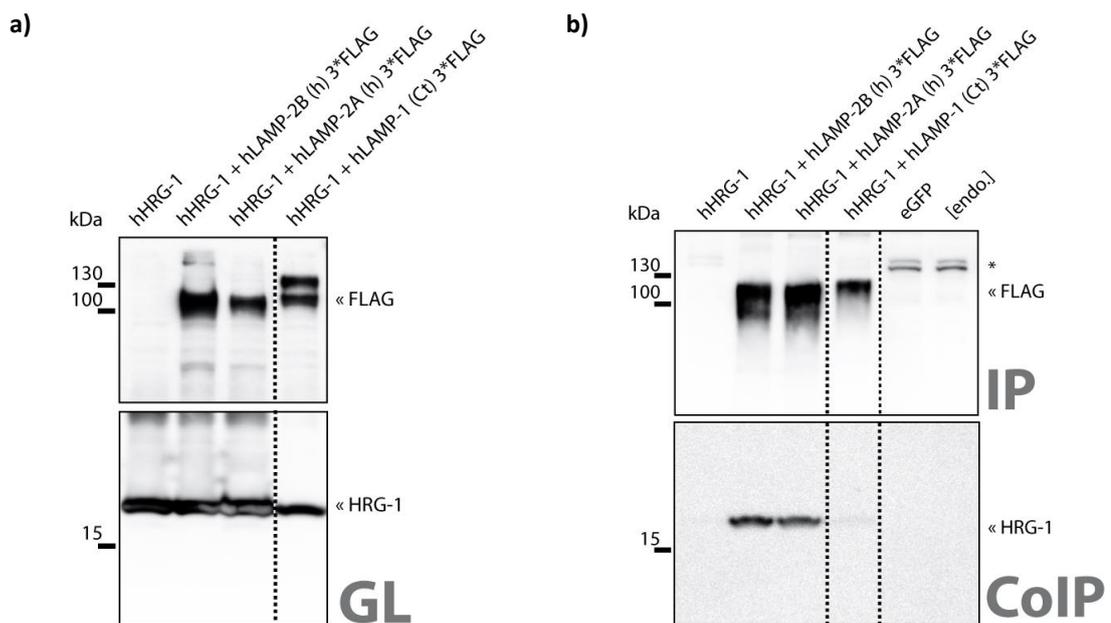


Abb. 13: Ko-Immünpräzipitation mit transient transfiziertem hHRG-1. **a)** Proteinlysate (40 μ g/Spur), **b)** FLAG Antikörper Präzipitat (IP) und Ko-Präzipitat (CoIP) von transient transfizierten Hek293T-Zellen wurden über eine 4-12%ige SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mittels eines α -HRG-1 und eines α -FLAG Antikörperbands. * = unspezifische Antikörperbande.

Während nach Überexpression die Interaktion von hHRG-1 mit hLAMP-2B, hLAMP-2A und hLAMP-1 durch Ko-Präzipitation sowohl über den α -HRG-1, als auch den α -FLAG Antikörper möglich war (Abb. 12; Abb. 13), gelang ein endogener Nachweis der Interaktion unter den gewählten Bedingungen nicht.

3.3 Subzelluläre Lokalisation von mHRG-1

3.3.1 HRG-1 ist nach Überexpression lysosomal lokalisiert

Nachdem die Interaktion von HRG-1 mit LAMP-2B, -A und LAMP-1 in eukaryotischen Zellen validiert werden konnte, war die subzelluläre Lokalisation der Proteine von Interesse. Eine in der Immunfluoreszenz beobachtete Ko-Lokalisation kann als ein weiterer Hinweis für deren mögliche Interaktion dienen. Zusätzlich sollte die bisher nicht eindeutige Lokalisation von HRG-1 geklärt werden.

Die subzelluläre Lokalisation von C-terminal getaggttem HRG-1 wurde durch Rajagopal *et al.* (2008) nach Überexpression in Hek293-Zellen als spät endosomal und lysosomal beschrieben. Dem gegenüber zeigten O'Callaghan *et al.* (2010) in MCF-7-Zellen ausschließlich die Ko-Lokalisation von N-terminal getaggttem HRG-1 mit endosomalen Markerproteinen wie EEA1, Rab11, Rab7 und TfR, nicht aber mit lysosomalem LAMP-1.

Um diese Unstimmigkeit aufzuklären wurden N- bzw. C-terminal getaggte mHRG-1 Konstrukte erzeugt und deren Lokalisation nach Überexpression in HeLa- und Cos7-Zellen verglichen. Zusätzlich erlaubten diese Konstrukte mögliche Unterschiede im Einfluss von N- gegenüber C-terminalen *Tags* auf die zelluläre Sortierung hin zu untersuchen.

Die transiente Überexpression von C-terminal HA-getaggttem mHRG-1 (mHRG-1-HA) zeigte bei fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung in HeLa-Zellen eine klare Ko-Lokalisation mit endogenem hLAMP-2 (Abb. 14). Zusätzlich zur dieser vesikulären Färbung konnte in der Überexpression zu geringen Teilen eine Ko-Lokalisation mit einem ER spezifischen Marker (KDEL) beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Es wurde kein Unterschied in der Lokalisation zwischen N- (HA-mHRG-1) und C-terminal getaggttem mHRG-1 festgestellt (Abb. 14). Dies konnte ebenfalls mit N- und C-terminal V5-getaggtten Konstrukten in Cos7-Zellen gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

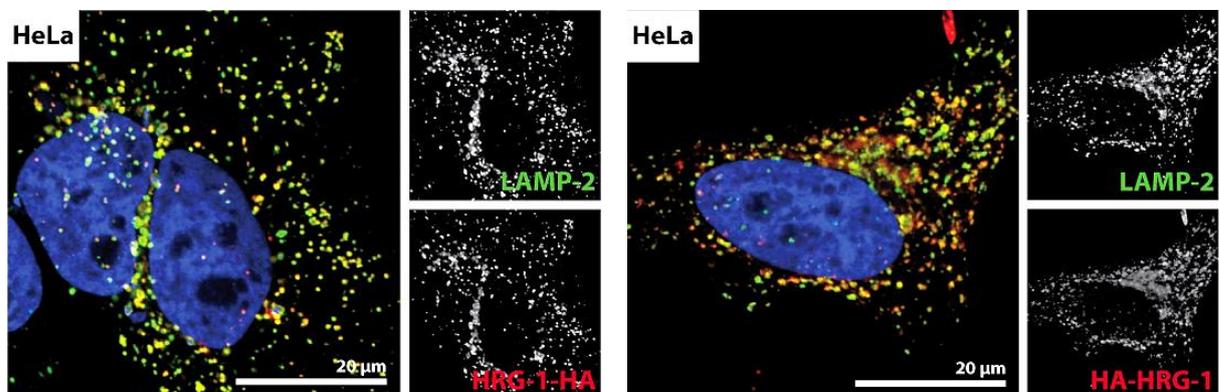


Abb. 14: Subzelluläre Lokalisation von transient transfiziertem, HA-getaggttem mHRG-1 in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion (2.2.3.2) mit 4% PFA fixiert und über Nacht im 1. Ak inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie 1 h im 2. Ak inkubiert und im Einbettmedium versiegelt (2.2.3.7). Die Färbung erfolgte gegen endogenes hLAMP-2 (grün), überexprimierte HA-Konstrukte (rot) und DAPI (blau). Messbalken entspricht 20 µm.

3.4 Antikörpergenerierung gegen HRG-1

Die von Rajagopal *et al.* (2008) beschriebene lysosomale Lokalisation von HRG-1 konnte somit durch die Ko-Lokalisation mit LAMP-2 bestätigt werden. Da es durch Überexpression von Proteinen zu deren veränderten Sortierung kommen kann, wurde für die Untersuchung der endogenen HRG-1 Lokalisation und Proteinmenge, sowohl in Zelllinien, als auch in murinen Geweben, die Generierung eines spezifischen HRG-1 Peptidantikörpers in Auftrag gegeben (Pineda Antikörper-Service).

Die verwendeten Peptidsequenzen entsprachen den N-terminalen HRG-1 Aminosäuren 4-20, sowie den letzten 19 Aminosäuren des C-Terminus. Während die Antikörper gegen das N-terminale Epitop keine spezifischen Signale in Western Blot- und Immunfluoreszenz Analysen lieferten (Daten nicht gezeigt), zeigte der gegen den C-Terminus gerichtete Antikörper (HRG-1 rab2) ein eindeutiges Signal auf Höhe der vorhergesagten Molekularmasse von 16 kDa (Abb. 15 a; HRG-1 rab2). (Die zusätzlichen, hochmolekularen Banden (HMW), sowie die Signale <16 kDa werden unter 3.6 genauer beschrieben.) Nach „Strippen“ der Membran bestätigte deren erneute Verwendung mit gegen das myc- bzw. HA-Tag gerichteten Antikörpern die Signalspezifität (Abb. 15 a; α -HA und α -myc). Das ebenfalls durch den HRG-1 rab2 Antikörper nachgewiesene endogene HRG-1 in der untransfizierten Spur (Abb. 15 a; HRG-1 rab2) konnte erwartungsgemäß mittels der α -HA und α -myc Antikörper nicht detektiert werden (Abb. 15 a; α -HA und α -myc). In Immunfluoreszenzaufnahmen von transient mit HA-getagtem mHRG-1 transfizierten HeLa-Zellen ko-lokalisierten der α -HA und α -HRG-1 Antikörper zu 100% (Abb. 15 b).

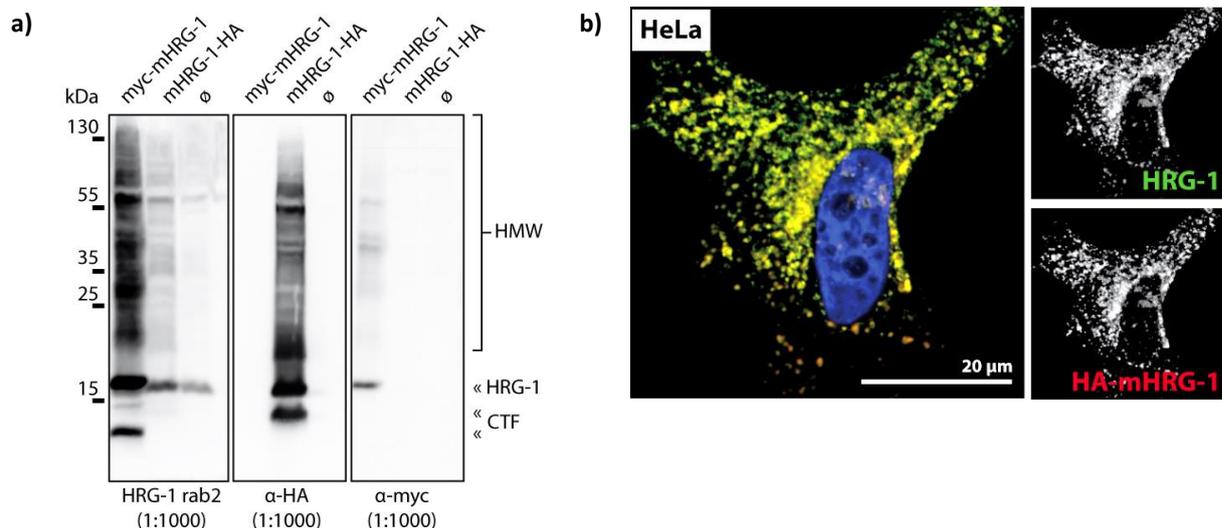


Abb. 15: Spezifische Detektion von HRG-1. **a)** Proteinlysate (40 μ g/Spur) von transfizierten Hek293T-Zellen wurden über eine 12,5%ige SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mittels eines α -HRG-1, α -HA und α -myc Antikörpers. **b)** HeLa-Zellen wurden 24 h nach Transfektion (2.2.3.2) mit 4% PFA fixiert und über Nacht im 1. Ak inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie 1 h im 2. Ak inkubiert und im Einbettmedium versiegelt (2.2.3.7). Die Färbung erfolgte gegen endogenes HRG-1 (grün), überexprimiertes HA-mHRG-1 (rot) und DAPI (blau). Messbalken entspricht 20 μ m. HMW = HRG-1 Multimerbanden.

3.5 Der α -HRG-1 Antikörper zeigt ein spezifisches Signal

Da keine HRG-1 *Knockout* Tiere oder Zellen zur weiteren Validierung der Spezifität des verwendeten α -HRG-1 Antikörpers zur Verfügung standen wurden MEF-Zellen mit siRNA gegen mHRG-1 behandelt. Die transiente Transfektion von Zellen mit siRNA dient der selektiven Herabregulation der Translation eines Proteins über die Inaktivierung von dessen mRNA. Die Verwendung eines Mixes aus vier verschiedenen siRNAs gegen mHRG-1 führte in MEF-Zellen zu einer signifikanten Herabregulation (88%) der über den α -HRG-1 Antikörper im Western Blot zu detektierenden HRG-1 Proteinmenge (Abb. 16). Die Behandlung mit der demgegenüber unspezifischen Kontroll-siRNA zeigte keinen Einfluss auf die Proteinsynthese (Abb. 16).

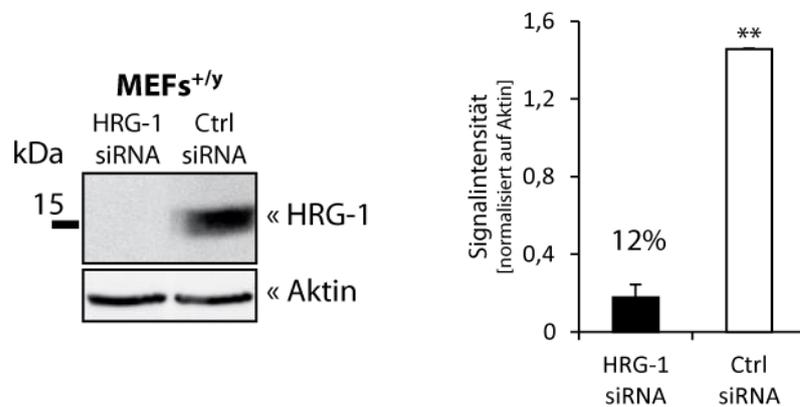


Abb. 16: Knockdown von mHRG-1 durch siRNA. a) Proteinlysate (40 μ g/Spur) von α -HRG-1 siRNA behandelten WT MEFs und Kontrollen wurden über eine 12,5%ige SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mittels eines α -HRG-1 Antikörpers. Die Detektion von Aktin diente als Proteinladekontrolle. b) Auswertung der mHRG-1 Signalintensität normalisiert auf Aktin mit ImageJ. (n=2), (MW \pm SEM, **p \leq 0,01, ungepaarter, zweiseitiger t-Test).

Die Herabregulation des HRG-1 Proteins durch siRNA konnte, unter Verwendung des α -mHRG-1 spezifischen Antikörpers (Tab. 4), in einem Großteil der mikroskopisch untersuchten Zellen beobachtet werden (Abb. 17).

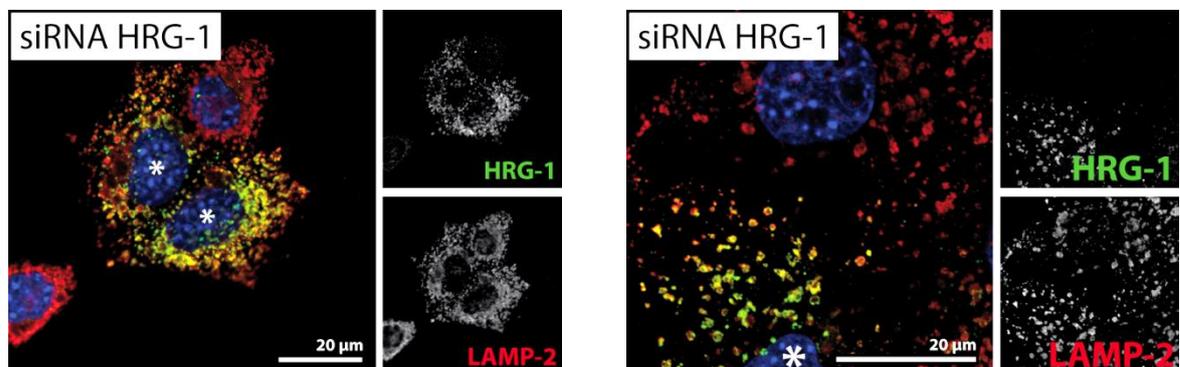


Abb. 17: Immunfluoreszenzaufnahme von mHRG-1 siRNA behandelten MEF-Zellen. Die Zellen wurden wie in 2.2.3.3 mit siRNA gegen mHRG-1 transfiziert, mit 4% PFA fixiert, über Nacht im 1. Ak inkubiert und am nächsten Tag für 1 h im 2. Ak inkubiert und im Einbettmedium versiegelt (2.2.3.7). Die Färbung erfolgte gegen endogenes mHRG-1 (grün), mLAMP-2 (rot) und DAPI (blau). Messbalken entspricht 20 μ m.

Zusätzlich zur Überprüfung der Antikörperspezifität wurde der Einfluss des HRG-1 *Knockdowns* auf die LAMP-2 Lokalisation und Konzentration beurteilt. Die vesikuläre Lokalisation von mLAMP-2 (Abb. 17), sowie die LAMP-2 Proteinmenge (Abb. 18) erschien in den HRG-1 depletierten Zellen unverändert gegenüber unbehandelten Zellen.

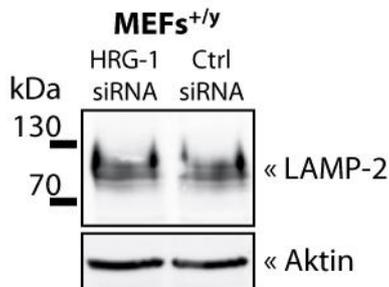


Abb. 18: LAMP-2 Konzentration in HRG-1 *Knockdown* Zellen. Proteinlysate (40 µg/Spur) von α-HRG-1 siRNA behandelten WT MEFs und Kontrollen wurden über eine 12,5%ige SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mittels eines α-LAMP-2 Antikörpers. Die Detektion von Aktin diente als Proteinladekontrolle.

3.5.1 Endogenes HRG-1 ist lysosomal lokalisiert

Die Transfektion von Zellen mit cDNA-Plasmiden hat eine zusätzliche Expression und anschließende Synthese von Proteinen zur Folge, deren nun gesteigerte Anzahl in der Zelle eine Fehlsortierung und irreführende Ko-Lokalisation des Proteins mit anderen Markern bedingen kann. Hierauf begründete Schlussfolgerungen müssen nicht der natürlichen *in vivo* Situation entsprechen.

Aus diesem Grund wurde die endogene Lokalisation von murinem und humanem HRG-1 in verschiedenen Zelllinien untersucht.

In HeLa-Zellen zeigte die endogene Lokalisation von HRG-1, wie auch in der transienten Überexpression (3.3.1), eine starke Ko-Lokalisation mit einem lysosomalen Marker (hLAMP-1; Abb. 19 a). Der spät endosomale Marker Lyso-bisphosphatidsäure (LBPA) ko-lokalisiert hingegen in HeLa-Zellen mit hHRG-1 nur teilweise und schien vielmehr von dem HRG-1 Fluoreszenzsignal umschlossen zu sein (Abb. 19 b). Der früh endosomale Marker EEA1 (*early endosome antigen 1*) zeigt, anders als von O'Callaghan *et al.* (2010) nach Überexpression in MCF7-Zellen beschrieben, keine Ko-Lokalisation mit hHRG-1 (Abb. 19 c).

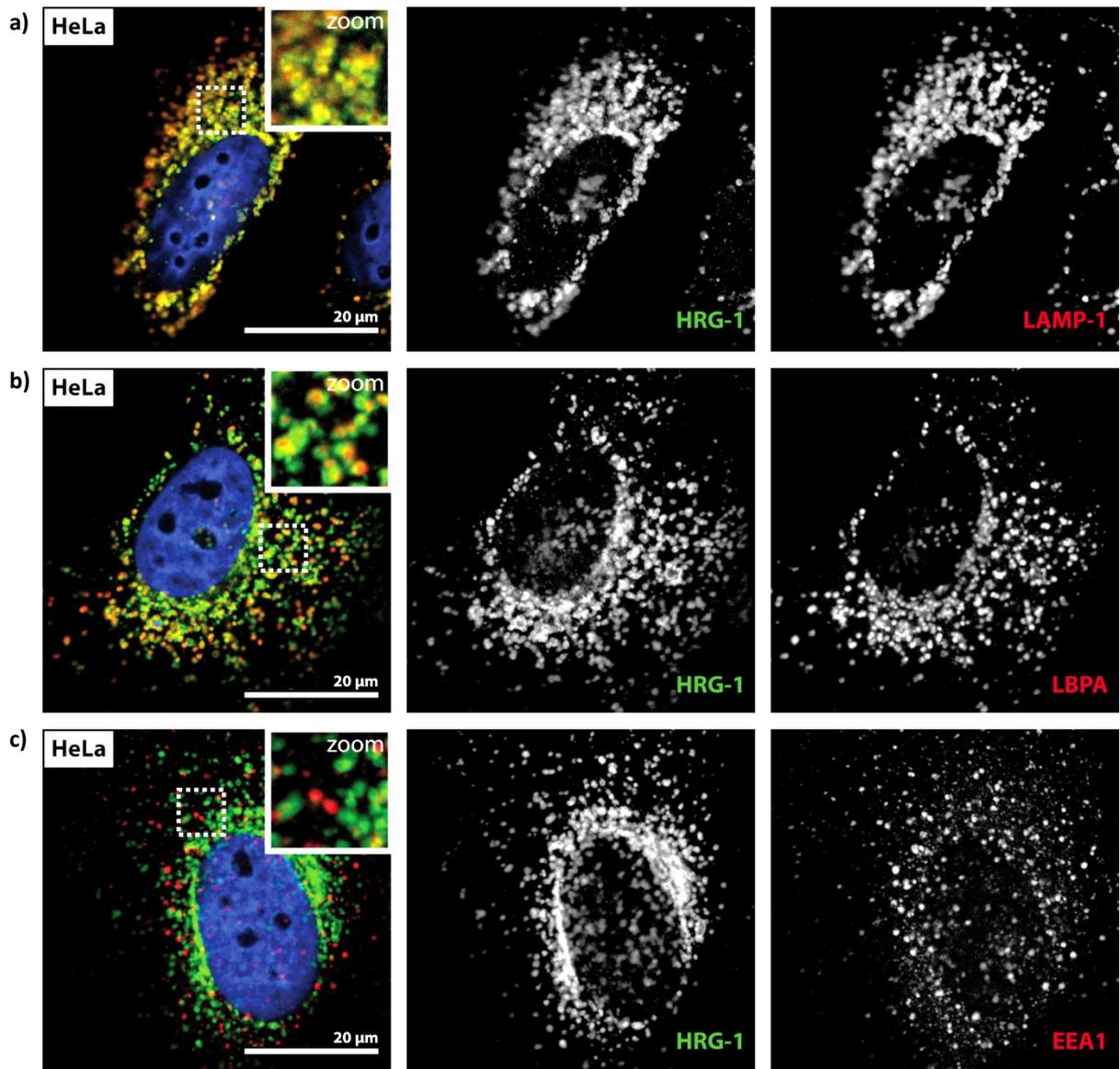


Abb. 19: Subzelluläre Lokalisation von endogenem hHRG-1 in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden mit 4% PFA fixiert, über Nacht im 1. Ak inkubiert und am nächsten Tag für 1 h im 2. Ak inkubiert und im Einbettmedium versiegelt (2.2.3.7). Die Färbung erfolgte gegen endogenes hHRG-1 (grün), DAPI (blau) und **a)** hLAMP-1 (rot), **b)** LBPA (rot), **c)** hEEA1 (rot). Messbalken entspricht 20 µm.

Um zusätzlich den Einfluss von LAMP-2 auf die Sortierung und Lokalisation von HRG-1 zu beurteilen wurden murine embryonale Fibroblasten (MEFs) aus Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Tieren gewonnen (Abb. 20) und fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 21).

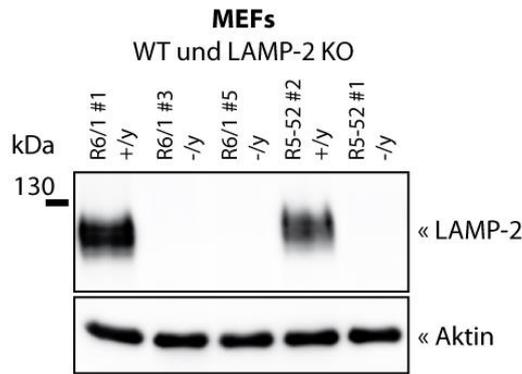


Abb. 20: LAMP-2 Proteingehalt in murinen embryonalen Fibroblasten von Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Tieren. Proteinlysate (40 µg/Spur) von WT und LAMP-2 KO MEFs wurden über eine 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mittels eines α -mLAMP-2 Antikörpers. Die Detektion von Aktin diente als Proteinladekontrolle. WT = Wildtyp; KO = *Knockout*.

Wie auch in der transienten Überexpression (3.3.1) wurde eine starke Ko-Lokalisation zwischen mHRG-1 und dem lysosomalem mLAMP-2 beobachtet (Abb. 21 a). Auch mLAMP-1 ließ sich mit mHRG-1 ko-lokalisieren (Abb. 21 b). Hierbei war ein zunehmender Gradient in der Stärke der Ko-Lokalisation vom Nukleus zur Zellperipherie zu beobachten.

Noch deutlicher als in HeLa-Zellen (Abb. 19 b) war keine Ko-Lokalisation zwischen dem spät endosomalen Marker LBPA und HRG-1 zu detektieren (Abb. 21 c). Vielmehr konnte mit Hilfe dieses Markers zwischen Vesikelmembran und –Lumen unterschieden werden. Aufgrund der größeren Lysosomen in MEF-Zellen (im Vergleich zu HeLa-Zellen) zeigte das Transmembranprotein HRG-1 ein das luminäre LBPA, entsprechend der Lysosomenmembran, umschließendes Signal (Abb. 21 c).

Auch der Transferrinrezeptor (TfR) als Marker für rezirkulierende Endosomen zeigte entgegen O’Callaghan *et al.* (2010), keine Ko-Lokalisation mit HRG-1 (Abb. 21 d).

Trotz einiger vergrößerter Vesikel, wie sie bereits für LAMP-2 *Knockout* Zellen beschrieben wurden (Guhde, 1999), blieb die Lokalisation von HRG-1 in den Zellen im Vergleich zu Wildtyp MEFs unverändert (Abb. 21) und spiegelte deren Lokalisation in HeLa-Zellen (Abb. 19) wider.

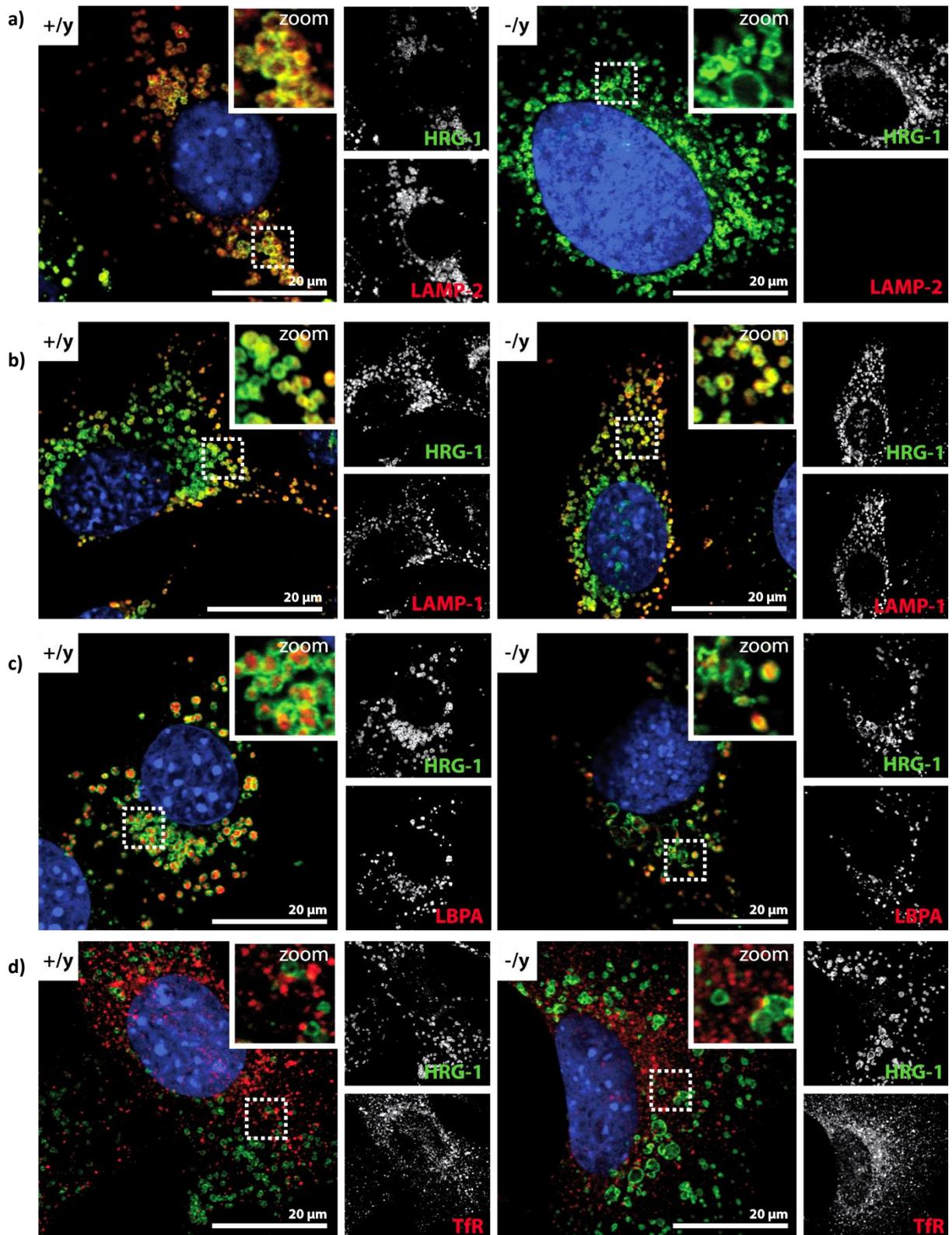


Abb. 21: Subzelluläre Lokalisation von endogenem HRG-1 in Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* MEF-Zellen. Die Zellen wurden mit 4% PFA fixiert, über Nacht im 1. Ak inkubiert und am nächsten Tag für 1 h im 2. Ak inkubiert und im Einbettmedium versiegelt (2.2.3.7). Die Färbung erfolgte gegen endogenes mHRG-1 (grün), DAPI (blau) und a) LAMP-2 (rot), b) LAMP-1 (rot), c) LBPA (rot), d) TfR (rot). Messbalken entspricht 20 μm.

Die kleinere Bande (CTF) konnte nur nach Überexpression sowohl bei murinem als auch humanem HRG-1 detektiert werden (Abb. 24, blau). Wurde ein C-terminal HA-getaggtetes Konstrukt transfiziert, war die Detektion des CTFs mit einem α -HA Antikörper ebenso möglich. Mit Hilfe eines N-terminal myc-getaggteten Konstrukt konnte dagegen das CTF auf dem Western Blot mit einem α -myc Antikörper nicht nachgewiesen werden. Das CTF war jedoch in der gleichen Probe mit Hilfe des α -HRG-1 Antikörpers zu detektieren (Abb. 24). Dies lässt im Fall der kleineren Bande auf ein putatives C-terminales Fragment (CTF) schließen. C-terminal HA-getaggtetes mHRG-1 ließ sich in keiner Form über den α -HRG-1 Antikörper nachweisen (Abb. 24, α -HRG-1).

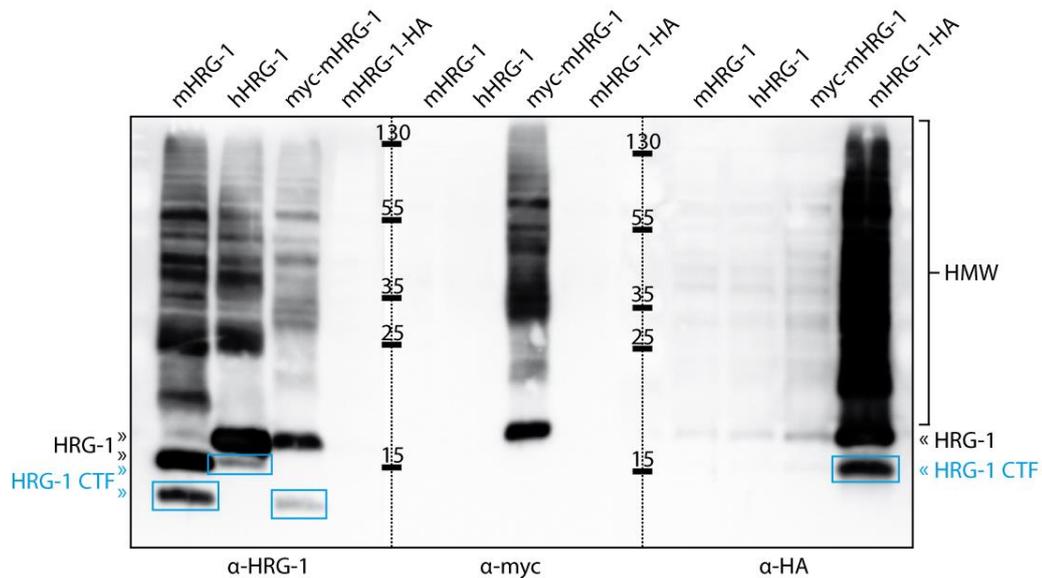


Abb. 24: Proteinmuster der mHRG-1, hHRG-1, myc-mHRG-1 und mHRG-1-HA Konstrukte. Proteinlysate (10 μ g/Spur) von transient transfizierten Hek293T-Zellen wurden über 12,5%ige SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Die Detektion des Monomers (HRG-1), Multimeren (HMW) und C-terminalem Fragment (HRG-1 CTF, blau) erfolgte mittels eines α -HRG-1, α -myc oder α -HA Antikörpers.

3.6.1 Die Prozessierung von HRG-1 lässt sich durch Cysteinproteaseinhibitoren beeinflussen

Mit Hilfe von Inhibitoren lassen sich sowohl Proteaseklassen als auch einzelne Proteasen spezifisch in ihrer Aktivität beeinflussen. Auf diese Weise ist es möglich proteolytische Ereignisse, wie die Erzeugung des CTF von HRG-1, näher zu untersuchen und die verantwortlichen Enzyme einzugrenzen.

In einem ersten Versuch wurden unterschiedliche Inhibitoren gegen Cysteinproteasen (Leupeptin, E64, EST, ALLN), γ -Sekretasen (DAPT, Inhibitor X) und Metalloproteasen (Marimastat, GM 6001) verwendet. Hierbei zeigte sich ausschließlich nach Inhibierung von Cysteinproteasen durch den zellpermeablen Stoff EST ein Anstieg des HRG-1 Monomer zu HRG-1 CTF Verhältnisses (Abb. 25, rot).

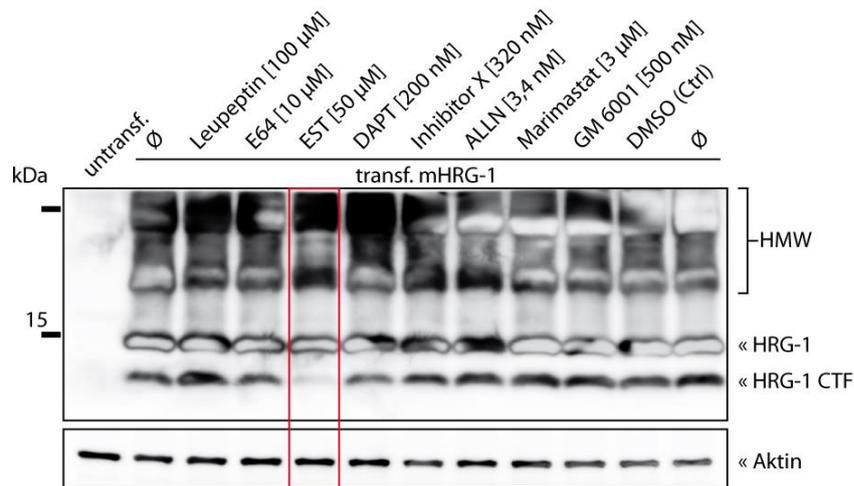


Abb. 25: Inhibierung der proteolytischen Spaltung von HRG-1. Proteinlysate (10 µg/Spur) von inhibitorbehandelten, transient mit mHRG-1 transfizierten Hek293T-Zellen wurden über 12,5%ige SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Die Detektion von HRG-1 und seinem CTFs erfolgte über α -HRG-1. Die Detektion gegen α -Aktin diene als Proteinladekontrolle (n=1). HMW = HRG-1 Multimere.

Für die Validierung dieses Einflusses von Cysteinproteasen wurden in einem weiteren Experiment neben EST ein Proteasominhibitor (MG132) und Ammoniumchlorid (NH_4Cl), zur Steigerung des lysosomalen pH-Werts, verwendet. Während das Proteasom nur ubiquitinmarkierte Proteine im Zytosol und innerhalb des Zellkerns abbaut, sollte die Inhibierung durch NH_4Cl die gesamte lysosomale Degradation beeinflussen.

Während unter NH_4Cl und EST Behandlung eine veränderte HRG-1/CTF Ratio zu beobachten war (Abb. 26, rot), zeigten NH_4Cl und MG132 einen zusätzlichen Rückgang in der Signalintensität der Multimerbanden (HMW) von HRG-1 (Abb. 26). Die Abnahme des gesamten HRG-1 Signals durch die Inhibierung mittels NH_4Cl und MG132 war vermutlich Folge der eingeschränkten Zellviabilität durch eine umfassende Beeinflussung des generellen Zellstoffwechsels.

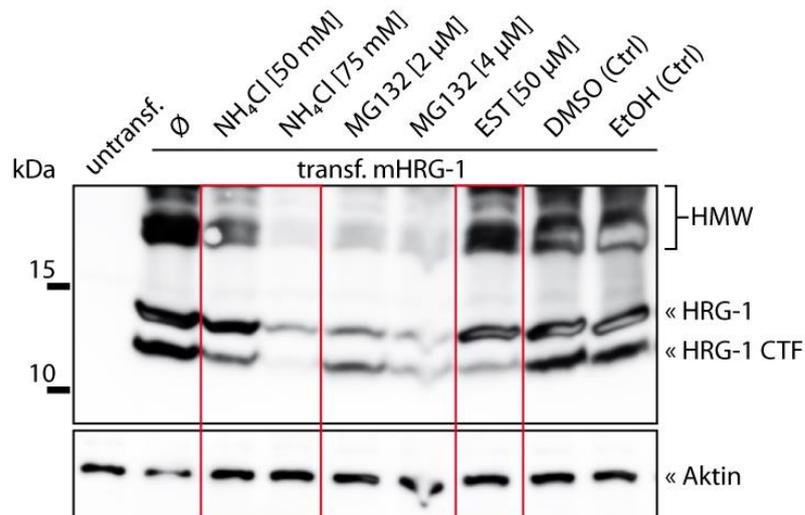


Abb. 26: Inhibierung der proteolytischen Spaltung von HRG-1. Proteinlysate (10 $\mu\text{g}/\text{Spur}$) von inhibitorbehandelten, transient mit mHRG-1 transfizierten Hek293T-Zellen wurden über 12,5%ige SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Die Detektion von HRG-1 und seinem CTFs erfolgte über α -HRG-1. Die Detektion gegen α -Aktin diene als Proteinladekontrolle ($n=1$). HMW = HRG-1 Multimere.

3.7 N-terminale Prozessierung von HRG-1 erfolgt direkt vor der ersten Transmembrandomäne

Die vorhergesagte Topologie von HRG-1 (Rajagopal *et al.*, 2008), mit vier Transmembrandomänen, beschreibt einen elf Aminosäuren langen N-Terminus und einen 16 Aminosäuren langen C-Terminus. Zur näheren Bestimmung der N-terminalen Schnittstelle von HRG-1 anhand der molekularen Größe des Proteins wurde ein Deletionskonstrukt kloniert. Diesem Konstrukt (ΔNt -mHRG-1-HA, Abb. 27, #3) fehlen zum einen die ersten elf N-terminalen Aminosäuren bis zur ersten Transmembrandomäne und zum anderen war es C-terminal HA-getaggt.



Abb. 27: Übersicht der verwendeten HRG-1 Konstrukte. #2 = mHRG-1-HA; #3 = ΔNt -mHRG-1-HA. Die putativen Transmembrandomänen sind in grün, Sortierungsmotive in blau, orange und rosa gekennzeichnet.

Nach Überexpression in Hek293T-Zellen zeigte das ΔNt -mHRG-1-HA Konstrukt im Western Blot nur ein Bandensignal auf Höhe des HA-getaggten CTFs (circa 16 kDa; 3.6) im Vergleich zum mHRG-1-HA Konstrukt (Abb. 28 a). Dieser Befund legt nahe, dass die Spaltung von HRG-1 direkt vor der ersten Transmembrandomäne stattfindet.

Immunfluoreszenzuntersuchungen in HeLa-Zellen zeigten keine Ko-Lokalisation zwischen der Deletionsmutante, welche über ihr *Tag* detektiert wurde, und endogenem lysosomalem HRG-1 (Abb. 28 b), dafür mit dem ER-Marker KDEL (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass durch die Deletion

des N-Terminus von HRG-1 der Transport des Proteins aus dem Endoplasmatischen Retikulum vollständig unterbunden ist.

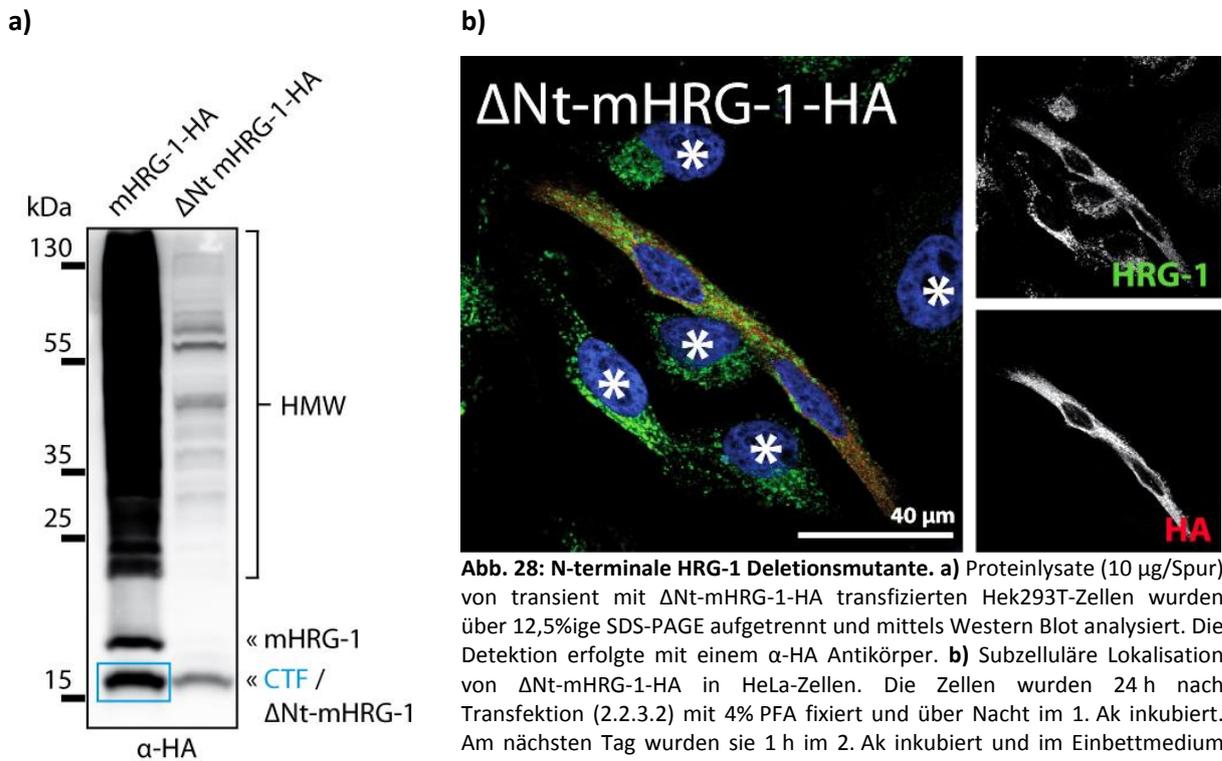


Abb. 28: N-terminale HRG-1 Deletionsmutante. a) Proteinlysate (10 μ g/Spur) von transient mit Δ Nt-mHRG-1-HA transfizierten Hek293T-Zellen wurden über 12,5%ige SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit einem α -HA Antikörper. b) Subzelluläre Lokalisation von Δ Nt-mHRG-1-HA in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion (2.2.3.2) mit 4% PFA fixiert und über Nacht im 1. Ak inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie 1 h im 2. Ak inkubiert und im Einbettmedium versiegelt (2.2.3.7). Die Färbung erfolgte gegen mHRG-1 (grün), überexprimiertes Δ Nt-mHRG-1-HA (rot) und DAPI (blau). Messbalken entspricht 40 μ m.

3.8 Lysosomale Sortierungsmotive in HRG-1

Für die korrekte subzelluläre Lokalisation von lysosomalen Proteinen wurden Sortierungsmotive in ihrer Aminosäuresequenz beschrieben (Braulke und Bonifacio, 2009). HRG-1 besitzt sowohl ein konserviertes, putatives Tyrosin- (YXX ϕ) als auch Di-Leucinmotiv (D/ExxxLL). Die tatsächliche Bedeutung dieser Motive für die subzelluläre Lokalisation wurde mittels einer Deletions- und speziellen Alaninmutanten untersucht (Abb. 29; Abb. 31).

3.8.1 Der C-Terminus ist wichtig für die HRG-1 Lokalisation



Abb. 29: Übersicht der verwendeten HRG-1 Konstrukte. #1 = myc-mHRG-1; #4 = myc-mHRG-1- Δ Ct. Die putativen Transmembrandomänen sind in grün, Sortierungsmotive in blau, orange und rosa gekennzeichnet.

Für die Deletionsmutante myc-mHRG-1- Δ Ct (Abb. 29, #4) wurde der gesamte 16 Aminosäuren lange C-Terminus von HRG-1, mit beiden putativen Sortierungsmotiven, entfernt. Da das Epitop des

α -HRG-1 Antikörpers innerhalb des C-Terminus lokalisiert war, musste ein N-terminales *myc-Tag* verwendet werden, um das Konstrukt über einen Antikörper detektieren zu können.

Das *myc-mHRG-1- Δ Ct* Konstrukt zeigte im Western Blot, übereinstimmend mit dem *myc-mHRG-1* Konstrukt (Abb. 29, #1), nur die Bande im Molekulargößbereich des Monomers und kein dem CTF entsprechendes Signal (Abb. 30 a). Die jeweiligen Banden der beiden Konstrukte wiesen aufgrund der C-Terminusdeletion im *myc-mHRG-1- Δ Ct* Konstrukt jedoch unterschiedliche Molekulargewichtgrößen auf (Abb. 30 a).

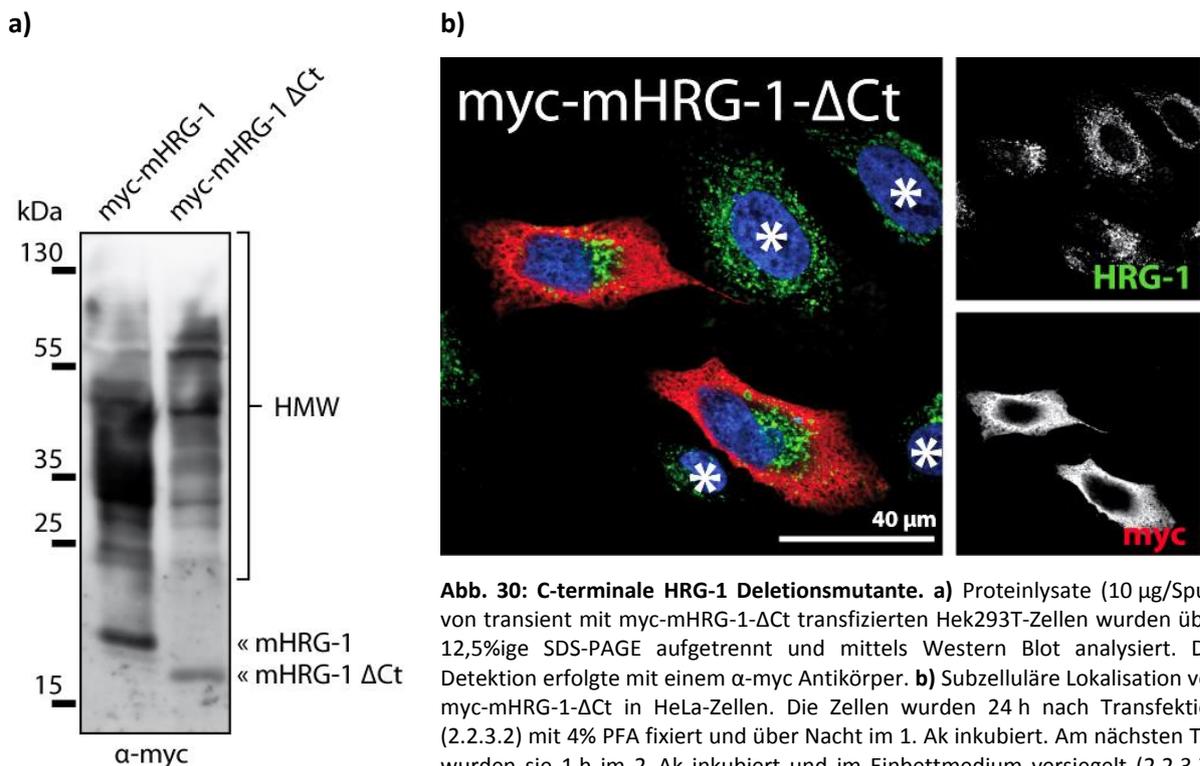


Abb. 30: C-terminale HRG-1 Deletionsmutante. a) Proteinlysate (10 μ g/Spur) von transient mit *myc-mHRG-1- Δ Ct* transfizierten Hek293T-Zellen wurden über 12,5%ige SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit einem α -myc Antikörper. b) Subzelluläre Lokalisation von *myc-mHRG-1- Δ Ct* in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion (2.2.3.2) mit 4% PFA fixiert und über Nacht im 1. Ak inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie 1 h im 2. Ak inkubiert und im Einbettmedium versiegelt (2.2.3.7). Die Färbung erfolgte gegen mHRG-1 (grün), überexprimiertes *myc-mHRG-1- Δ Ct* (rot) und DAPI (blau). Messbalken entspricht 40 μ m. HMW = HRG-1 Multimere.

Immunfluoreszenzuntersuchungen in HeLa-Zellen zeigten, wie bereits für das Δ Nt-mHRG-1-HA Konstrukt beschrieben (3.7), keine Ko-Lokalisation zwischen der transient transfizierten Deletionsmutante und dem endogenem HRG-1 (Abb. 30 b), dafür mit dem ER-Marker KDEL (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass auch für die *myc-mHRG-1- Δ Ct* Mutante nicht aus dem Endoplasmatischen Retikulum heraustransportiert wird.

3.8.2 C-terminale Sortierungsmotive spielen keine Rolle für die lysosomale Lokalisation von HRG-1

Da die Deletion des gesamten C-Terminus die Retention des HRG-1 Konstrukts im Endoplasmatischen Retikulum zur Folge hatte, wurden weitere C-terminale Sortierungsmotivmutanten erzeugt (Abb. 31 #5a, #5b, #5c).

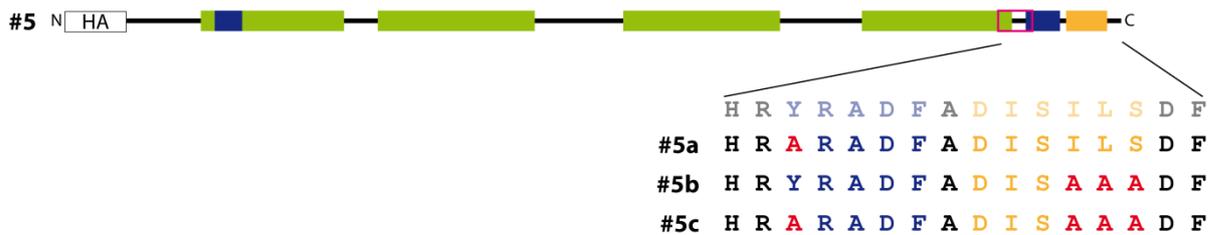


Abb. 31: Übersicht der verwendeten HRG-1 Konstrukte. #5 = HA-mHRG-1; #5a = HA-mHRG-1^{Y133A}; #5b = HA-mHRG-1^{ILS142-144AAA}; #5c = HA-mHRG-1^{Y133A+ILS142-144AAA}. Zu Alanin mutierte Aminosäuren sind in rot, die putativen Transmembrandomänen in grün, Sortierungsmotive in blau, orange und rosa gekennzeichnet.

Mit Hilfe von Punktmutationen lassen sich einzelne Aminosäuren einer Proteinsequenz austauschen. Auf diese Weise können deren Eigenschaften (z.B. Polarität, Größe) verändert und Proteindomänen für zum Beispiel Interaktionen unkenntlich gemacht werden. Alanin wird meist für die Substitution gewählt, da diese Aminosäure durch ihre kleine und neutrale Seitenkette einen geringen Einfluss auf die Sekundärstruktur von Proteinen ausübt.

Zur Untersuchung der Bedeutung der C-terminalen Sortierungsmotive auf die tatsächliche Lokalisation von HRG-1, wurden die entscheidenden Aminosäuren des Tyrosin- (Y133) und Di-Leucin (ILS142-144) basierten Motives zu Alanin mutiert. Es wurden Alaninkonstrukte der einzelnen, sowie beider Motive gleichzeitig erzeugt (Abb. 31, #5a, b, c). Die entsprechenden Konstrukte wurden transient in HeLa-Zellen transfiziert und über Immunfluoreszenz mit Hilfe des N-terminalen HA-Tags am Konfokalmikroskop detektiert.

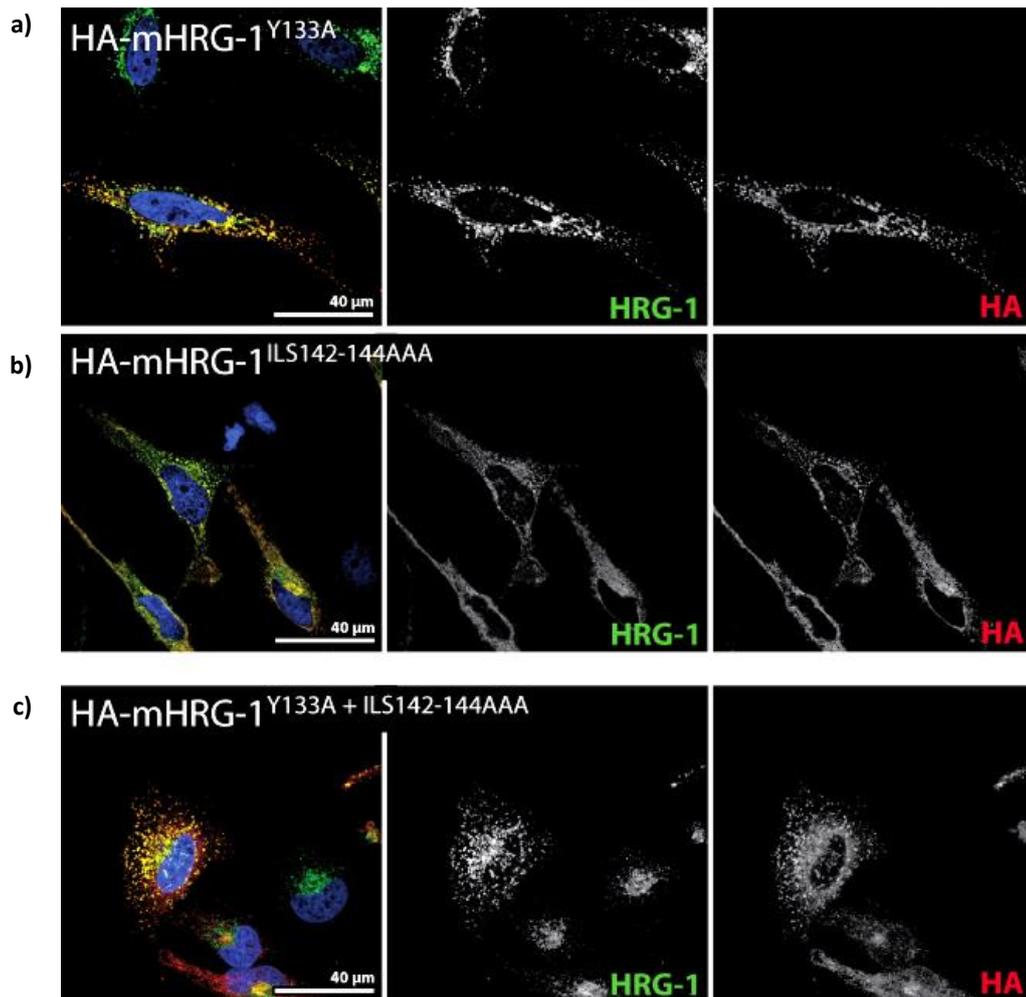


Abb. 32: Subzelluläre Lokalisation der transient transfizierten HRG-1 Alaninmutanten in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion (2.2.3.2) mit 4% PFA fixiert und über Nacht im 1. Ak inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie 1 h im 2. Ak inkubiert und im Einbettmedium versiegelt (2.2.3.7). Die Färbung erfolgte gegen endogenes mHRG-1 (grün), DAPI (blau) und überexprimiertes a) HA-mHRG-1^{Y133A} (rot) b) HA-mHRG-1^{ILS142-144AAA} (rot) c) HA-mHRG-1^{Y133A+ILS142-144AAA} (rot). Messbalken entspricht 40 μm.

All drei Konstrukte konnten mit endogenem HRG-1 ko-lokalisiert werden (Abb. 32). Zusätzlich zur vesikulären Ko-Färbung zeigten die transfizierten Konstrukte als Überexpressionsartefakt eine leichte Ko-Lokalisation mit dem ER-Marker KDEL (Daten nicht gezeigt). Die beiden C-terminalen Sortierungsmotive von HRG-1 scheinen somit nicht ausschlaggebend für die lysosomale Lokalisation des Proteins zu sein.

3.9 HRG-1 Konzentration in Wildtyp und LAMP-2 Knockout Mäusen

Sowohl LAMP-2 als auch HRG-1 werden ubiquitär in allen Lysosomen enthaltenden Zellen exprimiert. Parallelen in den Expressionsniveaus konnten in Milz, Gehirn, Leber, Niere, Herz und Muskel auf mRNA Ebene beobachtet werden (Konecki *et al.*, 1995; O'Callaghan *et al.*, 2010; Rajagopal *et al.*, 2008). Um den Einfluss von LAMP-2 auf die *in vivo* Proteinkonzentration von HRG-1 zu untersuchen

wurden Zell- und Gewebelysate aus Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Mäusen durch Western Blot Analysen verglichen.

3.9.1 HRG-1 Proteinmenge in Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Mäusen

Für die Beurteilung der Proteinniveaus von HRG-1 in murinem Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* MEFs, wie auch Geweben von 54 Wochen alten Tieren (Leber, Niere, Herz, Milz), wurden Proben-Lysate mittels Western Blot analysiert.

Die Signalintensität von HRG-1 war in Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* MEF-Zellen anhand von Western Blot Analysen nicht eindeutig zu bestimmen. Die Proteinmenge zeigte eine starke Varianz innerhalb einer Zelllinie von Proben- zu Probennahme (Abb. 33). und war nur teilweise in LAMP-2 *Knockout* MEFs stärker als in Wildtyp-Zellen zu detektieren. Trotz standardisierter Vorgehensweise, von einer einheitlichen Zellaussaat bis über die weiteren Aufarbeitungsschritte hin, konnte keine ausreichend, gleichbleibende Signalstärke erreicht werden (Abb. 33). Dies bedingte für Zellkulturexperimente ein entscheidendes Problem, welches auch die Generierung neuer MEF-Zelllinien nicht gelöst werden konnte.

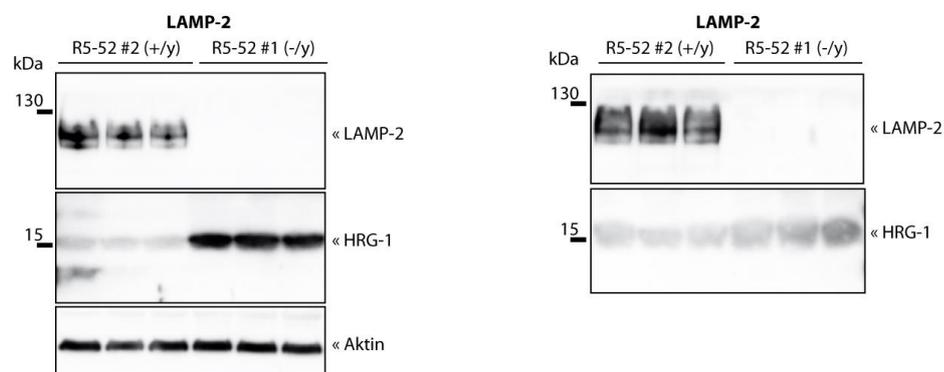


Abb. 33: HRG-1 Gehalt in Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* MEFs. Proteinlysate (40 µg/Spur) der gleichen Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* MEFs wurden in zwei Experimenten über 12,5%ige SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit einem α -mLAMP-2 und α -HRG-1 Antikörper. Die Detektion gegen α -Aktin diente als Proteinladekontrolle (n=5).

In Geweben von Wildtyp und *Knockout*-Tieren dagegen zeigten, normalisiert auf die Aktin Gehalt, Unterschiede in der HRG-1-Signalintensität (Abb. 34). In Leber (-78%), Niere (-60%), Herz (-90%) und Milz (-62%) waren die Proteinmengen im *Knockout* schwächer als in korrespondierenden Wildtyp-Tieren. Dieser Unterschied war in Herzgeweben signifikant ($p=0,01$; Abb. 34 b).

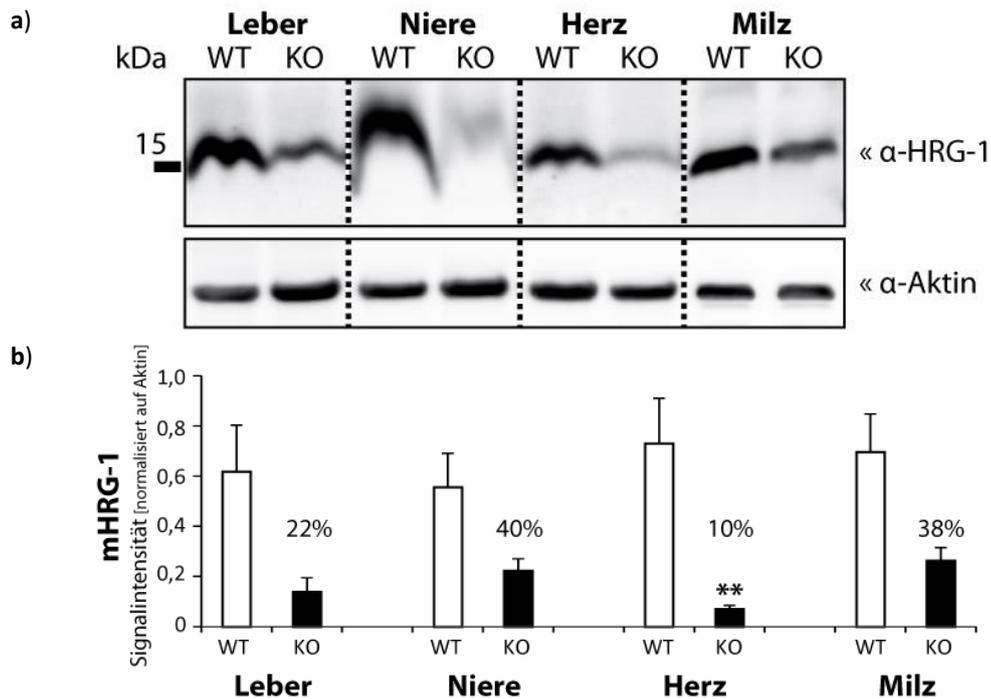


Abb. 34: HRG-1 Proteingehalt in Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Mausgeweben. a) Proteinlysate (80 µg/Spur) von Leber-, Nieren-, Herz- und Milzlysaten wurden über 12,5%ige SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mittels eines α-HRG-1 Antikörpers. Aktin diente als Proteinladekontrolle. b) Quantifizierung der mHRG-1 Signalintensitäten normalisiert auf Aktin. (n=5 (Leber, Niere, Herz), n=4 (Milz)), (MW ± SEM, **p<0,01, ungepaarter, zweiseitiger t-Test). WT = Wildtyp; KO = *Knockout*.

3.9.2 *Hrg-1* Expression auf mRNA-Ebene in Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Mäusen

Unterschiede im Proteingehalt können sowohl auf transkriptionaler oder translationaler Ebene entstehen, als auch durch Effekte, welche die Proteinstabilität und Degradation beeinflussen.

Mittels quantitativer RT-PCR (qRT-PCR; 2.2.1.13) wurden die Expressionsniveaus von *hrg-1* in Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Geweben (Leber, Niere, Herz, Milz) anhand der mRNA-Konzentrationen relativ zu Aktin bestimmt.

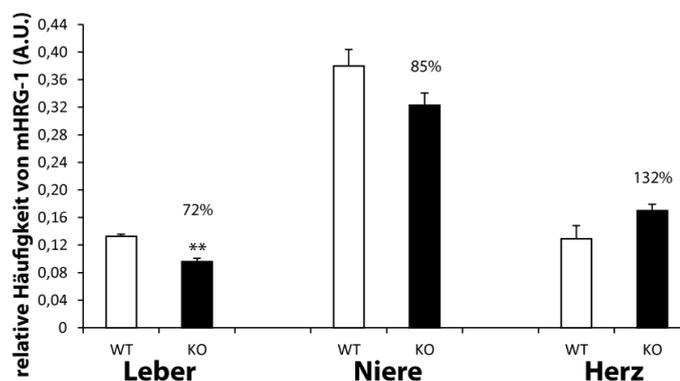


Abb. 35: Mittels qRT-PCR ermittelte und auf Aktin normalisierte relative Häufigkeit des HRG-1 mRNA Gehalts in Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Organen. (n=3), (MW ± SEM, **p<0,01, ungepaarter, zweiseitiger t-Test). WT = Wildtyp; KO = *Knockout*.

Die aus Gewebehomogenaten extrahierte mRNA von HRG-1 zeigte sowohl in der Leber (-28%) als auch Niere (-15%) von LAMP-2 *Knockout* Tieren geringere Expressionsniveaus als in Wildtyp Tieren. Dies entsprach tendenziell den zuvor beobachteten Proteinniveaus von Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Tieren (Abb. 34). In Herzgewebe (+32%) war die mRNA Konzentration im *Knockout* dem widersprechend erhöht. Die gemessenen Unterschiede waren zwar in den Leberproben signifikant ($p=0,007$) verändert, können für den niedrigen Proteingehalt im LAMP-2 *Knockout* jedoch nicht alleine verantwortlich sein.

Eine RNA Extraktion aus der Milz gelang nur für die Wildtyp, jedoch nicht für die LAMP-2 *Knockout* Gewebe ($n=3$), was auf genotypspezifische Veränderungen im Gewebe hindeutet. Die verwendeten Filtersäulen (NucleoSpin® RNAII, Macherey-Nagel) wurden durch das Auftragen der lysierten Organhomogenate dunkel verfärbt und in den eluierten Proben konnte keine RNA detektiert werden. Aus diesem Grund waren keine vergleichenden Analysen der mRNA-Niveaus von HRG-1 in Milzgeweben möglich.

3.10 Histologischer Vergleich von Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Milzen

Die funktionelle Bedeutung von HRG-1 als Hämexporter für die Erythropoese sowie den Erythrozytenabbau wurde von White *et al.* (2013) beschrieben. Aufgrund der zentralen Bedeutung der Milz im Recycling von Häm aus seneszenten Erythrozyten, sowie den Unterschieden innerhalb des HRG-1 Proteingehalts zwischen Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Milzlysaten, wurde die generelle Morphologie und die Verteilung von HRG-1 innerhalb des Organs untersucht.

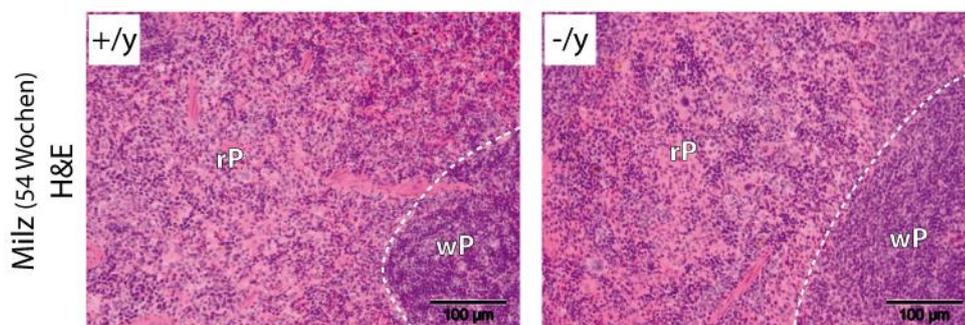


Abb. 36: Morphologie der Milz in Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Tieren. Es wurden 10 µm dicke Milz *free-float*-Schnitte (2.2.6.1) von 54 Wochen alten Tieren mit Hamatoxylin & Eosin (2.2.6.2) gefärbt ($n=5$). rP= rote Pulpa, wP= weiße Pulpa. Messbalken entspricht 100 µm.

Eine Hamatoxylin & Eosin-Färbung in *free-float*-Schnitten von 54 Wochen alten Tieren zeigte keine offensichtlichen Unterschiede im Aufbau und der Zellverteilung zwischen Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Milzen (Abb. 36).

3.10.1 Erhöhte HRG-1 Niveaus in LAMP-2 *Knockout* Splenozyten

Zur präziseren Bestimmung einzelner Zelltypen über die Ko-Lokalisation mit Markerproteinen wurden Immunfluoreszenzaufnahmen der Milz erstellt.

In 10 µm dicken *free-float*-Schnitten der Milz zeigte die HRG-1 Färbung mit Hilfe des α-HRG-1 Antikörpers ein Signal in der roten Pulpa (Abb. 38 a, b). Anders als die im Western Blot beobachteten Proteinsignale (Abb. 34) vermuten ließen, zeigten die LAMP-2 *Knockout* Gewebe eine deutlich stärkere Signalintensität, als die korrespondierenden Wildtyp Schnitte des gleichen Bereichs (Abb. 37; Abb. 38 a, b). Hierbei war kein genereller, homogener Anstieg des HRG-1-Signals über die gesamte Schnittfläche zu beobachten, sondern eine Signalzunahme in einzelnen vergrößerten Zellen (Abb. 37).

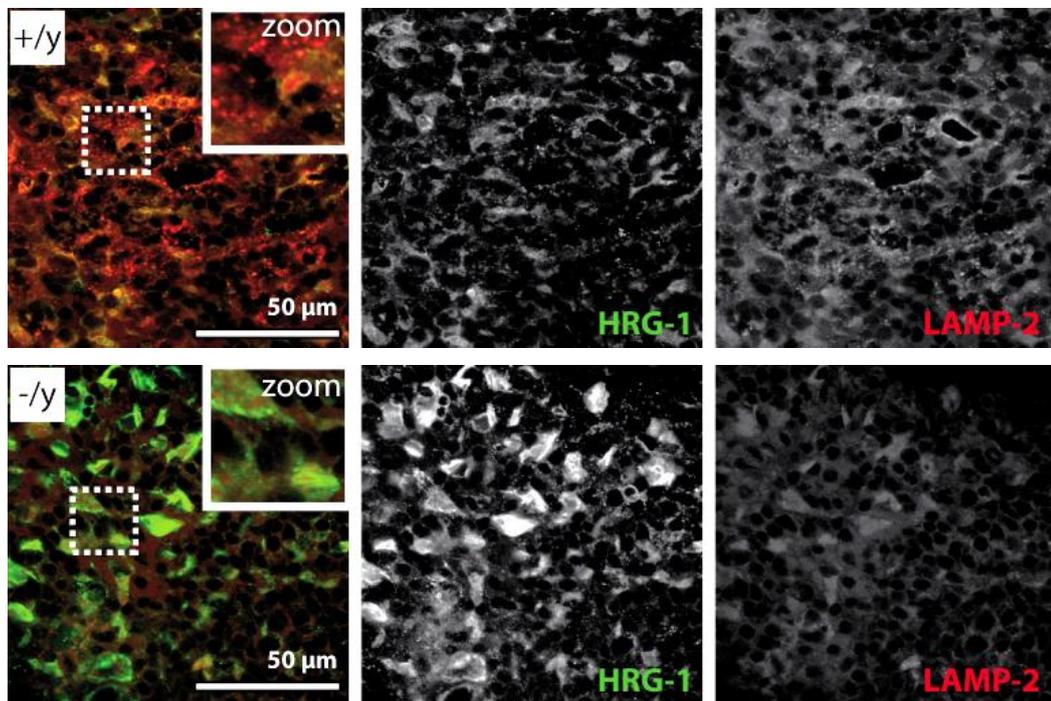


Abb. 37: HRG-1 Verteilung in Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Milzgewebeschnitten. Es wurde eine Immunfluoreszenzfärbung (2.2.3.7) in 10 µm dicken Milz *free-float*-Schnitten (2.2.6.1) gegen endogenes HRG-1 (grün) und LAMP-2 (rot) durchgeführt (n=4). Messbalken entspricht 50 µm.

Für die Charakterisierung dieser Zellen wurden zwei Makrophagenmarker verwendet. Zum einen das auf Gewebsmakrophagen und Monozyten exprimierte lysosomal assoziierte Membranprotein CD68 und zum anderen CD169, ein Marker spezifisch für die metallophilen Makrophagen im Marginalsinus der Milz. Die stark vergrößerten, HRG-1 positiven Zellen (Abb. 37) konnten teilweise mit CD68 (Abb. 38 a), nicht aber mit CD169 (Abb. 38 b) ko-lokalisiert werden. Auch schien die Anzahl CD68 positiver Zellen in LAMP-2 *Knockout* Schnitten erhöht (Abb. 38 a).

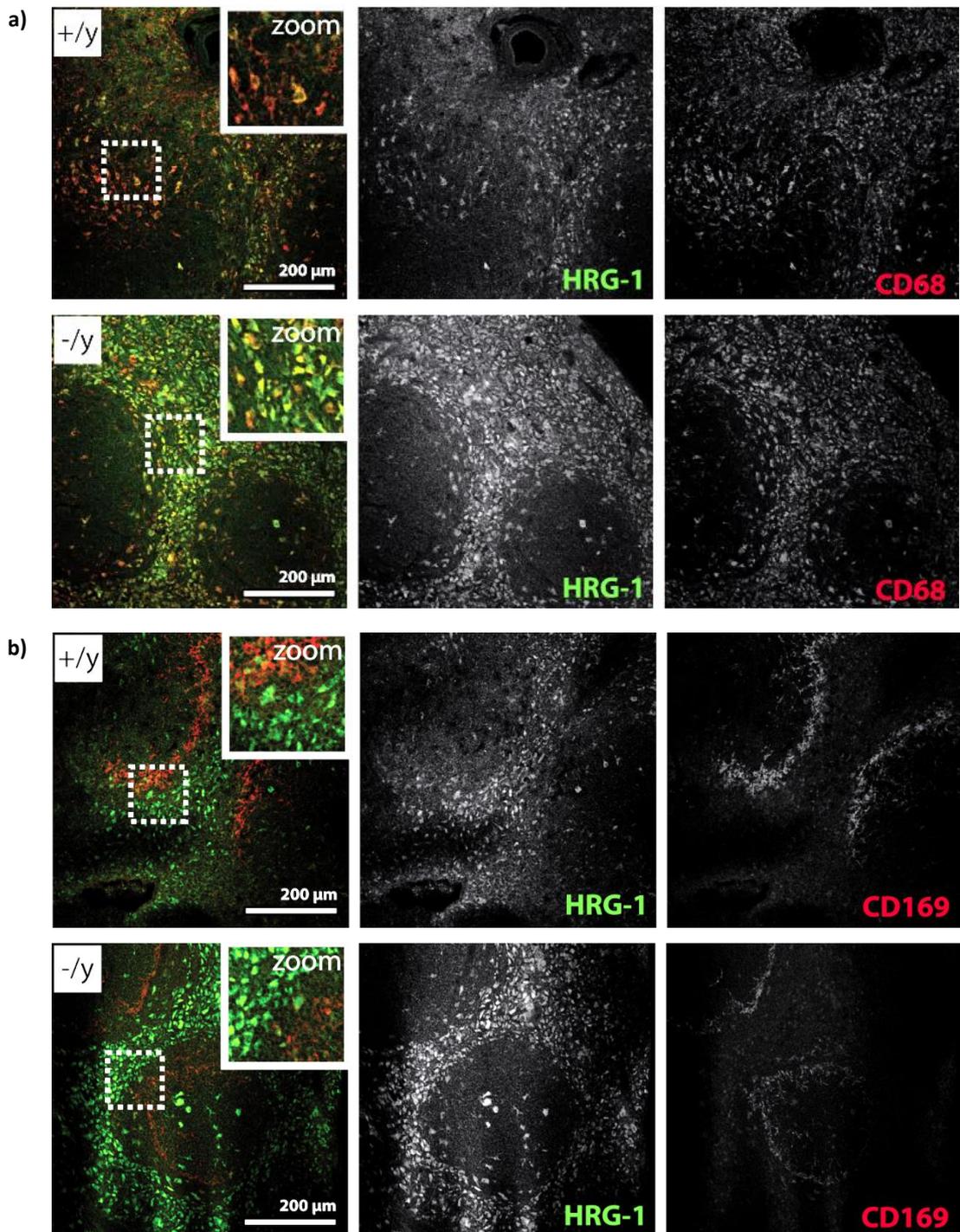


Abb. 38: Ko-Lokalisation zwischen HRG-1 und Makrophagenmarkern in Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Milzgewebeschnitten. Es wurde eine Immunfluoreszenzfärbung (2.2.3.7) in 10 µm dicken Milz *free-float*-Schnitten (2.2.6.1) gegen endogenes **a)** HRG-1 (grün) und CD68 (rot) (n=3), **b)** HRG-1 (grün) und CD169 (rot) durchgeführt (n=2). Messbalken entspricht 200 µm.

3.10.2 LAMP-2 *Knockout* führt zur Eisenakkumulation in der Milz

Die Hauptaufgabe der Makrophagen der Milz besteht in der Phagozytose seneszenten Erythrozyten, welche von der Freisetzung der zentralen Eisenionen aus den Hämoglobinproteinen gefolgt wird.

Das verstärkte HRG-1 Signal in LAMP-2 *Knockout* Geweben (3.10.1) könnte einen Hinweis auf einen veränderten Eisenstoffwechsel bzw. Hämabbau geben. Um dies zu untersuchen wurden Milzgewebe von Tieren verschiedenen Alters auf ihre Konzentration an ungebundenem Eisen (Fe^{3+}) analysiert.

Über die Berlinerblau-Reaktion nach Perls ließ sich Fe^{3+} in 13 Wochen alten Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Tieren über eine charakteristische Blaufärbung nachweisen (Abb. 39 a). Klare Unterschiede in der Färbung zwischen Wildtyp und *Knockout* Schnitten waren jedoch erst in älteren Tieren zu beobachten. 54 Wochen alte *Knockout* Tiere zeigten eine stärkere Blaufärbung einzelner Zellen (Abb. 39 b), als ihre gleichaltrigen Kontrolltiere (Abb. 39 b). Während die Eisen positiven Zellen im Wildtyp eine normale Morphologie aufwiesen, erschienen sie im LAMP-2 *Knockout* deutlich vergrößert (Abb. 39 b).

Eine über das Alter zunehmende, intrazelluläre Eisenansammlung mittels der Speicherform Hämosiderin würde dies erklären können.

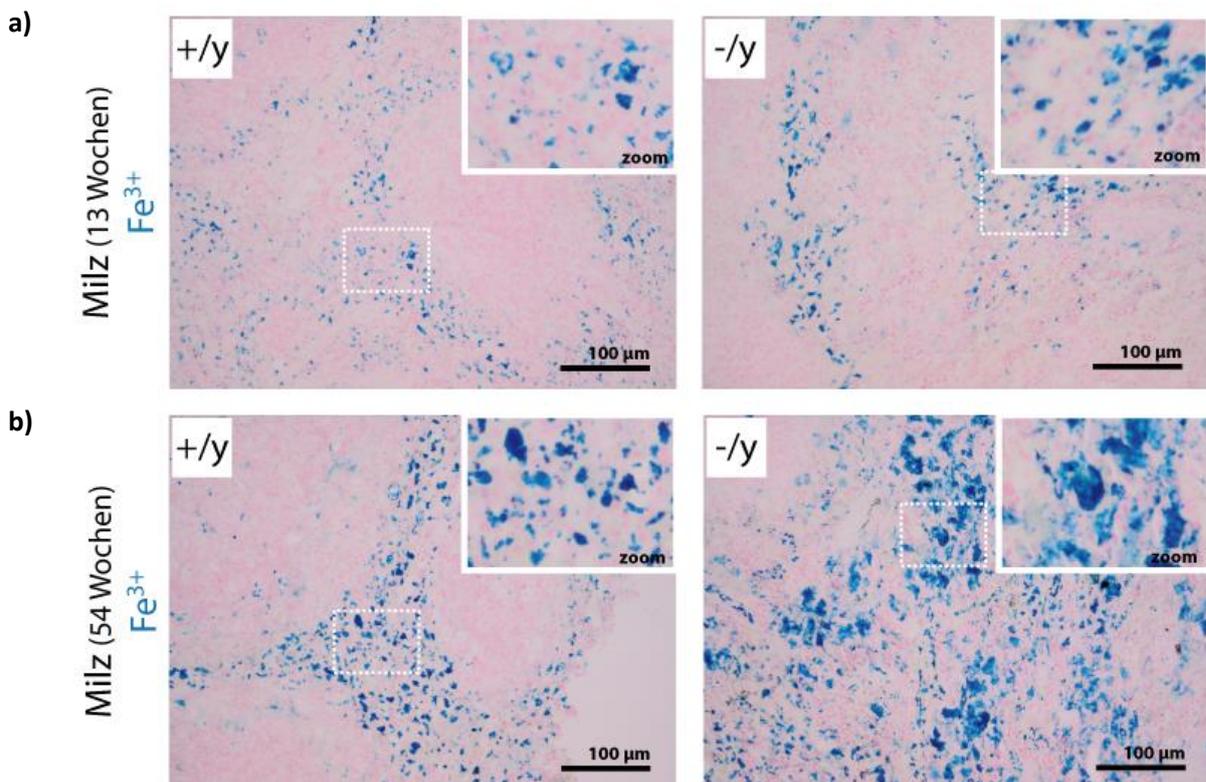


Abb. 39: Eisenablagerungen in Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Milzgewebeschnitten. Es wurden Fe^{3+} -Ablagerungen durch Berlinerblau Färbungen nach Perls (2.2.6.3) in 10 μm dicken Milz *free-float*-Schnitten (2.2.6.1) von **a)** 13 und **b)** 54 Wochen alten Tieren nachgewiesen (n=4). Messbalken entspricht 100 μm .

3.10.3 Eisenhaltige Zellen sind HRG-1 positiv

Für die Ko-Lokalisation des HRG-1 und Fe^{3+} Signals wurde ein weiteres Nachweisverfahren genutzt. DAB-Färbungen gegen HRG-1 in Wildtyp und LAMP-2 *Knockout free-float*-Milzschnitten zeigten, wie vorherige Immunfluoreszenzuntersuchungen (Abb. 37; Abb. 38), dass die HRG-1 positiven Zellen vor

allein in der roten Pulpa lokalisiert waren (Abb. 40). LAMP-2 *Knockout* Gewebe wiesen eine intensivere Färbung auf, die mit, wie auch in der Berlinerblau-Reaktion nach Perls beobachtet (Abb. 39 b), vergrößerten Zellen einherging (Abb. 40).

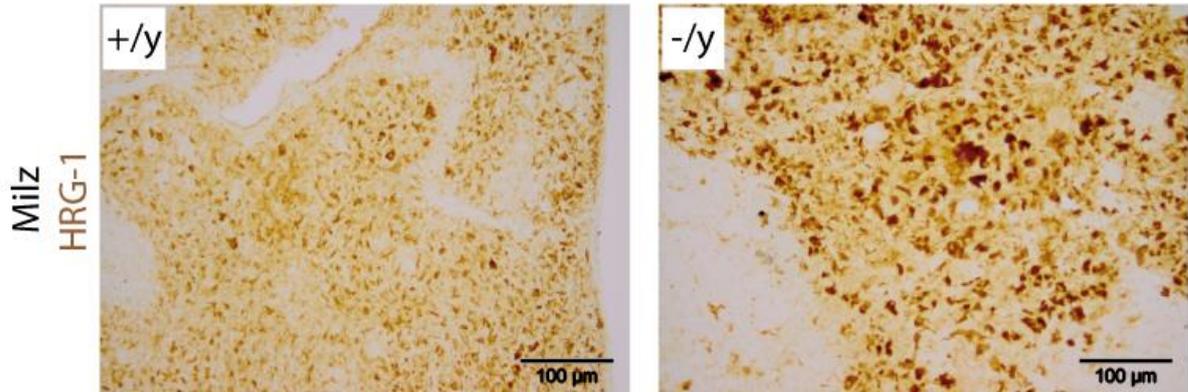


Abb. 40: HRG-1 Verteilung in Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Milzgewebeschnitten. Es wurde HRG-1 über eine DAB-Färbung (2.2.6.4) in 10 µm dicken Milz *free-float*-Schnitten (2.2.6.1) nachgewiesen (n=4). Messbalken entspricht 100 µm.

Mit Hilfe einer kombinierten immunhistologischen DAB- und Berlinerblau-Färbung nach Perls wurde eine Ko-Lokalisation der HRG-1 positiven und Fe³⁺-haltigen Zellen erreicht. Diese zeichnete sich vor allem in den LAMP-2 *Knockout* Milzschnitten ab (Abb. 41).

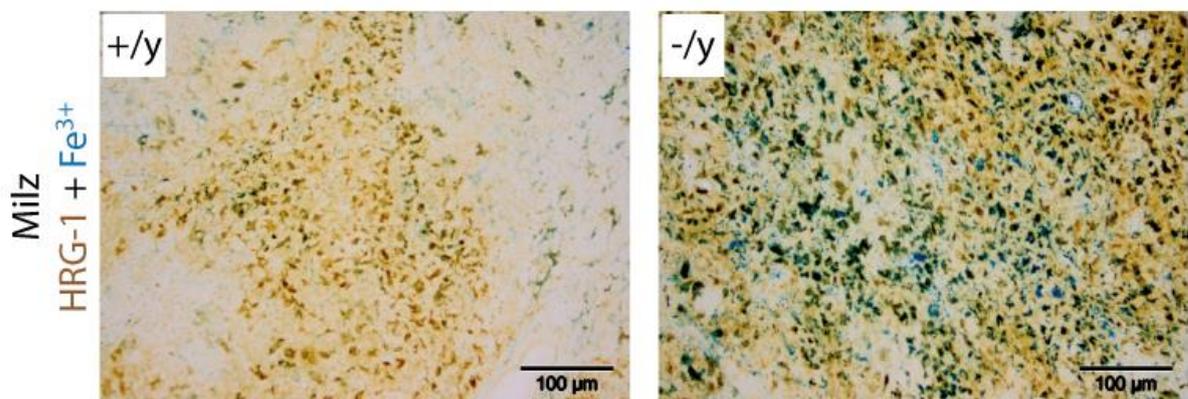


Abb. 41: Ko-Lokalisation zwischen HRG-1 und Fe³⁺-Ablagerungen in Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Milzgewebeschnitten. Es wurde HRG-1 über eine DAB-Färbung (2.2.6.4) und Fe³⁺-Ablagerungen durch eine Berlinerblau-Färbung nach Perls (2.2.6.3) in 10 µm dicken Milz *free-float*-Schnitten (2.2.6.1) nachgewiesen (n=3). Messbalken entspricht 100 µm.

3.11 Die Hämoxygenase-1 Konzentration steigt in LAMP-2 *Knockout* Milzen

Die beobachteten, erhöhten Eisenkonzentrationen (3.10.2) legen, unter Berücksichtigung der Rolle der Milz-Makrophagen im Erythrozytenabbau, die veränderte Degradation von Häm als Ursache für diesen Phänotyp nahe. Neben dem HRG-1 Proteingehalt (Abb. 34) in Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Geweben wurde daher auch das in den Hämabbau (1.2.2) involvierte Protein Hämoxygenase-1 (HO-1) untersucht, welches bei steigenden Hämkonzentrationen hochreguliert sein sollte.

Der dafür verwendete Antikörper gegen HO-1 (Tab. 4) erkennt hierbei sowohl das vollständige, über den C-Terminus ins glatte ER verankerte Protein (32 kDa), als auch das geschnittene N-terminale Fragment (NTF, 28 kDa). Das HO-1 NTF ist die enzymatisch inaktive Form des Proteins, welche als Zellantwort auf unterschiedliche Stimuli (z.B. oxidativer Stress, Schwermetalle) freigesetzt wird und in den Zellkern translozieren kann (Lin *et al.*, 2007).

In Immunfluoreszenzaufnahmen zeigten die HO-1 positiven Zellen eine ähnliche Verteilung innerhalb der roten Pulpa (Abb. 42), wie die beschriebenen HRG-1 positiven Zellen (Abb. 38).

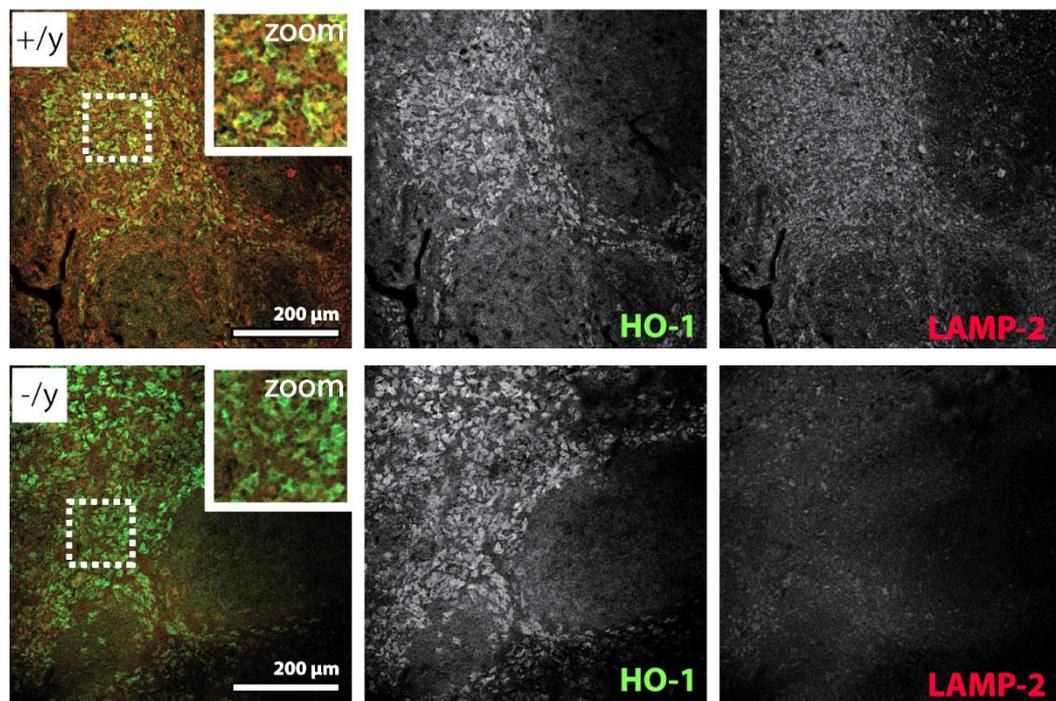


Abb. 42: HO-1 Verteilung in Wildtyp und LAMP-2 Knockout Milzgewebeschnitten. Es wurde eine Immunfluoreszenzfärbung (2.2.3.7) in 10 µm dicken Milz *free-float*-Schnitten (2.2.6.1) gegen endogenes HO-1 (grün) und LAMP-2 (rot) durchgeführt (n=3). Messbalken entspricht 200 µm.

Mit Hilfe einer kombinierten α -HO-1 DAB- und Berlinerblau-Färbung nach Perls konnten die Fe^{3+} -positiven Zellen, wie zuvor mit HRG-1 (Abb. 41), auch mit HO-1 positiven Zellen ko-lokalisiert werden (Abb. 43).

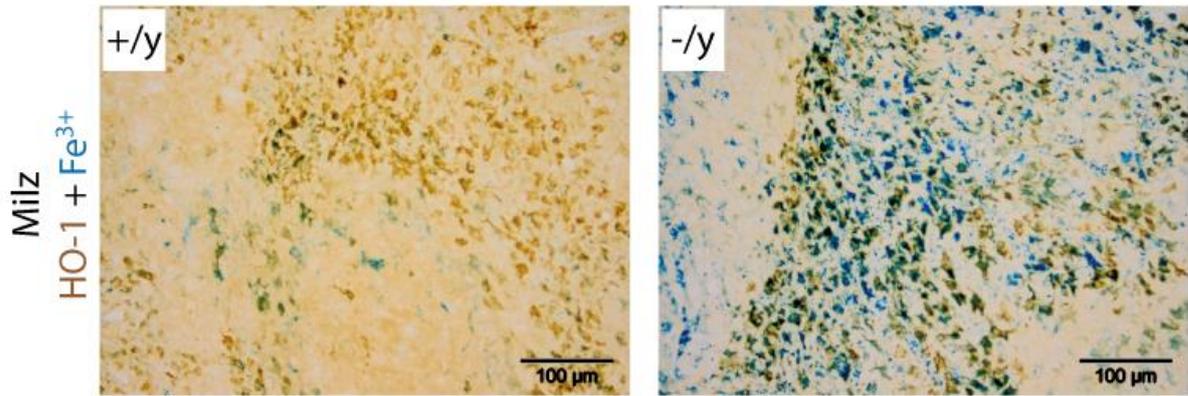


Abb. 43: Ko-Lokalisation zwischen HO-1 und Fe^{3+} -Ablagerungen in Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Milzgewebeschnitten. Es wurde HO-1 über eine DAB-Färbung (2.2.6.4) und Fe^{3+} -Ablagerungen durch eine Berlinerblau-Färbung nach Perls (2.2.6.3) in 10 µm dicken Milz *free-float*-Schnitten (2.2.6.1) nachgewiesen (n=3). Messbalken entspricht 100 µm.

Durch Western Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis HO-1 NTF zu HO-1 in LAMP-2 *Knockout* Milzen zu Gunsten des translozierenden NTFs signifikant verschoben ist (Abb. 44).

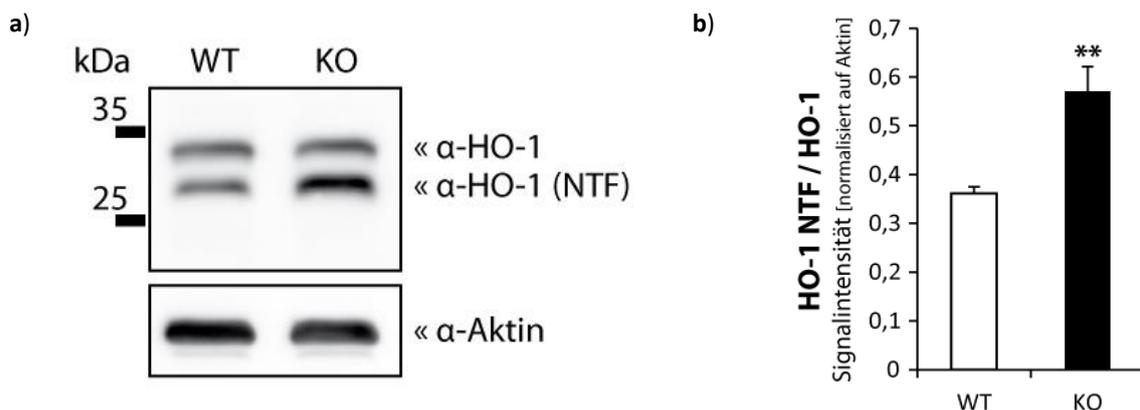


Abb. 44: HO-1 Proteinlevel in Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Milzen. a) Milzlysate (80 µg/Spur) wurden über 12,5%ige SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mittels des α -HO-1 Antikörpers. Aktin diente als Proteinladekontrolle. b) Quantifizierung der mHO-1 NTF/mHO-1 Signalintensitäten normalisiert auf Aktin mit ImageJ (n=4), (MW \pm SEM, **p \leq 0,01, ungepaarter, zweiseitiger t-Test). WT = Wildtyp; KO = *Knockout*.

3.12 Blutbilduntersuchung von Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Mäusen

Die erhöhten Eisenablagerungen in den Milzen von LAMP-2 *Knockout* Tieren (Abb. 39) ließen Veränderungen im stetigen Erythrozytenumsatz bzw. der Erythrozytenzusammensetzung vermuten. Aufgrund der niedrigen HRG-1 Proteinmengen in LAMP-2 *Knockout* Tieren (Abb. 34) und der von Rajagopal *et al.* (2008) postulierten Bedeutung von HRG-1 für die Erythropoese in *D. rerio* wurden Blutanalysen durchgeführt.

Allen für die Organpräparation getöteten Mäusen wurde intrakardial Blut entnommen, dieses in ein EDTA Röhrchen überführt und an einem XS-800i Hämatologiesystem (Sysmex) analysiert. Es wurde die Zahl der Leuko-, Erythro-, Thrombo- (PLT), Mono-, Lymphozyten, Neutro-, Eosino- und Basophilen bestimmt, sowie Hämoglobin- (HGB), Hämatokrit- (HCT), mittleres Erythrozytenvolumen (MCV),

mittleres korpuskuläres Hämoglobin (MCH), mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC), Erythrozytenverteilungsbreite (RDW-SD), Variationskoeffizient der Erythrozytenverteilungsbreite (RDW-CV), Thrombozytenvolumenverteilung (PDW), durchschnittliches Thrombozytenvolumen (MPV), und Thrombokrit (PCT) -Werte genommen.

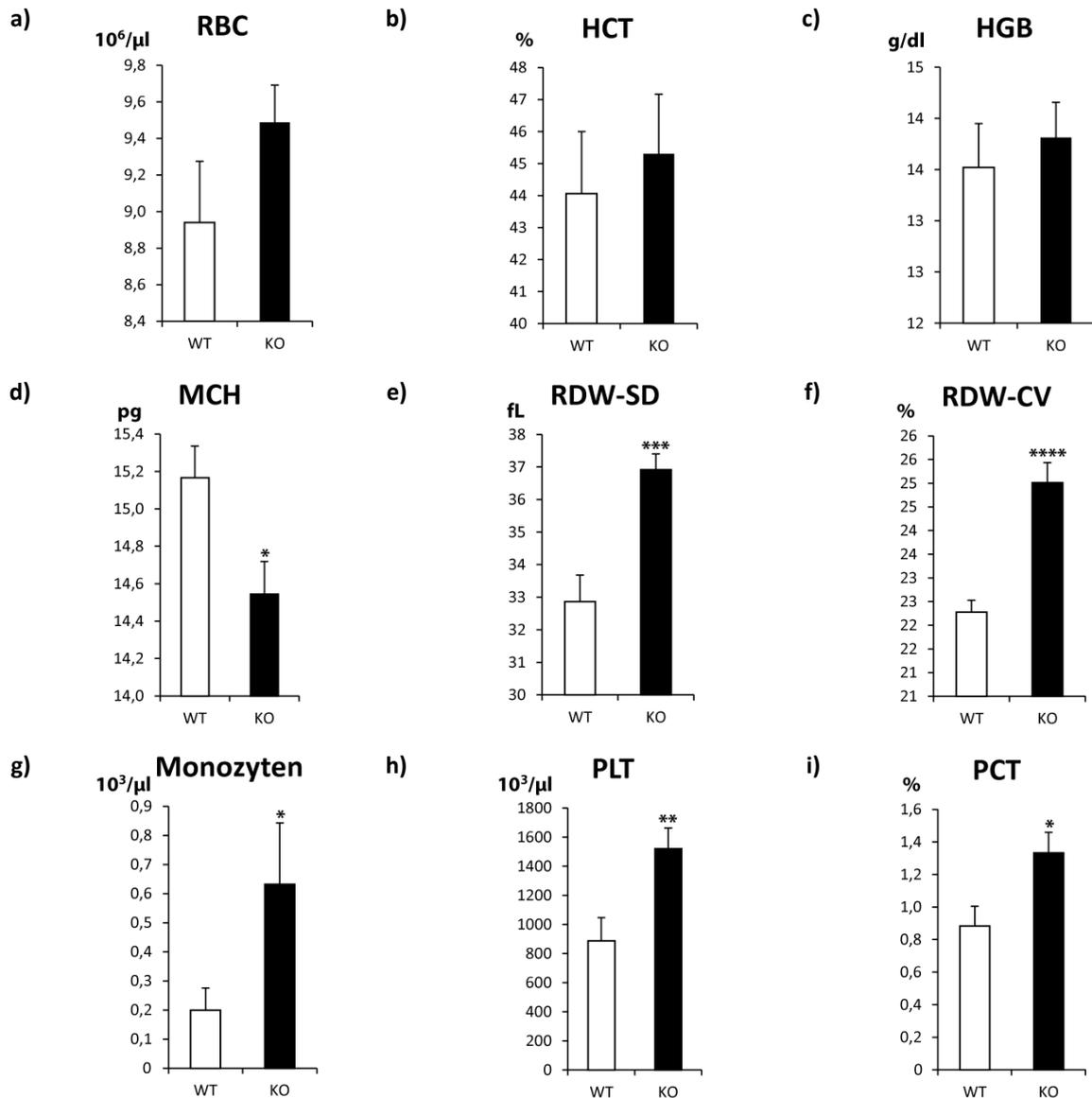


Abb. 45: Quantifizierung der Blutwerte von Wildtyp und LAMP-2 Knockout Mäusen. Die durchschnittliche **a)** Anzahl der Erythrozyten (RBC) in 10^6 Zellen/ μl (n=9), **b)** Hämatokritwert (HCT) in % (n=9), **c)** Hämoglobingehalt des Blutes (HGB) in g/dl (n=9), **d)** Hämoglobingehalt pro Erythrozyt (MCH) in pg (n=9), **e)** Variabilität der Erythrozytengröße (RDW-SD) in fL (n=9), **f)** Variationskoeffizient der Erythrozytenverteilungsbreite in % (n=9), **g)** Anzahl der Monozyten in 10^3 Zellen/ μl (WT, n=7; KO, n=9), **h)** Anzahl der Thrombozyten (PLT) in 10^3 Zellen/ μl (WT, n=8; KO, n=9), **i)** Procalcitonin (PCT) in % (WT, n=8; KO, n=9), (MW \pm SEM, ****p \leq 0,0001, ***p \leq 0,001, **p \leq 0,01, *p \leq 0,05, ungepaarter, zweiseitiger t-Test). WT = Wildtyp; KO = Knockout.

Es konnten signifikante Unterschiede im Blut von Wildtyp und LAMP-2 Knockout Mäusen festgestellt werden. Während sich die Anzahl der Erythrozyten (+6%, p=0,2; Abb. 45 a), der Hämatokritwert (+3%, p=0,7; Abb. 45 b) und der Hämoglobingehalt des Blutes (+2%, p=0,6; Abb. 45 c) zwischen

Wildtyp und *Knockout* unwesentlich unterschieden, wiesen *Knockout*-Tiere eine signifikant geringere Hämoglobinmenge pro Erythrozyt auf (MCH, 4,1%, $p=0,03$; Abb. 45 d). Hinzu kam eine signifikant erhöhte Variabilität der Erythrozytengröße (RDW-SD, 12%, $p=0,001$) und damit verbunden des RDW-CV (12%, $p=0,0001$) (Abb. 45 e, f). Ursache für eine große Varianz der Erythrozytengröße kann eine starke Retikulozytenvermehrung sein. Retikulozyten, eine Entwicklungsvorstufe der Erythrozyten, treten gehäuft bei verstärkter oder gestörter Erythropoese im peripheren Blut auf. Aus diesem Grund kann der RDW-SD als Index für Anisozytosen und zur Erkennung von Anämien genutzt werden. Trotz signifikanter Unterschiede zwischen Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Blut befanden sich die Parameterwerte jedoch noch innerhalb der beschriebenen Referenzbereiche (Hedrich und Bullock, 2004).

Sowohl Mono- (216%, $p=0,03$) als auch Thrombozytenzahlen (52%, $p=0,02$) waren in den *Knockout*-Tieren ebenfalls signifikant erhöht (Abb. 45 g, h). Die Thrombozytenzahl liegt ungefähr im Referenzbereich von $1000-2000 \cdot 10^3$ Zellen pro μl (Hedrich und Bullock, 2004), während die Monozytenzahlen im Wildtyp ($0,2 \cdot 10^3$ Zellen pro μl) und im *Knockout* ($0,6 \cdot 10^3$ Zellen pro μl) gegenüber $0,05-0,1 \cdot 10^3$ Zellen pro μl (Hedrich und Bullock, 2004) erhöht sind. Dies könnte mit der für humanes Blut optimierten Zelltyperkennung der genutzten Instrumente erklärt werden.

Ein weiterer in LAMP-2 *Knockout* Tieren signifikant erhöhter Wert ist das Procalcitonin (PCT; Abb. 45 i), welches als Entzündungsmarker bei bakteriellen Infektionen dient.

3.13 Anstieg an CD11b⁺-Zellen in LAMP-2 *Knockout* Milzen

Trotz einer generellen Herabregulation der HRG-1 Proteinmenge (Abb. 34) wurden in LAMP-2 *Knockout* Milzen einzelne, stark HRG-1-positive Zellen detektiert (Abb. 37). Diese Splenozyten ko-lokalisierten mit Fe³⁺-positiven Gewebemakrophagen (Abb. 38 a; Abb. 39).

Für die Bestimmung des relativen Makrophagenanteils unter den Splenozyten wurden durchflusszytometrische Untersuchungen unter Verwendung von CD11b (Mac-1 α), einem Oberflächenmarker für murine Makrophagen und deren Vorläuferzellen, den Monozyten, durchgeführt.

Der Vergleich von Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Milzen zeigte bei einer Aufteilung der lebenden Zellen entsprechend des Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulichts (SSC) deutliche Unterschiede in der Zellverteilung (Abb. 46). In LAMP-2 *Knockout* Milzen war eine Zellanreicherung im höher granulärem Bereich oberhalb der Lymphozytenpopulation zu beobachten. Hierbei handelte es sich zu einem großen Teil um CD11b⁺-Zellen, was möglicherweise durch Hämosiderin gefüllte Makrophagen erklärt werden könnte. Eine Gegenüberstellung der relativen, prozentualen Anzahl an CD11b⁺-Zellen wies einen signifikanten Anstieg in den LAMP-2 *Knockout* Tieren auf ($n=4$; $p=0,00006$; Abb. 47). Dies reproduziert den Anstieg an Monozyten im Blut (Abb. 45 d) nun auch in der Milz.

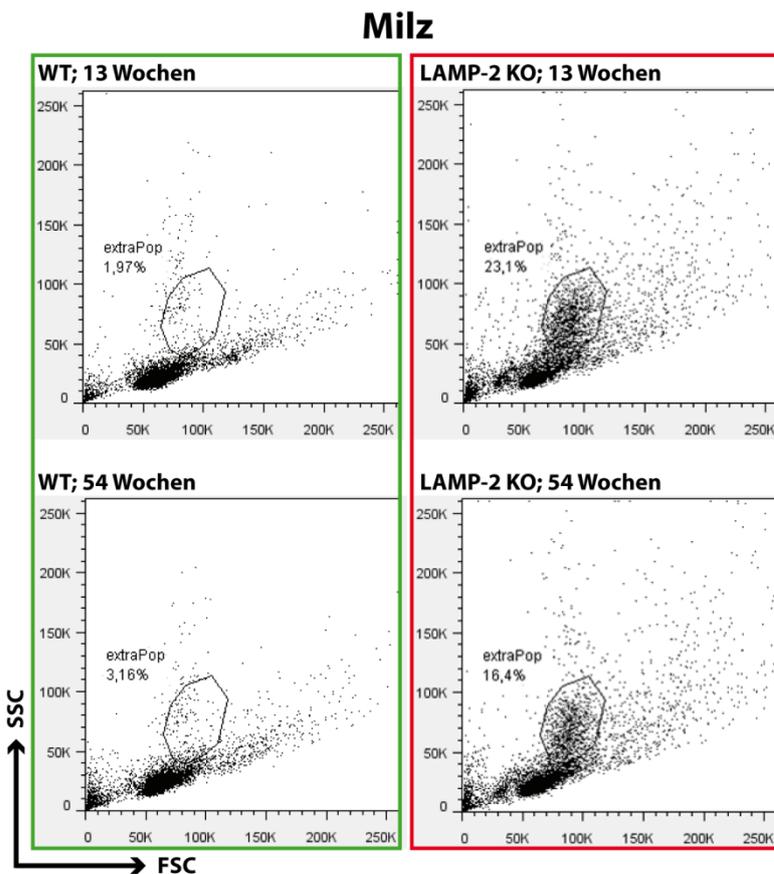


Abb. 46: Durchflußzytometrische Analyse der Splenozyten in Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Mäusen. Dot Plot Darstellung der Propidiumiodid positiven Zellen nach Auftrennung anhand des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts (n=4). WT = Wildtyp; KO = *Knockout*.

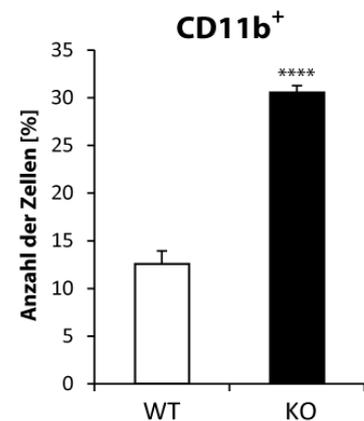


Abb. 47: Anteil der CD11b⁺-Zellen in Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Milzen. Auswertung der relativen Zellzahlen (n=4).

3.14 Erythrophagozytose durch Knochenmarkmakrophagen

Der Abbau von Erythrozyten durch Makrophagen ist der im Körper dominante Schritt im Hämatabolismus. Das Hämoglobin der phagozytierten Erythrozyten wird in Phagosomosen degradiert, um die molekularen Bestandteile wiederzuverwerten. Für den Export der Abbauprodukte aus dem Lysosom heraus werden Stoffklassen spezifische Transporterproteine in die lysosomale Membran rekrutiert (Liu *et al.*, 2012; Town *et al.*, 1998; Verheijen *et al.*, 1999). Der spezifische Anstieg von HRG-1 in der Phagosomosenmembran nach Erythrophagozytose wurde von Delaby *et al.* (2012) und White *et al.* (2013) mit dessen Rolle als Hämexporter begründet und anhand von Immunfluoreszenzversuchen belegt.

Die Abhängigkeit der Lokalisation von HRG-1 in der Phagosomosenmembran nach Erythrophagozytose und im Zusammenhang mit LAMP-2 wurde in Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Knochenmarkmakrophagen untersucht. Zur Auswertung wurde die Fluoreszenzintensität der gegen HRG-1, LAMP-2 und LAMP-1 gerichteten Antikörper am Konfokalmikroskop analysiert.

3.14.1 Phagozytose von Erythrozyten und Latexkügelchen

Im Verlauf des Erythrophagozytose-Assays wurden sowohl Erythrozyten, als auch Latexkügelchen von isolierten Knochenmarkmakrophagen aufgenommen und in den perinuklearen Bereich der Zelle transportiert (Abb. 48).

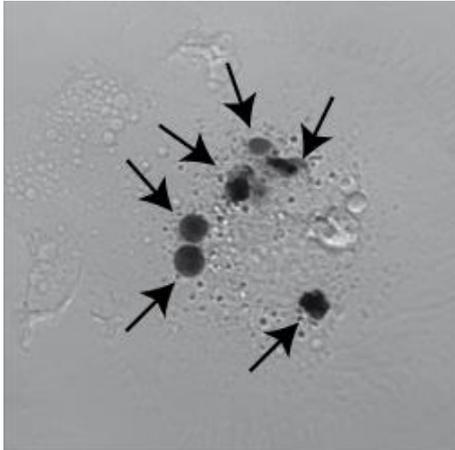


Abb. 48: Phagozytierte Erythrozyten in Knochenmarkmakrophagen im Hellfeld. Pfeile weisen auf phagozytierte Erythrozyten.

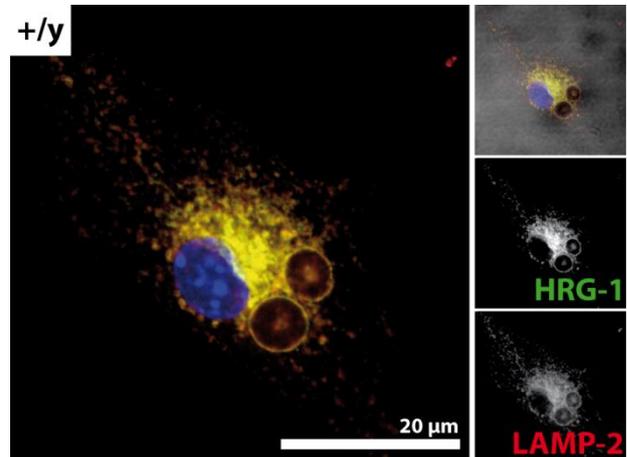


Abb. 49: Beispielhafte Darstellung phagozytierter Erythrozyten in Wildtyp Knochenmarkmakrophagen. Es wurde eine Immunfluoreszenzfärbung (2.2.3.7) gegen endogenes HRG-1 (grün), LAMP-2 (rot) und DAPI (blau) durchgeführt. Messbalken entspricht 20 μm .

Die Immunfluoreszenz zeigte eine starke Ansammlung von HRG-1 und LAMP-2 positiver Vesikel um den Nukleus herum (Abb. 49), sowie eine klare Ko-Lokalisation beider Signale in der den Erythrozyten umschließenden Membran (Abb. 49). Anders als von White *et al.* (2013) beschrieben zeigte die Phagolysosomenmembran auch nach Aufnahme von Latexkügelchen ein HRG-1 spezifisches Signal (Abb. 50). Autofluoreszenz der Latexkügelchen konnte durch nicht phagozytierte Kügelchen als Grund hierfür ausgeschlossen werden (siehe Abb. 50, weißer Pfeil).

Allerdings ließ sich vor allem die Intensität des Membransignals um Latexkügelchen durch die Änderung der Fokusebene des Mikroskops maßgeblich verändern (Abb. 50), was die gegensätzlichen Ergebnisse von White *et al.* (2013) erklären könnte.

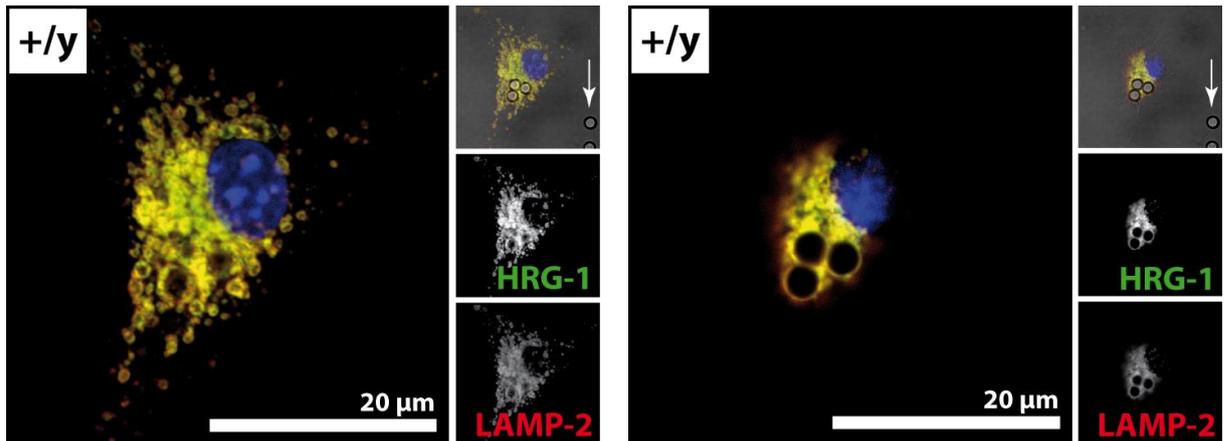


Abb. 50: Beispielhafte Darstellung phagozytierter Latexkügelchen in Wildtyp Knochenmarkmakrophagen. Es wurde eine Immunfluoreszenzfärbung (2.2.3.7) gegen endogenes HRG-1 (grün), LAMP-2 (rot) und DAPI (blau) durchgeführt. Messbalken entspricht 20 μm .

3.14.2 Fluoreszenzintensität entlang von Phagolysosomenquerschnitten

Um Häm- bzw. Erythrozyten-spezifische Veränderungen der HRG-1-Level innerhalb der Phagolysosomenmembran zu untersuchen und diese mit LAMP-2 in Verbindung zu setzen, wurden Immunfluoreszenzauswertungen in Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Makrophagen durchgeführt.

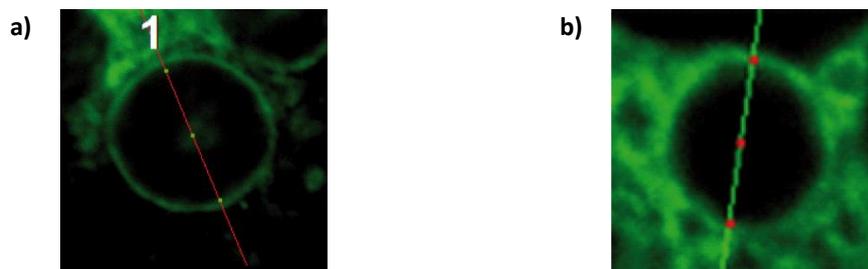


Abb. 51: Beispielhafte Darstellung der HRG-1 Fluoreszenzmessung über den a) Erythrozyten- bzw. b) Latexkügelchenquerschnitt.

Die gegen HRG-1, LAMP-2 und LAMP-1 gerichtete Fluoreszenzfärbung wurde hierbei entlang einer quer durch den phagozytierten Erythrozyten (bzw. das Latexkügelchen) gelegten Linie (Abb. 51), wie von White *et al.* (2013) beschrieben, auf ihre Intensität gemessen (Abb. 52; Abb. 53).

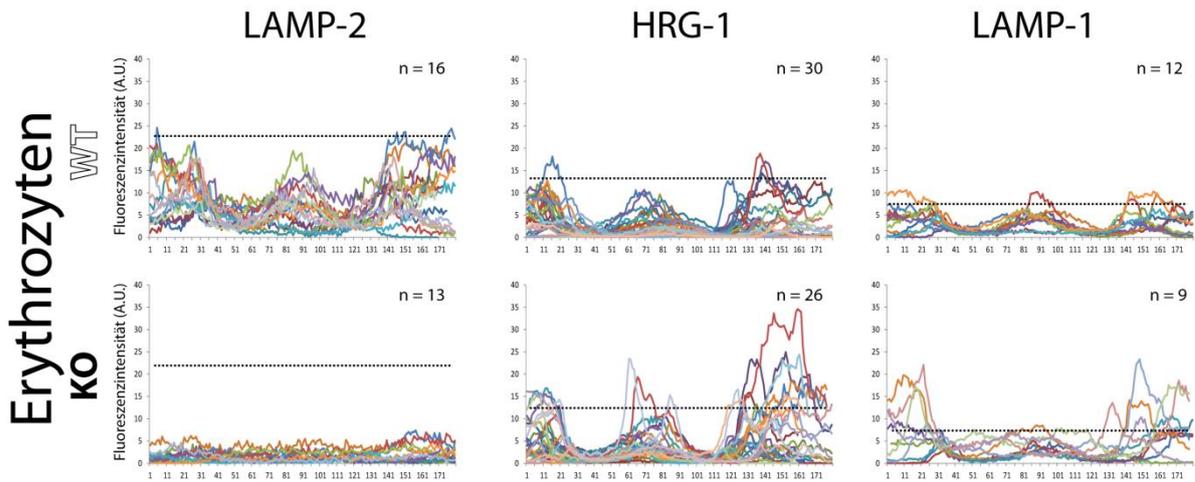


Abb. 52: Auswertung der Fluoreszenzintensität entlang eines Erythrozytenquerschnitts in Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Knochenmarkmakrophagen. Darstellung der Fluoreszenzintensität (Y-Achse) entlang der Querschnittslänge (X-Achse).

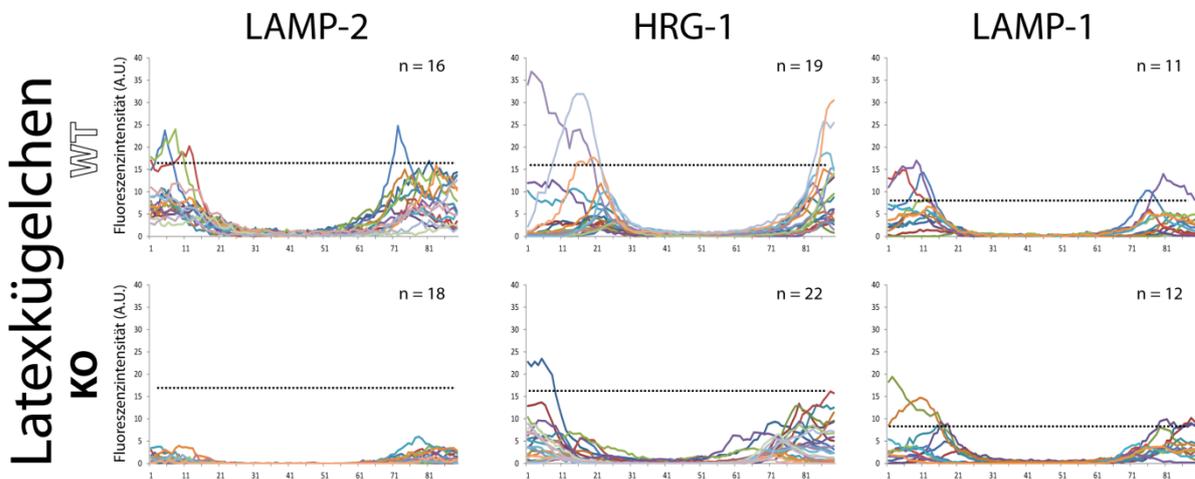


Abb. 53: Auswertung der Fluoreszenzintensität entlang eines Latexkügelchenquerschnitts in Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Knochenmarkmakrophagen. Darstellung der Fluoreszenzintensität (Y-Achse) entlang der Querschnittslänge (X-Achse).

Die entlang des Querschnitts gegeneinander ausgerichteten Intensitäten wurden für eine aussagekräftigere Auswertung in Teilbereiche eingeteilt. Aufgrund der morphologischen Unterschiede zwischen den bikonkaven Erythrozyten und den Latexkügelchen wurden die Bereiche A1 und A2 für Erythrozyten (Abb. 54 a; Abb. 55 a) bzw. A1, A2, R1 und R2 für Latexkügelchen (Abb. 54 b; Abb. 55 b) als Phagosomenmembran definiert.

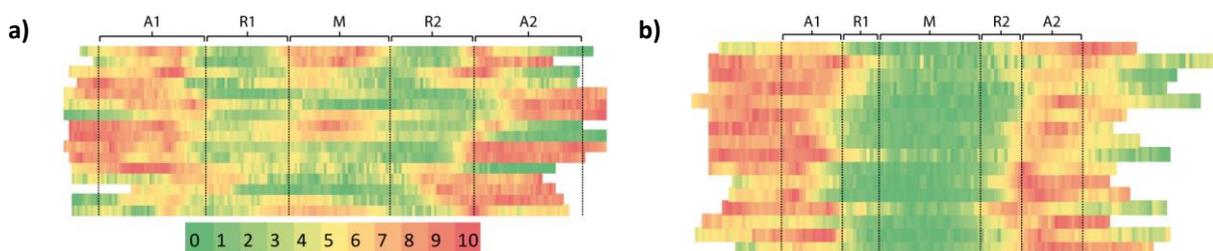


Abb. 54: Darstellung der Fluoreszenzintensitätsauswertung am Beispiel der LAMP-2-Intensität in Wildtyp Makrophagen. Nach Phagozytose von a) Erythrozyten bzw. b) Latexkügelchens. Die Fluoreszenzintensität ist farblich von niedrig (grün) nach hoch (rot) codiert.

Die Form der phagozytierten Objekte wurde durch die Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten der drei Färbungen sowohl in Wildtyp als auch in LAMP-2 *Knockout* Makrophagen auch hier widerspiegelt (Abb. 55).

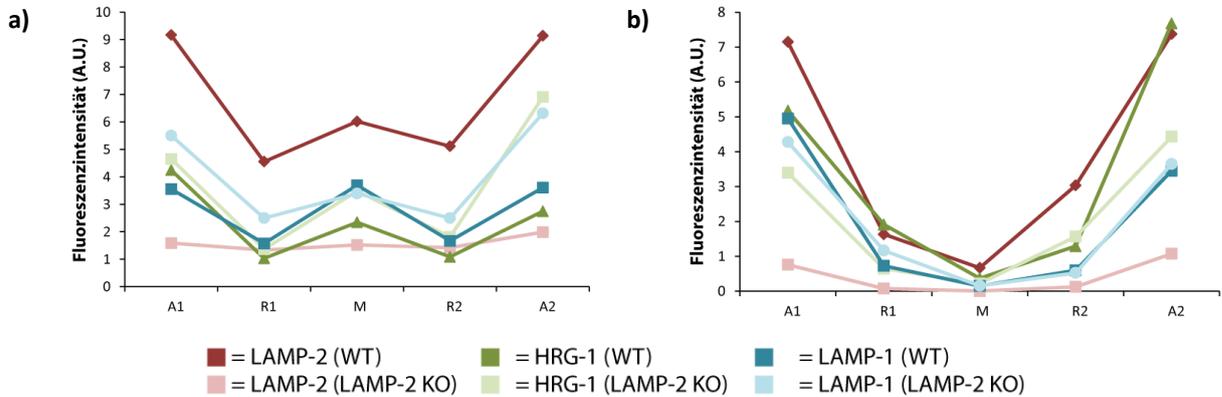


Abb. 55: Graphische Darstellung des Mittelwerts der Fluoreszenzintensität nach Einteilung in Wertebereichen (Abb. 54) nach Phagozytose von a) Erythrozyten bzw. b) Latexkügelchen. N-Zahl siehe Abb. 46 bzw. 47. WT = Wildtyp; KO = *Knockout*.

Wie zu erwarten zeigte die LAMP-2 Fluoreszenzintensität ein signifikant schwächeres Signal in LAMP-2 *Knockout* gegenüber Wildtyp Makrophagen (Abb. 56; Abb. 57). Die hier zu messende Fluoreszenz entsprach einem unspezifischen Hintergrundsignal der Zellen. Dementgegen war die Intensität des HRG-1 und LAMP-1 Signals nach Erythrophagozytose in der LAMP-2 *Knockout* Phagolysosomenmembran gegenüber dem Wildtyp signifikant erhöht (Abb. 56).

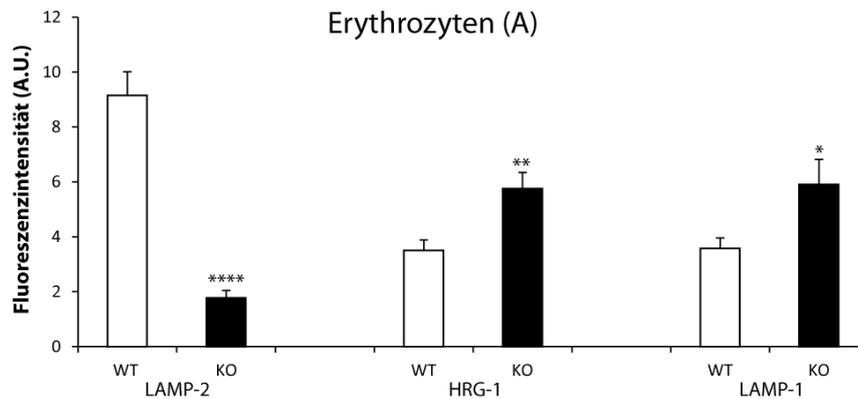


Abb. 56: Fluoreszenzintensität in Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Phagolysosomenmembranen nach Erythrophagozytose. Darstellung des Mittelwerts der in Abb. 54 a und Abb. 55 a definierten Bereiche A1 und A2. LAMP-2 WT (n=16) KO (n=13), HRG-1 WT (n=30) KO (n=26), LAMP-1 WT (n=12) KO (n=9) (MW \pm SEM, **p \leq 0,0001, **p \leq 0,01, *p \leq 0,05, ungepaarter, zweiseitiger t-Test). WT = Wildtyp; KO = *Knockout*.**

Das HRG-1 Signal der LAMP-2 *Knockout* Membran zeigte nach Phagozytose von Latexkügelchen ein schwächeres Signal als im Wildtyp (Abb. 57) während die Intensität von LAMP-1 zwischen Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* unverändert blieb (Abb. 57).

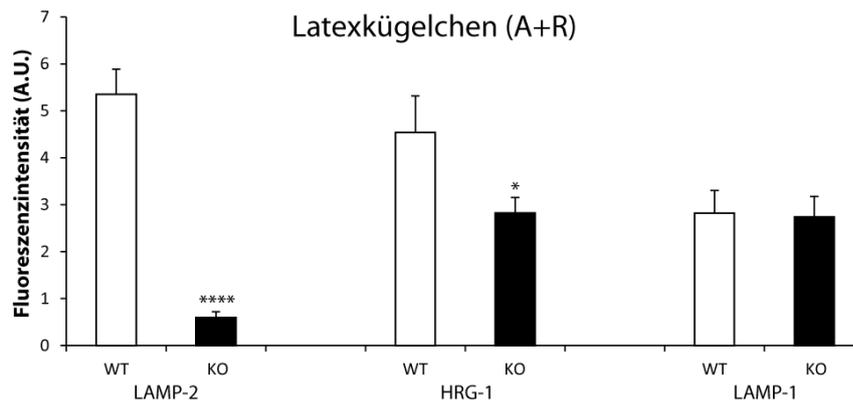


Abb. 57: Fluoreszenzintensität in Wildtyp und LAMP-2 Knockout Phagozytosenmembranen nach Phagozytose von Latexkügelchen. Darstellung des Mittelwerts der in Abb. 54 b und Abb. 55 b definierten Bereiche A1, A2, R1 und R2. LAMP-2 WT (n=16) KO (n=18), HRG-1 WT (n=19) KO (n=22), LAMP-1 WT (n=11) KO (n=12) (MW \pm SEM, **** $p \leq 0,0001$, * $p \leq 0,05$, ungepaarter, zweiseitiger t-Test). WT = Wildtyp; KO = Knockout.

3.14.3 Fluoreszenzintensität entlang der Phagozytosenmembran

Die Definition der phagozytosenmembran anhand der von White *et al.* (2013) vorgeschlagenen Querschnittlinien erwies sich als nicht zufriedenstellend. Zusätzlich erfuhr die Zelle aufgrund der starken Ansammlung von Vesikeln um den Nukleus in diesem Bereich eine starke Volumenzunahme. Dies bedingte für die Fluoreszenzauswertung technische Probleme in der Wahl der Fokusebene. Für einen genaueren Vergleich der Fluoreszenzintensität innerhalb der Phagozytosenmembran wurden neben dem Querschnittsprofil (3.14.2) zusätzliche Messungen entlang der gesamten, den Erythrozyten umschließenden, Membran vorgenommen (Abb. 58).

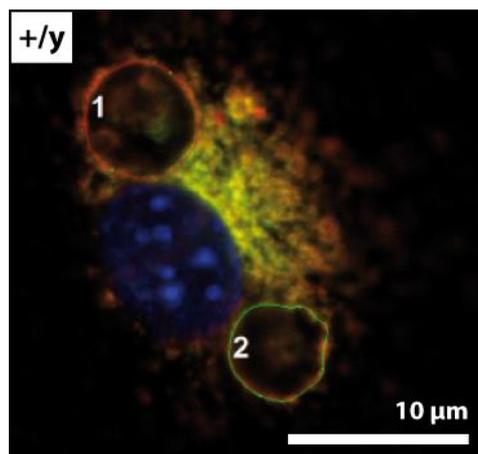


Abb. 58: Representative Darstellung der Fluoreszenzauswertung entlang der phagozytosenmembran in Wildtyp Knochenmarkmakrophagen. Es wurde eine Immunfluoreszenzfärbung (2.2.3.7) gegen endogenes HRG-1 (grün), LAMP-2 (rot) und DAPI (blau) durchgeführt. Messbalken entspricht 10 μm .

Unterschiede in der Fluoreszenzintensität/ μm wurden zwischen Wildtyp und LAMP-2 Knockout Makrophagen für LAMP-2, HRG-1, LAMP-1 und CD68 verglichen. Aufgrund des LAMP-2 Verlusts zeigten die Knockout Makrophagen, wie zu erwarten, in der LAMP-2-Färbung lediglich ein unspezifisches Hintergrundsignal, welches 16% der Wildtyp Fluoreszenzintensität entsprach

(Abb. 59). Das HRG-1 Signal war um 36%, das LAMP-1 Signal um 70% im LAMP-2 *Knockout* signifikant erhöht (Abb. 59). Dies validiert die Ergebnisse der Querschnittsuntersuchungen (Abb. 56).

Dem gegenüber zeigte das lysosomale Membranprotein CD68 eine im Durchschnitt um 44% schwächere Fluoreszenzintensität im LAMP-2 *Knockout*, was gegen einen generellen Anstieg von lysosomalen Membranproteinen spricht (Abb. 59).

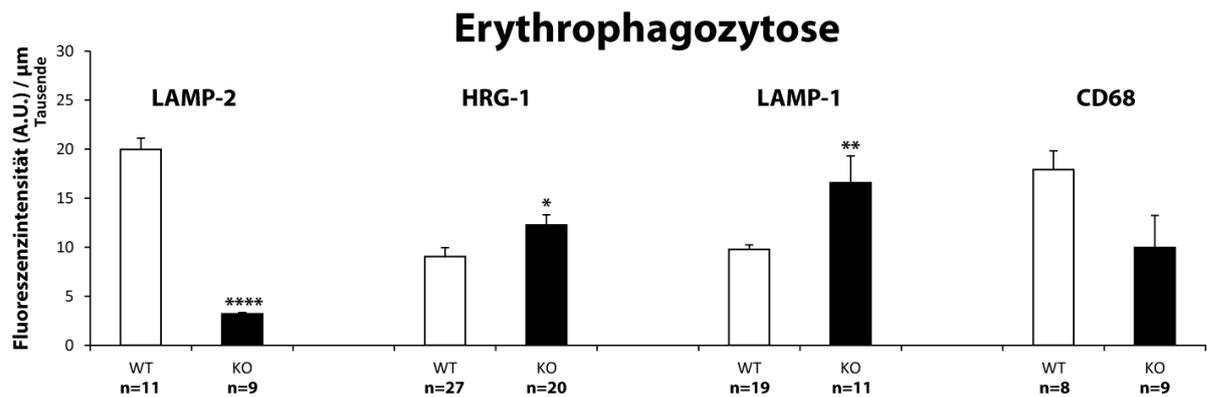


Abb. 59: Fluoreszenzintensität pro Mikrometer Erythrophagosomenmembran in Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Makrophagen. (MW \pm SEM, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,0001$, ungepaarter, zweiseitiger t-Test). WT = Wildtyp; KO = *Knockout*.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden über *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screens* neue Interaktionspartner für das lysosomal-assoziierte Membranprotein 2 (LAMP-2) gesucht, um über diese Rückschlüsse auf bislang unbekannte Funktionen von LAMP-2 und der Isoformen von LAMP-2 in der Zelle zu gewinnen.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde der Einfluss von LAMP-2 auf die Expression des als neuen Interaktionspartner identifizierten Proteins HRG-1 und den damit verbundenen Eisen- und Hämstoffwechsel untersucht.

4.1 Neue Interaktionspartner von LAMP-2

Obwohl das LAMP-2 Protein mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern, die gegen die lysosomale Membran gerichtet waren, bereits vor fast 30 Jahren zum ersten Mal beschrieben wurde (Chen *et al.*, 1985), sind bis heute nur zwei Interaktionspartner identifiziert worden. Hierbei handelt es sich um den lysosomalen Peptidimporter TAPL (Demirel *et al.*, 2012) und um GFAP, einen Stabilisator der Chaperon-vermittelten Autophagie (Bandyopadhyay *et al.*, 2010).

Das für die Danon Erkrankung verantwortliche LAMP-2 Protein (Nishino *et al.*, 2000) besitzt drei Isoformen, welche sich in ihrem C-Terminus und Expressionsmuster innerhalb verschiedener Gewebe unterscheiden (Konecki *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 1985).

Der Phänotyp der Danon Erkrankung ist vor allem mit der Skelett- und Herzmuskulatur assoziiert, in der eine Akkumulation von autophagozytotischen Vesikeln beobachtet wird (Danon *et al.*, 1981; Nishino *et al.*, 2000). Trotz des Fehlens dieser Vesikel im Gehirngewebe spielen LAMP-2 Mutationen auch hier eine entscheidende Rolle, was durch die geistige Retardierung von betroffenen Patienten belegt ist (Boucek *et al.*, 2011). Als Modell der Danon Erkrankung werden LAMP-2 *Knockout* Mäuse genutzt, da sie bei einer näheren pathologischen Charakterisierung der Symptome ebenfalls die typische Akkumulation von autophagozytotischen Vesikeln in Myozyten und vielen weiteren Organen wie Leber, Niere und Pankreas zeigen (Saftig *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2000). Das Auftreten der Vesikel wurde durch eine verzögerte Maturierung von Autophagosomen hin zu Autophagolysosomen während der Makroautophagie begründet (Eskelinen *et al.*, 2002). In Wildtypzellen kommt es während dieser Maturierung durch Fusionsprozesse mit LAMP-2-tragenden Lysosomen zur schrittweisen Anreicherung spezifischer lysosomaler Enzyme und Membranproteine. Mit Hilfe von quantitativer Elektronenmikroskopie und Immunfluoreszenzversuchen, bei denen die Größe und Membranzusammensetzung der Vesikel von Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Zellen verglichen worden

sind, konnte eine Verzögerung dieses Prozesses nach LAMP-2 Verlust beobachtet werden (Eskelinen *et al.*, 2002; Huynh *et al.*, 2007; Jäger *et al.*, 2004).

Ein funktioneller Zusammenhang zwischen LAMP-2 und der Skelett- und Kardiomyopathie bei Patienten mit der Danon Erkrankung lässt sich durch eine eingeschränkte Kontraktilität und Flexibilität der Muskelzellen aufgrund der Akkumulation von autophagozytotischen Vesikel erklären. Da sich bisher keine akkumulierten, autophagozytotischen Vesikel in Nervenzellen beobachten ließen (Furuta *et al.*, 2013) sind die neuronalen Symptome der Patienten jedoch unerklärt. Ein Grund für das Ausbleiben einer Akkumulation solcher Vesikel in Nervenzellen könnte die Synthese zusätzlicher, zelltyp-spezifischer Proteine im Gehirn sein, welche, ähnlich wie für LAMP-1 vermutet, die Effekte der Deletion von *lamp-2* kompensieren. Zum anderen ließe sich die ausbleibende Akkumulation vielleicht durch die unterschiedliche Gewebeverteilung der LAMP-2 Isoformen und deren Assoziation mit verschiedenen Autophagieformen erklären. So reichen Mutationen der LAMP-2B Isoform, welche hauptsächlich in Myozyten beschrieben ist (Konecki *et al.*, 1995), für die Akkumulation makroautophagozytotischer Vesikel aus (Nishino *et al.*, 2000). LAMP-2A ist demgegenüber für die Chaperon-vermittelte Autophagie essenziell (Cuervo und Dice, 2000), von der viele Substrate mit Erkrankungen des Gehirns verbunden sind (Bandyopadhyay und Cuervo, 2007; Cuervo *et al.*, 2004; Xilouri *et al.*, 2013).

Unterschiede in der Akkumulation autophagozytotischer Vesikel zwischen den Organen könnten demnach von der Aktivität der verschiedenen Autophagiearten in den jeweiligen Geweben herrühren. Da die Assoziation der jeweiligen LAMP-2 Isoformen mit unterschiedlichen Autophagieformen ein isoform-spezifisches Interaktom der Proteine vermuten lässt, wurde in der vorliegenden Arbeit nach spezifischen Interaktionspartnern der LAMP-2 Isoformen gesucht.

4.1.1 HRG-1 als Interaktionspartner von LAMP-2B im *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screen* identifiziert

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels eines *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screens* nach bisher unbekanntem Interaktionspartnern des lysosomalen Membranproteins LAMP-2 gesucht. Bisher sind nur zwei Interaktionspartner für LAMP-2 publiziert worden (Bandyopadhyay *et al.*, 2010; Demirel *et al.*, 2012). Ein Grund hierfür ist das Fehlen an Hochdurchsatzverfahren, die für Membranproteine geeignet sind. In den meisten Komplementierungs-Assays ist die Möglichkeit einer Translokation der interagierenden Proteine in den Zellkern Voraussetzung für einen Interaktionsnachweis. Dies setzt zum einen die Spaltung großer Proteine in kleinere Teilabschnitte voraus und ist zum anderen für Membranproteine durch deren stark hydrophobe Transmembranbereiche erschwert. Beide geschilderten Probleme wurden in dieser Arbeit durch die Verwendung des *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screens* umgangen, welcher speziell für Membranproteine entwickelt wurde (Stagljär *et*

al., 1998). Des Weiteren werden sterische Interaktionsbehinderungen durch diese Methode minimiert. Bei den an die Proteine fusionierten Ubiquitinfragmenten (Cub und NubG) handelt es sich um relativ kleine *Tags*. Dies stellt im Fall des nur 11 Aminosäuren langen, zytosolischen C-Terminus von LAMP-2 einen Vorteil dar, indem verhindert wird, dass der C-Terminus durch das *Tag* vor Interaktionspartnern verborgen/verdeckt wird.

Für die Identifizierung isoform-spezifischer Interaktionspartner erfolgten zwei vergleichende Interaktionsscreens der murinen LAMP-2A und LAMP-2B Proteine gegen eine murine cerebrale cDNA-Bibliothek.

Die Markierung des C-Terminus der LAMP-2 Plasmid-Konstrukte und die Verwendung einer N-terminal getaggten cDNA-Bibliothek begrenzt die zu findenden putativen Interaktionspartner auf zytosolische Proteine und Membranproteine mit einem zytosolischen N-Terminus.

Es wurden mit Hilfe der C-terminal getaggten mLAMP-2 Konstrukte initial je 44 (mLAMP-2A) bzw. 54 (mLAMP-2B) putative Interaktionspartner pro Isoform identifiziert. Bei diesen Treffern handelte es sich jedoch, anders als in vorhergegangenen *Screens* mit derselben cDNA-Bibliothek, zu einem Großteil nicht um reguläre Proteine, welche aus einer kompletten Proteinaminosäuresequenz, gekoppelt an das Ubiquitinfragment bestehen. Vielmehr wurden effektiv nur wenige Aminosäuren lange Peptide oder nicht codierende Intronbereiche (NCDs) als Peptidketten translatiert und an das NubG-*Tag* gebunden synthetisiert. Die Entstehung dieser Peptidsequenzen ist Folge der Generierung der cDNA-Bibliothek, bei der zufällige cDNA-Amplifikate in den Leervektor inseriert werden. Voraussetzung für die Synthese eines N-terminal getaggten Proteins ist, dass sich das NubG-*Tag* mit der später folgenden cDNA-Sequenz im gleichen Leserahmen befindet (Stagljar *et al.*, 1998). Die Verschiebung des Leserahmens hat die Synthese des NubG-Fragments gebunden an eine wahllose/unspezifische Aminosäuresequenz zur Folge. Auch die zufällige Generierung eines Stoppcodons verhindert die vollständige Synthese des NubG-getaggten Proteinkonstrukts.

Die Interaktion dieser kurzen Peptidketten mit dem *Bait*-Protein lässt unspezifische Interaktionen vermuten. Die Mutation des N-terminalen Ubiquitin-Fragments zu NubG sollte solche, transienten Interaktionen jedoch nicht nachweisen, da aufgrund der eingefügten Punktmutation (Ile13 -> Gly13 = Nubl -> NubG) die natürliche Affinität zum Cub-Fragment unterbunden ist. Diese kann nur durch die Interaktion der an sie gebundenen Proteine wieder hergestellt werden.

Eine Erklärung für die Vielzahl der Treffer, die lediglich kurze unspezifische Peptidketten kodieren, könnte mit der Rolle von LAMP-2 in der Autophagozytose zusammenhängen. Wie bereits erwähnt, kommt es bei der durch Mutationen im LAMP-2 Gen hervorgerufenen Danon Erkrankung zur Akkumulation von autophagozytotischen Vesikeln, wie sie während der Makroautophagie entstehen.

Weiterhin ist LAMP-2A als essentielles Protein der Chaperon-vermittelten Autophagie beschrieben worden (Cuervo und Dice, 2000). Beide Prozesse spielen eine entscheidende Rolle in der Beseitigung von akkumulierten und fehlgefalteten Proteinen aus dem Zytoplasma (Mizushima *et al.*, 2008). Da die Peptidfragmente keine funktionellen Proteine repräsentieren, könnten die kurzen an NubG fusionierten Peptidketten womöglich als Autophagiesubstrate erkannt werden und aus diesem Grund mit LAMP-2 interagieren. Während in der momentanen Vorstellung des Ablaufs der Makroautophagie (Mizushima und Komatsu, 2011) eine direkte Interaktion zwischen dem lysosomalen Membranprotein LAMP-2 und den in Autophagosomen lokalisierten Proteinen allerdings unwahrscheinlich ist, interagiert LAMP-2A während der Chaperon-vermittelten Autophagie direkt mit den durch ein KFERQ-ähnliches Motiv gekennzeichneten Substraten (Bandyopadhyay *et al.*, 2008). Diese Isoform-spezifische Funktion könnte sich auch in der Anzahl unspezifischer Peptidketten im mLAMP-2A (31) und mLAMP-2B (16) *Screen* widerspiegeln. Ein Sequenzvergleich der Peptidketten offenbarte jedoch keine einheitlichen Charakteristika oder Motive, welche die Erkennung der Proteine erlauben würden.

Obwohl kein Beweis für den Grund der untypischen Interaktionspartner gefunden werden konnte, sind rein technische Ursachen für ihr Auftreten nicht wahrscheinlich. Zum einen wurde dieselbe cDNA-Bibliothek bereits mit LIMP-2 und ADAM10 verwendet, ohne dass ähnliche Peptidsequenzen als putative Interaktionspartner identifiziert wurden. Zum anderen wurden mit zwei späteren *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screens* mit humanen LAMP-2A und LAMP-2B Konstrukten, gegen eine C-terminal getaggte humane cDNA-Bibliothek, ebenfalls kurze unspezifische Peptidketten als Interaktionstreffer identifiziert (Meike Kähler, unveröffentlichte Ergebnisse).

Sollten die LAMP-2 Isoformen tatsächlich hauptsächlich bei Interaktionen im Verlauf von autophagozytotischen Prozessen eine prominente Rolle für die Zelle spielen, wäre die Durchführung eines Interaktionsscreens unter Hungerbedingungen für zukünftige Studien von Interesse (Eskelinen *et al.*, 2005).

Ausgenommen der oben beschriebenen, kurzen Peptidketten und der als für diese Methode auf der Herstellerseite bereits als falsch-positiv beschriebenen Proteine (MoBiTec), verblieben 4 (mLAMP-2A) und 25 (mLAMP-2B) putative Interaktionspartner von denen die codierenden Sequenzen teilweise oder vollständig synthetisiert wurden.

Für eine anschließende, nähere Untersuchung der möglichen Interaktionen wurde die Auswahl der restlichen putativen Interaktionspartner eingeschränkt. Dies erfolgte zum einen über die Beurteilung der Wahrscheinlichkeit, dass die Proteine im endogenen System miteinander interagieren könnten. Für nukleär oder in der inneren mitochondrialen Membran lokalisierte Proteine wurde dies als unwahrscheinlich eingestuft. Zum anderen wurde auch eine positive Interaktion mit LIMP-2, einem weiteren prominenten lysosomalen Membranprotein, als Ausschlusskriterium gewählt (Anhang:

Tab. 11; Tab. 12). Zwar schließt eine Interaktion mit LIMP-2 nicht aus, dass das untersuchte Protein auch mit LAMP-2 interagiert, jedoch würde eine solche, generelle Interaktion mit lysosomalen Membranproteinen die Untersuchung der funktionellen Zusammenhänge mit LAMP-2 erschweren. Durch diese Validierung war es letztendlich möglich das lysosomale Membranprotein mHRG-1 (*heme-responsive gene 1, Slc48a1*) als einen spezifischen Interaktionspartner für mLAMP-2B zu identifizieren.

Die äußerst geringe Anzahl an spezifischen Interaktionspartnern bestätigte sich für LAMP-2A und LAMP-2B ebenfalls in einem später durchgeführten Ko-Immunopräzipitations-basiertem massenspektrometrischen *Screen* (Daten nicht gezeigt; Jäger *et al.*, 2011). In ihm wurden FLAG-getaggte LAMP-2 Isoformkonstrukte in Hek293-Zellen transient überexprimiert und anschließend über das *Tag* präzipitiert. Die ko-präzipitierten putativen Interaktionspartner wurden mittels Massenspektroskopie identifiziert. Anhand des quantitativen Wertungssystems von Jäger *et al.* konnte jedoch keiner der Treffer als besonders reproduzierbar und spezifisch eingestuft werden.

Da sich die LAMP-2 Isoformen lediglich in den letzten 46 C-terminalen Aminosäuren unterscheiden, welche die gesamte zytosolische- und Transmembrandomäne beinhalten (Fambrough *et al.*, 1988; Lewis *et al.*, 1985), wären Isoform-spezifische Interaktionspartner am wahrscheinlichsten im Zytoplasma oder der Membran zu vermuten.

4.1.1.1 Interagiert HRG-1 mit LAMP-2 über seinen C- oder N-Terminus?

Das lysosomale/spät endosomale Membranprotein HRG-1 (Rajagopal *et al.*, 2008) zeigte in *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screens* eine Isoform-spezifische Interaktion mit mLAMP-2B.

HRG-1 wurde zwei Jahre vor Beginn dieser Arbeit von Rajagopal *et al.* (2008) im Nematoden *C. elegans* näher charakterisiert und seine Funktion als Hämtransporter mittels Häm-Pulldown-, Zwei-Elektroden-Spannungsklemme- und durchflusszytometrischen *Uptake*-Versuchen beschrieben.

Wenig später publizierten O'Callaghan *et al.* (2010) Ergebnisse, die HRG-1 als Interaktionspartner der c-Untereinheit der V-Typ H⁺-ATPase, sowie eine pH-abhängige Hämbindefähigkeit zeigten. Beide Gruppen postulierten die Topologie des Proteins mit vier Transmembrandomänen. Zum einen liegen sowohl der C- als auch der N-Terminus im Zytoplasma (Abb. 61; Rajagopal *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2012) und zum anderen ist der C-Terminus extrazellulär bzw. luminal exponiert (Abb. 61; O'Callaghan *et al.*, 2010).

Die zytoplasmatische Lokalisation des N-Terminus ließ sich durch den hier durchgeführten *Split-Ubiquitin Yeast-Two Hybrid Screen* bestätigen (Abb. 60 a; Abb. 61 a), da eine Interaktion mit dem zytoplasmatischen C-Terminus von LAMP-2 und eine anschließende Freisetzung der Transkriptionsfaktoren ins Zytosol nur dort stattfinden kann (Abb. 60 a; Abb. 61 a).

Für die genauere Eingrenzung der interagierenden Proteindomänen wurde in einem weiteren *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid* Ansatz, mit Hilfe eines C-terminal getaggtten mHRG-1 Konstrukts (*Prey*), die Interaktion mit LAMP-2B und LAMP-2A (*Bait*) erneut getestet (Abb. 60 b; Abb. 61 b).

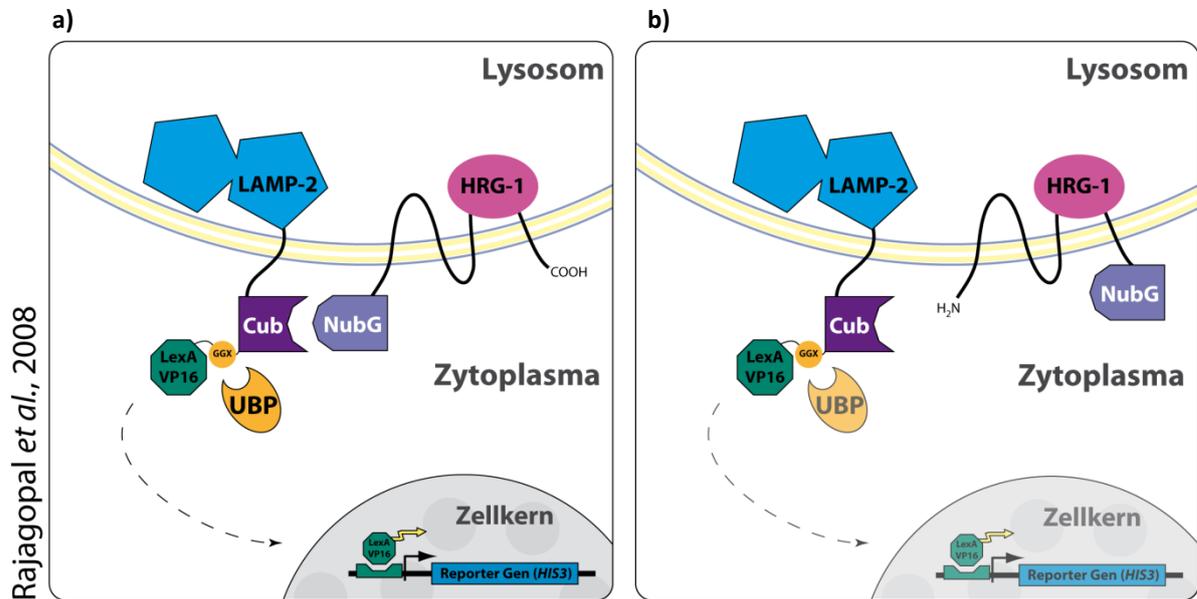


Abb. 60: Schematische Darstellung des *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid* Nachweises für die Interaktion zwischen LAMP-2B und HRG-1 unter Annahme der von Rajagopal et al. (2008) beschriebenen Topologie. Vergleich des a) N-terminal und b) C-terminal getaggtten HRG-1.

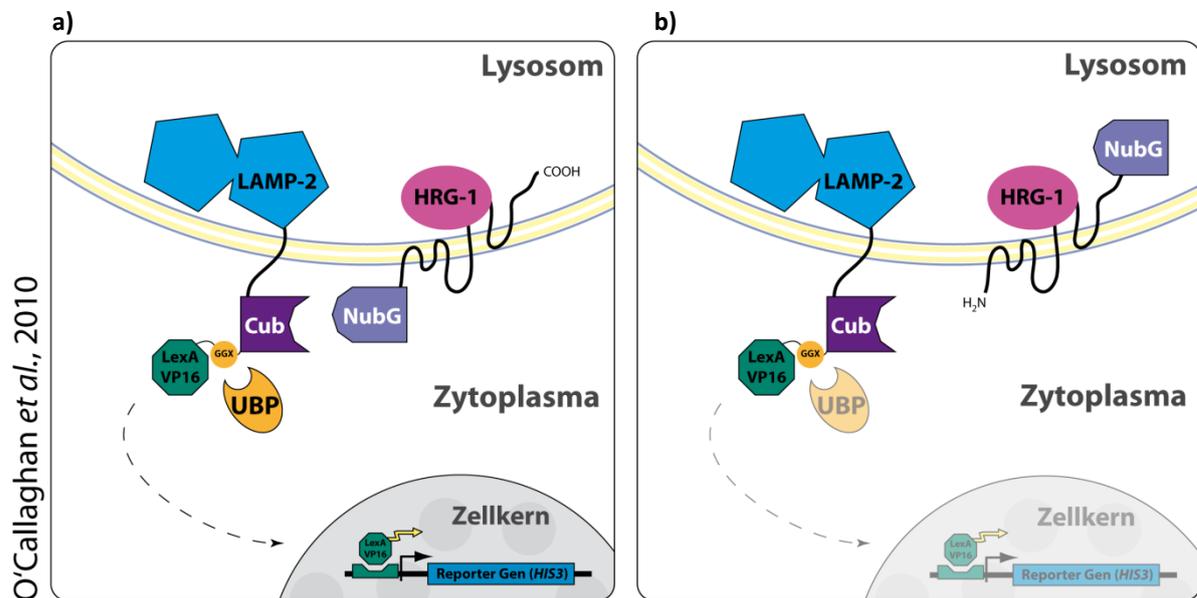


Abb. 61: Schematische Darstellung des *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid* Nachweises für die Interaktion zwischen LAMP-2B und HRG-1 unter Annahme der von O'Callaghan et al. (2010) beschriebenen Topologie. Vergleich des a) N-terminal und b) C-terminal getaggtten HRG-1.

Hierbei war mit keiner der beiden LAMP-2 Isoformen eine Interaktion nachzuweisen. Dies spricht für eine luminaire Lokalisation des C-Terminus von HRG-1, wie in dem von O'Callaghan et al. beschriebenen Topologiemodell (Abb. 61 b). Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, dass das C-terminale NubG-Fragment bei einer Interaktion zwischen LAMP-2B und dem N-Terminus von

HRG-1 für eine Ubiquitinkomplementierung lediglich räumlich zu weit vom LAMP-2B gebundenen Cub-Fragment entfernt ist (Abb. 60 a). Außerdem ist zu beachten, dass aufgrund fehlender Positiv- und Negativkontrollen in *Bait*-Vektoren, lediglich die gelungene Transformation der Hefezellen durch das Wachstum auf SC-Leu/-Trp-Selektionsplatten, nicht aber die Expression und Synthese des C-terminal NubG-getaggen mHRG-1 (*Prey*) bewiesen werden konnte. Durch die Verwendung der gleichen cDNA und auch des gleichen NubG-*Tags* ist es jedoch unwahrscheinlich, dass es nicht zur Expression des nun C-terminal getaggen Konstrukts kommt. Ein aufklärender Proteinsynthesenachweis mittels Western Blot war in Hefezellen aus technischen Gründen nicht möglich gewesen.

Während eine positive Interaktion zwischen C-terminal getaggen HRG-1 und LAMP-2B den Topologievorschlag von Rajagopal *et al.* bestätigt hätte, lässt das negative Ergebnis keine eindeutige Schlussfolgerung zu.

Mit Hilfe eines Fluoreszenztags am C-Terminus von HRG-1 könnte dessen Lokalisation im Lumen des Lysosoms untersucht werden, indem entweder ein pH-sensitives *Tag* oder ein eben solcher *Quencher* verwendet werden würde (Kimura *et al.*, 2007). Auch die Fusion des C-Terminus, über eine proteolytische Erkennungssequenz, mit einem durch lysosomale Proteasen abspaltbaren *Tag*, könnte für die Aufklärung der Topologie von HRG-1 genutzt werden.

4.1.2 Validierung der Interaktion von LAMP-2 und HRG-1 in humanen Zellen

Das artifizielle Einbringen muriner Gene und Proteine in Hefezellen kann nicht zuletzt durch deren Fehlsortierung zu falsch-positiven Interaktionsergebnissen führen.

Zwar wurden die Signalpeptidsequenzen des mLAMP-2 vorsorglich in den verwendeten *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Bait*-Konstrukten deletiert, doch bestehen grundsätzliche, morphologische Unterschiede zwischen höheren Eukaryoten und Hefen. Zwar konnten viele Transport- und Fusionsmechanismen an der Vakuole der Hefe, das den Lysosomen homologe Kompartiment, entschlüsselt und auf höhere eukaryotische Zellen übertragen werden (Armstrong, 2010), doch bleibt die artifizielle Umgebung bei der Überexpression von murinen Konstrukten bestehen.

Während in Hek293T-Zellen unter den hier gewählten Bedingungen eine Ko-Immunopräzipitation endogen exprimierter Proteine nicht möglich war, gelang es die Interaktion von überexprimiertem hHRG-1 und hLAMP-2B zu zeigen. Sowohl über HRG-1 als auch über dreifach FLAG-getaggt hLAMP-2B konnte das jeweilige andere Protein ko-präzipitiert werden. Im Vergleich zweier hLAMP-2B Konstrukte zeigte das luminal in der Hinge-Region getaggt Konstrukt eine stärkere Affinität zu hHRG-1 als das C-terminal getaggte. Dieses Ergebnis ließe sich damit erklären, dass

sterische Hinderungen, hervorgerufen durch den dreifachen FLAG-Tag am C-Terminus von hLAMP-2, die Interaktion mit hHRG-1 an dieser Stelle negativ beeinflusst. Grundsätzlich ist der Nachweis der Interaktion zweier Proteine unter endogenen Bedingungen am verlässlichsten, da erhöhte Proteinkonzentrationen nach Überexpression, sowie fusionierte Tags die tatsächlichen Bedingungen in der Zelle verfälschen können. Dies setzt jedoch spezifische Antikörper voraus, die durch die Bindung an ihr Epitop keinen Einfluss auf die Interaktion der Proteine nehmen dürfen. Außerdem ist der Nachweis schwach exprimierter, endogener Proteine durch die Vielzahl an Waschschrritten und suboptimale Pufferbedingungen erschwert.

Anders als in Hefen ließ sich die Isoformspezifität der Interaktion zwischen hHRG-1 und hLAMP-2B in Hek293T-Zellen nicht bestätigen. Neben hLAMP-2B konnten auch hLAMP-2A und hLAMP-1 über hHRG-1 ko-präzipitiert werden.

Ein Grund hierfür können die gegenüber dem *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screen* verwendeten humanen LAMP und HRG-1 Konstrukte sein. Zwar sind die N-Termini von humanem und murinem HRG-1 zu 100% homolog, doch unterscheiden sich die zytosolischen C-Termini von LAMP-2A zu 18% (2 AS) und von LAMP-2B zu 9% (1 AS) (Eskelinen *et al.*, 2005; Konecki *et al.*, 1995; Lichter-Konecki *et al.*, 1999). Ein möglicher Austausch der humanen gegen die entsprechenden murinen C-Termini in neuen Konstrukten könnte zur Klärung dieser Frage genutzt werden.

Eine weitere mögliche Erklärung ist die Formierung eines Proteinkomplexes an der lysosomalen Membran, der nur die indirekte Interaktion zwischen HRG-1, LAMP-2A und LAMP-1 zur Folge hat. Das Fehlen beteiligter Proteine in der Hefezelle würde somit die Formierung des Komplexes unterbinden und die Identifizierung dieser indirekten Interaktionspartner ausschließen. Für LAMP-2A ist die Formierung eines 700 kDa großen Homomer-Komplexes während der Chaperon-vermittelten Autophagie, über ein GxxxG-Motiv (Russ und Engelman, 2000) in der Transmembrandomäne, bereits beschrieben (Bandyopadhyay *et al.*, 2008).

4.2 HRG-1

4.2.1 HRG-1 ist in der lysosomalen Membran lokalisiert

Für die Interaktion zweier Proteine ist deren temporäre subzelluläre Ko-Lokalisation in der Zelle Voraussetzung.

Für HRG-1 wurden von Rajagopal *et al.* (2008) und O'Callaghan *et al.* (2010) jedoch lediglich Lokalisationsstudien nach Überexpression publiziert. Beide Gruppen widersprechen sich zudem gerade im Hinblick auf die lysosomale Lokalisation von HRG-1. Während Rajagopal *et al.* (2008) eine

eindeutig Ko-Lokalisation mit LAMP-1 in HEk293-Zellen zeigen, detektieren O'Callaghan *et al.* (2010) diese in MCF7-Zellen nicht.

Aufgrund des besonderen Interesses dieser Arbeit an der Interaktion zwischen HRG-1 und dem lysosomalen LAMP-2 wurde die subzelluläre Lokalisation von HRG-1 mit Hilfe von Ko-Immunfluoreszenzuntersuchungen validiert. Hierfür wurden zu Beginn der Arbeit, in Ermangelung eines HRG-1 spezifischen Antikörpers, sowohl N- als auch C-terminal getaggte HRG-1 Konstrukte verwendet, welche beide die von Rajagopal *et al.* (2008) beschriebene lysosomale Lokalisation bestätigten. Später wurde ein Peptidantikörper gegen die letzten 19 Aminosäuren des C-Terminus von HRG-1 generiert, die sich im murinen und humanen Protein nicht unterscheiden. Der Antikörper zeigte in Western Blot- und Immunfluoreszenzanalysen ein spezifisches Signal, was mit Hilfe von HRG-1 siRNA *Knockdown*-Zellen belegt werden konnte. Unter Verwendung dieses Antikörpers konnte durch Ko-Lokalisation des endogenen Proteins mit den getaggtten Konstrukten gezeigt werden, dass die verwendeten terminalen *Tags* grundsätzlich keinen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins ausübten. Lediglich eine leichte ER-assoziierte Lokalisation aller Konstrukte war gegenüber dem endogenen HRG-1 zu beobachten, was in Folge einer erhöhten Proteinsynthese als Überexpressionsartefakt nicht selten ist (Meusser *et al.*, 2005; Raden *et al.*, 2005).

Über den Einsatz zusätzlicher Markerproteine konnte die vesikuläre Lokalisation von HRG-1 im Folgenden weiter charakterisiert werden. Es wurde sowohl nach Überexpression von getaggtten Konstrukten, als auch unter Verwendung des endogenen Antikörpers für murines und humanes HRG-1 eine Ko-Lokalisation mit den lysosomalen Membranproteinen LAMP-1 und LAMP-2 gezeigt. Auch die spät endosomale Lokalisation (Rajagopal *et al.*, 2008; O'Callaghan *et al.*, 2010) wurde mit Hilfe des Markers Lyso-bisphosphatidsäure (LBPA, BMP) bestätigt (Goursot *et al.*, 2010). Zwar war keine Ko-Lokalisation zwischen dem Fluoreszenzsignal des Membranproteins HRG-1 und dem des luminal lokalisierten Lipids nachweisbar, doch erlaubte die Färbung eine klare Zuordnung beider Strukturen in dieselben Kompartimente. Dies war vor allem in den verhältnismäßig großen Vesikeln der MEF-Zellen möglich.

Die von O'Callaghan *et al.* (2010) beschriebene Ko-Lokalisation mit rezirkulierenden (TfR) und frühen (EEA1) Endosomen konnte wiederum nicht bestätigt werden. Ein Grund für diese Unstimmigkeiten könnten die verwendeten Zelllinien sein. So wurden bereits Unterschiede in der Lokalisation von HRG-1 zwischen polaren und nicht-polaren Zellen (Yanatori *et al.*, 2010), sowie eine Umsortierung von HRG-1 zur Plasmamembran in Tumorzellen (Fogarty *et al.*, 2013) beschrieben.

4.2.1.1 Die lysosomale Sortierung von HRG-1

Die Interaktion zweier Proteine muss nicht zwangsweise für deren direkte Funktion verantwortlich sein. Neben der Bildung von aktiven Proteinkomplexen wird die Erkennung und Bindung von Proteinen auch für deren Transport durch die Zelle genutzt.

Über den Vergleich von Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* MEFs konnte allerdings im „*steady-state*“ kein Einfluss von LAMP-2 auf die Lokalisation von HRG-1 detektiert werden. Zwar führte der LAMP-2 *Knockout* zu einer augenscheinlichen Vergrößerung der Lysosomen (Guhde, 1999), doch hatte dies nicht die Umsortierung von HRG-1 zur Plasmamembran oder anderen Organellen zur Folge. Gleichsam ließ der siRNA *Knockdown* von HRG-1 keinen Einfluss von HRG-1 auf die Lokalisation oder Proteinmenge von LAMP-2 erkennen. Eine Interaktion zwischen HRG-1 und LAMP-2 zur lysosomalen Sortierung, wie es für LAMP-2 und β -GC beschrieben ist (Reczek *et al.*, 2007), ist damit unwahrscheinlich.

Für den korrekten Transport von Transmembranproteinen in lysosomale und endosomale Kompartimente wurde das Vorhandensein von Tyrosin- und Di-Leucin-basierten Motiven in deren zytosolischen Domänen als ausschlaggebend beschrieben (Bonifacino und Traub, 2003).

Im C-Terminus aller drei LAMP-2 Isoformen lässt sich ein solches Tyrosin-basiertes Motiv (GYXX ϕ) finden. Auch in HRG-1 wurden zwei konservierte, putative Sortierungsmotive (YXX ϕ und D/EXXXLL) entdeckt. Da die Funktionalität der Motive einen zytosolischen C-Terminus voraussetzt, könnte ihre Lokalisation im C-Terminus des Proteins ein weiterer Anhaltspunkt für die von Rajagopal *et al.* (2008) vorgeschlagene Topologie von HRG-1 sein. Eine durch die Mutation eines solchen Motives verursachte veränderte Lokalisation hin zur Plasmamembran, wie beispielsweise für LAMP-1 beschrieben (Honing *et al.*, 1996), könnte möglicherweise in HRG-1 Funktionsanalysen und Häm-*Uptake-Assays* genutzt werden.

Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass ein erstes Deletionskonstrukt von HRG-1, dem der gesamte C-Terminus (16 AS) bis hin zur Transmembrandomäne fehlte, nicht mehr aus dem endoplasmatischen Retikulum heraustransportiert wurde. Ein Grund hierfür mag das Fehlen der putativen Sortierungsmotive sein. Da es jedoch nicht zu einer Fehlsortierung, sondern einer generellen Retention des Proteins im endoplasmatischen Retikulum kam, sind grundlegende Veränderungen der Tertiärstruktur als Ursache wahrscheinlicher (Hammond und Helenius, 1995; Meusser *et al.*, 2005). Hierfür spricht auch die Akkumulation einer weiteren HRG-1 Deletionsmutante, welcher der gesamte zytosolische N-Terminus (10 AS) fehlt.

Eine subtilere Methode für die Untersuchung der Erkennungsmotive ist die Mutation der entscheidenden Aminosäuren zu neutralen Alaninresten. Anders als die Deletion ganzer

Proteindomänen sollte dies nur geringen Einfluss auf die Tertiärstruktur des Proteins haben. Die gleichsam damit verbundene Zerstörung des jeweiligen bzw. beider putativen Sortierungsmotive bewirkte bei HRG-1 jedoch keine Fehlsortierung der jeweiligen Konstrukte. Sie waren weiterhin im Lysosom lokalisiert, womit gezeigt werden konnte, dass die lysosomale Sortierung unabhängig von beiden Motiven erhalten bleibt. Die Erkennung des Proteins anhand dieser Motive ist demnach nicht ausschlaggebend für dessen Transport innerhalb der Zelle, was einen zytosolischen C-Terminus, wie von Rajagopal *et al.* (2008) postulierte, nicht länger voraussetzt.

Über welche Mechanismen HRG-1 in die lysosomale Membran transportiert wird bleibt weiter ungeklärt. Andere bekannte Mechanismen anhand von Palmitoylierungs- (Flannery *et al.*, 2010) oder PY-Motiven, für eine Interaktion mit der Ubiquitin-Ligase Nedd4 (Pak *et al.*, 2006), sind aufgrund der Aminosäuresequenz von HRG-1 nicht möglich. Denkbar wären noch bisher unbeschriebene Motive oder die Interaktion mit einem weiteren lysosomalen Protein, welches als eine Art Shuttle fungiert (Schuske *et al.*, 2007).

4.2.2 HRG-1 wird N-terminal prozessiert

In Western Blot Analysen war nach Überexpression von sowohl humanen, als auch murinen HRG-1-Konstrukten eine zusätzliche, HRG-1-spezifische Bande (circa 14 kDa) zu detektieren.

Da sich das Signal in derselben Probe mit gegen den C-Terminus, nicht aber gegen den N-Terminus gerichteten Antikörpern nachweisen ließ, wurde vermutet, dass es sich um ein C-terminales Fragment (CTF) von HRG-1 handelt. Es zeigte sich, dass das CTF in Western Blot Analysen die gleiche Größe wie das Deletionskonstrukt von HRG-1 hat, welchem der gesamte N-Terminus (10 AS) fehlt. Aus diesem Grund wurde postuliert, dass eine proteolytische Spaltung des N-Terminus für die Entstehung des CTF verantwortlich ist. Anders als posttranslationale Modifikationen wie die Phosphorylierung ist die hydrolytische Spaltung von Proteinen durch Proteasen irreversibel. Neben den sauren Proteasen der Lysosomen, deren proteolytische Aktivität dem Abbau von Proteinen dient, kann diese Art der Prozessierung genauso zur Aktivierung/Maturierung von zuvor inaktiven Proteinen führen (Edwards *et al.*, 2008). Die Spaltung eines Proteins vermag zudem, über die Translokation der entstandenen Peptidfragmente in den Zellkern, sowohl die Genexpression beeinflussen, als auch zur Regulation von Signaltransduktionswegen im Zytoplasma genutzt werden (Ehrmann und Clausen, 2004).

Die Detektierung des N-terminal getaggtten HA-HRG-1 NTFs war bisher mittels Western Blot nicht möglich. Dies ist höchstwahrscheinlich auf die geringe Größe des Fragments zurückzuführen. Die Klonierung eines zum Beispiel N-terminal GFP-getaggtten HRG-1 Konstrukts könnte, durch die erhebliche Vergrößerung des HRG-1 NTFs, einen Nachweis per Western Blot ermöglichen und zum

anderen in Immunfluoreszenzversuchen genutzt werden, um den Verbleib des NTFs weiter zu untersuchen.

Unter Berücksichtigung des *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screens*, welcher die Interaktion zwischen LAMP-2 und dem N-Terminus von HRG-1 nahelegt, könnte die Generierung des CTFs der Steuerung dieser Interaktion dienen. Zur Bestätigung dieser Hypothese wären Untersuchungen über den Einfluss von LAMP-2 auf die Entstehung des CTFs von Interesse.

Einen Hinweis auf ein für die Prozessierung verantwortliches Enzym konnte durch die Analyse der HRG-1 Aminosäuresequenz mit Hilfe der MEROPS Datenbank nicht gewonnen werden, da keine bekannten Erkennungsmotive für eine proteolytische Spaltung gefunden wurden. Allerdings konnte in ersten Versuchen durch die Inhibierung verschiedener Proteasen und genereller Degradationsprozesse der Zelle gezeigt werden, dass die Verwendung des Cysteinproteaseinhibitors EST bei gleichbleibender HRG-1 Synthese ein vermindertes CTF Signal zur Folge hat.

Eine ähnliche Beobachtung konnte ebenfalls durch die Erhöhung des lysosomalen pH-Werts und deren damit verbundene, gestörte enzymatische Aktivität, mittels Ammoniumchlorid (NH_4Cl) (Gonzalez-Noriega *et al.*, 1980) erzielt werden. Doch während EST ausschließlich die Entstehung des HRG-1 CTFs beeinflusste, führte Ammoniumchlorid zusätzlich zur Herabregulation des nicht prozessierten HRG-1 Proteins. Dieser Effekt wurde auch durch den Proteasominhibitor MG132 erreicht, welcher einhergehend mit apoptotischen Prozessen (Jullig *et al.*, 2006) durch die Inhibierung dieser wichtigen Zellfunktionen wahrscheinlich vielmehr einen generellen Proteinabbau in den Zellen widerspiegelt. Diese generelle HRG-1 Abnahme ist ebenfalls an den deutlich schwächeren Multimerbanden nach Ammoniumchlorid und MG132 Einsatz zu erkennen.

Der Versuch die Multimeraggregate aufzubrechen zeigte lediglich die Hitzeunbeständigkeit des Monomers, welches mit zunehmender Temperatur immer schlechter zu detektieren war. Diese Erkenntnis wurde für die Detektion endogener Signale beachtet und eine zu starke Erwärmung der Proben vermieden.

Die Spaltung des zytosolisch lokalisierten N-Terminus von HRG-1 wäre durch eine proteolytische Degradation im Lysosom zudem nicht zu erklären, während Cysteinproteasen sowohl im Lysosom, als auch im Zytoplasma zu finden sind (Chapman *et al.*, 1997; Saido *et al.*, 1994). So wurde die proteolytische Prozessierung von lysosomalen Membranproteinen bereits für LAMP-2A (Cuervo *et al.*, 2003) und CLN7 (Steenhuis *et al.*, 2012) beschrieben, allerdings in diesen Fällen von lysosomalen Cysteinproteasen. In wie weit die initialen Ergebnisse zur proteolytischen Spaltung von HRG-1 durch eine Cysteinprotease bestand haben, muss in weiteren Experimenten validiert werden. Hierbei sollten sowohl spezifische Cysteinproteaseinhibitoren als auch zusätzliche, spezifische Kontrollen für die Effektivität der verwendeten Inhibitoren genutzt werden.

4.2.3 LAMP-2 *Knockout* Gewebe haben einen geringeren HRG-1-Gehalt

In Immunfluoreszenzuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Verlust von LAMP-2 keinen deutlichen Einfluss auf die Lokalisation von HRG-1 in murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) hat. Für die Beurteilung der Rolle von LAMP-2 auf die HRG-1-Konzentration in diesen Zellen wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Diese ließen jedoch keine klare Aussage über die HRG-1 Proteinmenge in den Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* MEF-Zellen zu. Zwar wurde in einzelnen Versuchen ein stärkeres HRG-1 Signal in LAMP-2 *Knockout* Zellen gegenüber dem Wildtyp detektiert, doch konnte dieses Ergebnis zu späteren Zeitpunkten nicht zuverlässig, reproduziert werden. Unterschiede in der Zelldichte der Fibroblasten und daraus resultierende Schwankungen im Nährstoffspiegel wurden als mögliche Ursachen vermutet. Der Versuch diese Unregelmäßigkeiten mittels einheitlicher Zellaussaat und –Aufarbeitung zu vermeiden blieb jedoch erfolglos. Aufgrund dieser Fluktuationen in ein und derselben Zelllinie, erwiesen sich endogene, zellbasierte Experimente als nicht aussagekräftig.

Dem entgegen zeigten die HRG-1 Proteinkonzentrationen in murinen Organlysaten klare Tendenzen bzw. signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Tieren. So waren in allen untersuchten Geweben (Leber, Niere, Herz, Milz) die HRG-1 Niveaus im Durchschnitt zwischen 60 und 90% gegenüber dem Wildtyp herabreguliert. Zwar konnte dieser Unterschied nur in Herzmuskellysaten als hoch signifikant gewertet werden, doch dürfte eine Erhöhung der N-Zahl dieses Ergebnis weiter absichern.

Eine Ursache für einen geringeren Proteingehalt im LAMP-2 *Knockout* kann die transkriptionelle Regulierung der Proteinbiosynthese sein. Dies ließe sich am HRG-1 mRNA-Gehalt messen. Die Konzentrationsunterschiede von *hrg-1* auf mRNA-Ebene waren zwischen Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Mäuse jedoch deutlich geringer im Vergleich zu den Proteinmengen. Sie reichten von -28% (Leber) bis +32% (Herz) gegenüber den Wildtypwerten. Während die Proteinkonzentration in LAMP-2 *Knockout* Herzen am stärksten gesunken waren, deuteten die mRNA Konzentrationen in diesem Organ sogar einen nicht signifikanten Anstieg des HRG-1 Transkripts an. Die signifikant geringeren mRNA Konzentrationen in der LAMP-2 *Knockout* Leber reflektieren zwar die gesunkene Proteinmenge, jedoch zu einem deutlich geringeren Maße als anhand der Proteinmenge zu erwarten war. Eine Regulation der HRG-1 Proteinmenge auf transkriptionaler Ebene scheint daher nicht wahrscheinlich.

Ein Grund für die geringeren HRG-1 Proteinkonzentration in LAMP-2 *Knockout* Geweben könnte eine mögliche stabilisierende Wirkung der LAMP-2 HRG-1 Interaktion auf die biologische Halbwertszeit von HRG-1 und deren Verkürzung nach Verlust von LAMP-2 in der lysosomalen Membran sein. Ähnliches wurde im Zusammenhang mit LAMP-2B für das lysosomale Membranprotein TAPL beschrieben. So

konnte in *Pulse-Chase* Experimenten eine deutlich geringere Halbwertszeit von TAPL in LAMP-2-defizienten Zellen beobachtet werden (Demirel *et al.*, 2012). Experimente unter Verwendung von [³⁵S]-markiertem Cystein und Methionin und einer anschließenden Immunopräzipitation von HRG-1 könnten auch Aufklärung über die Halbwertszeit von HRG-1 in Abhängigkeit von LAMP-2 geben.

4.3 Hämdegradation in LAMP-2 *Knockout* Mäusen

HRG-1 wurde durch Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC, *Two-Electrode Voltage Clamp*) Versuche mit *Xenopus* Oozyten, sowie durch Häm-Uptake-Assays im Nematoden *C. elegans* (Rajagopal *et al.*, 2008) und in HeLa-Zellen (O'Callaghan *et al.*, 2010) als intrazellulärer Hämtransporter charakterisiert.

Ein solcher Transporter wird nach der Degradation von Hämproteinen in den Lysosomen der Zelle benötigt, um die freigesetzten Hämgruppen ins Zytosol zu exportieren und dort das zentrale Eisenatom durch HO-1 gewinnen zu können (Tenhunen *et al.*, 1970).

Während eine Vielzahl an Hämproteinen im Körper synthetisiert werden, ist Hämoglobin das mit Abstand am häufigsten generierte. Das in Erythrozyten lokalisierte Protein erfährt zudem einen stetigen Umsatz während der Erythropoese und Eryptose, bedingt durch deren festgelegte Lebensdauer von 120 (Mensch) bzw. 50 Tagen (Maus) (Saxena und Khandelwal, 2009). Die Masse an wiederverwertetem Hämoglobin setzt eine reibungsfreie Rückgewinnung der zentralen Eisenatome voraus.

Der Erythrozytenabbau selbst erfolgt durch spezialisierte Zellen des Retikuloendothelialen Systems (RES) in Milz, Leber und Knochenmark. Hauptsächlich sind die Makrophagen in der roten Pulpa der Milz an der Phagozytose der seneszenten Zellen beteiligt (Knutson und Wessling-Resnick, 2003). Daher kann davon ausgegangen werden, dass Störungen des Hämtransports und der Hämdegradation in diesen Zellen oder den Erythrozyten selbst zuerst beobachtet werden können.

Aus diesem Grund wurden besonders die Milzen von Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Tieren histologisch genauer untersucht, sowie Blutwerte (4.3.3) der Tiere erhoben.

4.3.1 LAMP-2 *Knockout* Milzen zeigen eine verstärkte Eisenakkumulation

Hämatoxylin&Eosin-Färbungen zeigten histologisch unauffällige Gewebe. Erst durch die Verwendung einer Immunfluoreszenzfärbung gegen HRG-1, wurden klare Unterschiede in LAMP-2 *Knockout* Milzen gegenüber entsprechenden Wildtyp Geweben ersichtlich. Während die HRG-1 Proteinmengen in Western Blots von LAMP-2 *Knockout* Gesamtmilzlysaten um 62% herabreguliert waren, war das HRG-1 Fluoreszenzsignal einzelner Zellen der roten Pulpa stark erhöht. Die gleichen Zellen schienen des Weiteren einen vergrößerten Zellkörper zu besitzen.

Anhand der zusätzlichen Expression des zelltypspezifischen lysosomalen Markerproteins CD68, konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen Zellen um Gewebsmakrophagen und Monozyten handeln muss (Rabinowitz und Gordon, 1991). Die Immunfluoreszenzfärbung offenbarte zudem einen relativen Anstieg der CD68⁺-Zellen innerhalb der roten Pulpa von LAMP-2 *Knockout* Mäusen. Diese Beobachtung stimmte mit vorangegangenen, durchflußzytometrischen Untersuchungen der Milz überein. In ihnen konnte ein 1,5-facher Anstieg der CD11b⁺-Zellen (Oberflächenmarker für Makrophagen und Monozyten) in LAMP-2 *Knockout* Tieren detektiert werden. Beides spricht für eine Infiltration der Milz von LAMP-2 *Knockout* Mäusen durch Gewebsmakrophagen oder deren verlängerte Lebensdauer.

Eine Infiltration von Monozyten in Gewebe kann die Folge von chronischen Entzündungen sein und wäre mit grundlegenden Veränderungen des Eisenhaushalts verbunden. Um bakteriellen Erregern, den möglichen Auslösern von Entzündungen, den Zugang zu körpereigenen Eisenreserven zu erschweren, wird der Eisenexport ins Blut unterbunden (Andrews, 1999). Dies geschieht wahrscheinlich über die Hochregulation von Heparin und die daraus folgende Herabregulation des Eisenexportproteins Ferroportin (Nemeth *et al.*, 2004a; Nemeth *et al.*, 2004b; Nicolas *et al.*, 2002). In den phagozytierenden Zellen des retikuloendothelialen Systems ist eine daraus resultierende Akkumulation von Eisen in den Zellen am auffälligsten zu beobachten. Als Folge eines solchen Rückhalts von Eisen in den Makrophagen der Milz kann es auch zur Entstehung einer Anämie (ACD, *anemia of chronic inflammation*) kommen (Sun *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2002).

In LAMP-2 *Knockout* Tieren konnten allerdings keine offensichtlichen Entzündungen bei keimarmer Tierhaltung beobachtet werden (Willenborg, 2007). Unter Verwendung eines Zytokin-Assays wäre es möglich das Vorhandensein von Entzündungsmarkern (z.B. NTF α , IL-6) näher zu untersuchen, um eine chronische, nicht durch Bakterien ausgelöste Entzündung auszuschließen.

Geringere HRG-1 Konzentrationen im LAMP-2 *Knockout* könnten auch die Effektivität der Hämdegradation beeinflussen und gerade in der Milz, aufgrund des hohen Umsatzes an Erythrozyten, zu deutlichen Konsequenzen führen. Die beobachtete Rekrutierung zusätzlicher phagozytischer Makrophagen in diesen Tieren könnte somit der Bewältigung des erhöhten Bedarfs dienen. Der Anstieg des HRG-1 Signals innerhalb dieser spezialisierten Zellen könnte wiederum über dessen transkriptionelle Hochregulation der Proteinsynthese hervorgerufen werden.

Zur Beurteilung der Auswirkungen des HRG-1 Anstiegs in diesen Zellen, über das Wildtyp-Niveau hinaus, wurde der intrazelluläre Eisengehalt untersucht. Die Kombination einer immunhistologischen Diaminobenzidinfärbung gegen HRG-1 und einer Berlinerblau Reaktion nach Perls ermöglichte es, eine starke Fe³⁺-Anreicherung innerhalb der HRG-1⁺-Zellen im LAMP-2 *Knockout* zu detektieren. Auch

konnte ein Anstieg des Fe^{3+} -Gehalts mit zunehmendem Alter der Tiere beobachtet werden. Während die proteolytische Spaltung von Häm durch HO-1 das reaktive Fe^{2+} freisetzt, ist das hier detektierte Fe^{3+} vor allem in den Speichermolekülen Ferritin und Hämosiderin zu finden (Bothwell und Charlton, 1979; Wixom *et al.*, 1980). Der vermutlich gesteigerte Hämtransport durch HRG-1 aus dem Lysosom ins Zytosol hat anscheinend die zunehmende Akkumulation von Fe^{3+} in den Makrophagen zur Folge. Ein Befund, der erneut die durchflußzytometrischen Untersuchungen widerspiegelt.

Neben einem generellen Anstieg an CD11b^+ -Zellen, war eine Population an höher granularen Splenozyten im LAMP-2 *Knockout* detektiert worden. Dies ließe sich durch die Akkumulation von Hämosiderin innerhalb der Makrophagen, an Stelle eines Eisenexports aus der Zelle, erklären (Fischbach *et al.*, 1971; Wixom *et al.*, 1980). Ein solcher Anstieg des Eisenspiegels in den retikuloendothelialen Zellen der Milz wurde bereits für andere Mausmodelle beschrieben. Ein Beispiel sind Ceruloplasmin-defiziente Mäuse bei denen Fe^{2+} in den Makrophagen zurückgehalten wird (Harris *et al.*, 1999). Ceruloplasmin ist eine Ferroxidase, deren Mangel im Blut zu einem dort steigenden, toxischen Fe^{2+} -Gehalt führt, welcher die Regulation des Eisenexports aus den Makrophagen ins Blut notwendig macht. Auch der induzierbare FLVCR-*Knockout* (Hämexporter aus der Zelle) hat eine Eisenakkumulation in den Makrophagen der roten Pulpa zur Folge (Keel *et al.*, 2008).

Es bleibt jedoch noch unklar weshalb es zu einer Akkumulation von Fe^{3+} in den LAMP-2 *Knockout* Makrophagen kommt. Ein Grund könnten Störungen in der Makroautophagie und damit verbunden die Akkumulation von autophagozytotischen Vesikeln sein. Während in Ferritin gespeichertes Eisen in Wildtyp Tieren nach und nach durch die Autophagozytose von Ferritin aus diesem wieder freigesetzt und aus der Zelle exportiert werden kann (Bridges und Hoffman, 1986; Garner *et al.*, 1998; Kidane *et al.*, 2006; Kurz *et al.*, 2011) sollte diese Degradation in LAMP-2 *Knockout* Zellen aufgrund der Akkumulation von autophagozytotischen Vesikeln verzögert/gestört sein (Eskelinen *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 2000). Die hierdurch ausbleibende Bereitstellung des Eisens für den Körper könnte auch der Grund für die gesteigerten HRG-1-Konzentrationen in den Makrophagen sein. Eine kompensatorische Funktion ist denkbar. So könnte die Akkumulation des Eisens in der Milz zu einem Eisenmangel im Knochenmark führen, welcher durch die darauf folgende regulatorische Hochregulation von HRG-1 für eine gesteigerte Hämdegradation ausgeglichen werden soll (Abb. 62).

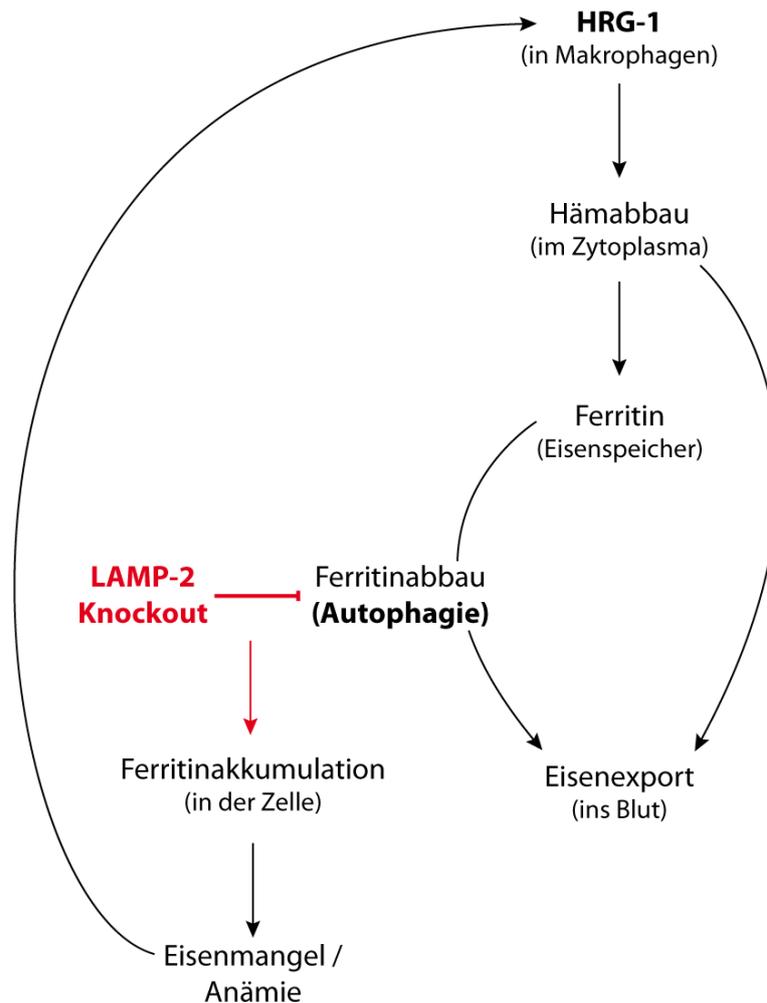


Abb. 62: Schematische Darstellung des Eisenstoffwechselmodells in LAMP-2 Knockout Makrophagen. Über HRG-1 wird Häm aus den Erythrophagolysosomen ins Zytoplasma transportiert, dort wird es degradiert und das freigesetzte Eisen entweder direkt ins Blut exportiert oder in Ferritin gespeichert. Ein sinkender Eisenspiegel im Blut führt zum Abbau von Ferritin und der Freisetzung des dadurch gewonnenen Eisens ins Blut. Der Ferritinabbau erfolgt durch dessen Phagozytose und Degradation im Lysosom. In LAMP-2 Knockout Zellen ist die Makroautophagie gestört und autophagozytotische Vesikel reichern sich in der Zelle an, wodurch deren Inhalt nicht degradiert wird. Es kommt zu einer Ferritinakkumulation in den Vesikeln und einem gestörten Eisenexport aus der Zelle. Eisenmangel im Blut und anderen Zellen ist die Folge und führt zu einer kompensatorischen Hochregulation von HRG-1 für einen gesteigerten Hämexport.

Um andere Gründe, wie einen verminderten Eisenexport aus der Zelle auszuschließen sollten vor allem die Eisenexporter Ferroportin und DMT1, aber auch weitere Proteine des Eisenstoffwechsels in den LAMP-2 Knockout Tieren näher untersucht werden. Zusätzlich könnte in elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Nachweis von Eisen- und Ferritin-haltigen autophagozytotischen Vesikeln in den Zellen erbracht werden.

Die starke Anreicherung von Eisen in den LAMP-2 Knockout Milzen ist außerdem eine mögliche Erklärung für die technischen Probleme bei der RNA Gewinnung aus den Organen. Sie lässt eine Zerstörung der RNA durch freie Radikale, Fe^{2+} -Ionen oder überschüssiges Häm vermuten.

4.3.2 Hämoxygenase 1 ist in LAMP-2 *Knockout* Milzen hochreguliert

Die Akkumulation von Eisen innerhalb der phagozytierenden Makrophagen, ist die Folge der Degradation von Hämmolekülen durch Hämoxygenasen (HOs) (Bothwell und Charlton, 1979). Veränderungen des zytosolischen Hämspiegels beeinflussen lediglich die Synthese der Hämoxygenase-1 (HO-1), während die HO-2 konstitutiv aktiv ist (Ryter und Tyrrell, 1997).

Tatsächlich konnte in Western Blot- und Immunfluoreszenzanalysen gezeigt werden, dass in LAMP-2 *Knockout* Milzen HO-1 stärker synthetisiert wird, als in korrespondierenden Wildtyp Organen. Die Kombination von Diaminobenzidinfärbung und Berlinerblau Reaktion nach Perls bestätigte zudem eine Ko-Lokalisation der HO-1⁺-Zellen mit den Fe³⁺-Akkumulationen in der roten Pulpa. Des Weiteren war der Anteil an prozessiertem, zytosolischem HO-1 NTF in der Milz signifikant erhöht. Dieser proteolytisch inaktiven Form werden zellschützende Eigenschaften zugeschrieben. Sie wird vermehrt bei oxidativem Stress gebildet und bewirkt vermutlich, durch Translokation in den Zellkern, die Hochregulation antioxidativer Genprodukte (Lin *et al.*, 2007). Das vermehrte Auftreten des HO-1 NTFs im LAMP-2 *Knockout* zeugt von einer erhöhten oxidativen Belastung in den Fe³⁺-haltigen Zellen (Lin *et al.*, 2007). Dies kann durch die steigenden Eisenspiegel in der Zelle, als auch durch eine erhöhte Exposition mit Häm hervorgerufen werden.

Der vermutlich beschleunigte Export von Häm aus dem Lysosom, aufgrund des gesteigerten HRG-1 Gehalts der Zelle, könnte eine vermehrte, zytotoxische Hämanreicherung im Zytoplasma zur Folge haben. Um dies zu verhindern und einen sofortigen Abbau des Häms gewährleisten zu können, müsste entweder die Degradation von Häm durch HO-1 (ab Hämkonzentrationen > 1 µM (Sassa, 2004)), oder der Hämexport über FLVCR1 aus der Zelle ins Blut gesteigert werden. Während sowohl Häm als auch Fe²⁺ oxidativen Stress auslösen (Balla *et al.*, 2003; Keyse und Tyrrell, 1990), besitzen Biliverdin und Bilirubin, ebenfalls Nebenprodukte des Hämabbaus, zugleich antioxidative Eigenschaften (Grisham, 1985). Aus diesem Grund ist womöglich eine erhöhte Eisenakkumulation gegenüber einer Hämakkumulation in der Zelle vorzuziehen (Molzer *et al.*, 2012; Nath *et al.*, 1992; Sassa, 2004).

Quantitative Expressionsanalysen von Genen wie z.B. Nrf2 und Bach1, die als regulatorische Transkriptionsfaktoren in den Eisenstoffwechsel eingreifen, könnten weitere Effekte der Eisenakkumulation im LAMP-2 *Knockout* aufdecken (Sun *et al.*, 2002).

4.3.3 LAMP-2 *Knockout* Mäuse zeigen Hinweise auf eine Anämie

Der *Knockout* von HRG-1 führt in *D. rerio* bereits embryonal zum Tod der Tiere. Grund hierfür sind unter anderem Störungen während der Erythropoese, die zu einer schweren Anämie führen (Rajagopal *et al.*, 2008). Auch Störungen in der Eisenresorption sind Ursachen für Anämien (Kovtunovych *et al.*, 2010). Davon ausgehend, dass HRG-1 im Knochenmark von LAMP-2 *Knockout*

Mäusen, wie in allen anderen untersuchten Organen, herunterreguliert ist, und unter Berücksichtigung der beobachteten Eisenakkumulation in LAMP-2 *Knockout* Gewebsmakrophagen der Milz, wurden deren Blutbilder mit Wildtyp Tieren verglichen.

Hierbei konnten leicht erhöhte Erythrozytenzahlen im LAMP-2 *Knockout* gemessen werden. Die Erythrozyten wiesen allerdings eine signifikant geringere Hämoglobinmenge (MCH) und eine signifikant erhöhte Variabilität der Erythrozytengröße (RDW-SD) auf. Beides sind mögliche Anzeichen einer Eisenmangelanämie (Sazawal *et al.*, 2014; Sultana *et al.*, 2013). Die erhöhten Thrombozytenzahlen weisen ebenfalls auf einen chronischen Eisenmangel hin (Gross *et al.*, 1964). Sie könnten ebenfalls durch eine funktionelle Störung der Milz begründet werden, welche aufgrund der Zytotoxizität freien Eisens (Fe^{2+}) und Häms in diesen Tieren nicht unwahrscheinlich ist.

Des Weiteren waren die Monozytenzahlen im Blut von LAMP-2 *Knockout* Tieren signifikant erhöht. Dies würde zu der starken Infiltration von CD68^+ -Zellen in der Milz passen, welche sich aus den Monozyten differenzieren.

Die Studie weiterer Proteine des Eisenhaushalts, sowohl im Blut, als auch in Geweben, wie speziell der Leber und dem Knochenmark, könnte Aufschluss über die Ursache des möglichen Eisenmangels geben. Hierzu zählen Ferritin und Transferrin, als Marker für einen generellen Eisenmangel oder -Überschuss, als auch Ferroportin und Hpcidin (Hentze *et al.*, 2010). Die Untersuchung dieser Proteine sollte für ein umfassenderes Bild des Eisenstoffwechsels in LAMP-2 *Knockout* Tieren in zukünftigen Arbeiten herangezogen werden.

Im Hinblick auf die Kardio- und Skelettmuskeldystrophien in Patienten mit der Danon Erkrankung könnte die Untersuchung von Muskelzellen auf ihren Myoglobingehalt noch von Interesse sein. Myoglobin ist das nach Hämoglobin zweit häufigste Hämprotein im Körper und ausschließlich in Muskelzellen lokalisiert. Ein durch Eisenmangel bedingter Rückgang in der Myoglobinsynthese (Dallman und Schwartz, 1965) verringert die Leistungsfähigkeit der Muskelzellen und könnte mitverantwortlich für die Symptome der Danon Erkrankung sein.

Auch die bisher ungeklärte erhöhte Letalität von LAMP-2 *Knockout* Mäusen 20-40 Tage nach der Geburt könnte mit Defekten in der Eisenwiederverwertung in Verbindung gebracht werden. Davon ausgehend, dass das fetale Hämoglobin der neugeborenen Mäuse nach der Geburt durch adultes Hämoglobin ersetzt werden muss, könnte dieser Vorgang bei einer gestörten Eisenfreisetzung gerade in den frühen Wachstumsphasen der Mäuse zu deren Tod führen (Andrews, 1999).

4.4 Erythrophagozytose durch Makrophagen

White *et al.* beschrieben 2013, in Anlehnung an Delaby *et al.* (2012), die ausgeprägte Rekrutierung von HRG-1 zur Erythrophagolysosomenmembran. Für die Untersuchung des Einflusses von HRG-1 auf

den Hämtransport nach Erythrozytendegradation wurden die zellulären Vorgänge in einem Zellkultursystem simuliert. Hierfür wurden Knochenmarkmakrophagen differenziert und nach Hämentzug mit seneszenten Erythrozyten inkubiert. Nach deren Phagozytose detektierten White *et al.* mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen einen Anstieg des HRG-1-Signals innerhalb der Erythrophagolysosomenmembran. Dieser Anstieg wurde mit der spezifischen Rekrutierung von HRG-1 für den benötigten Export von Häm aus dem Lysosom gedeutet, da die Phagozytose von Latexkügelchen keinen Anstieg bewirkte. White *et al.* bewerteten dieses Ergebnis als einen weiteren Beweis für die Rolle von HRG-1 als Hämexporter aus dem Lysosom.

Für die Beurteilung des Einflusses von LAMP-2 auf die Rekrutierung von HRG-1 zur Erythrophagolysosomenmembran wurden für diese Arbeit Experimente mit Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Knochenmarkmakrophagen durchgeführt. Gerade im Hinblick auf die vorangegangenen, histologischen Befunde in LAMP-2 *Knockout* Milzen waren hier gefundene Unterschiede von Interesse. Zuvor hatten Huynh *et al.* (2007) gezeigt, dass der *Knockout* von LAMP-2 in peritoneal Makrophagen, anders als in Granulozyten (Beertsen *et al.*, 2008), keine Beeinträchtigung der Phagosomenfusion bedingt.

Wie von White *et al.* publiziert, konnte HRG-1 in der Erythrophagolysosomenmembran detektiert werden. Übereinstimmend mit dem HRG-1 Fluoreszenzsignal in Milzschnitten zeigten LAMP-2 *Knockout* Knochenmarkmakrophagen einen Anstieg des HRG-1 Signals gegenüber dem Wildtyp. Ebenfalls angestiegen im LAMP-2 *Knockout* war das Signal des lysosomalen Membranproteins LAMP-1.

Entgegen der Beobachtungen von White *et al.* war HRG-1 auch nach der Phagozytose von IgG-opsonierten Latexkügelchen in der erythrophagolysosomalen Membran zu detektieren. Der Vergleich von Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Makrophagen zeigte hierbei jedoch ein geringeres HRG-1 Signal im *Knockout* bei gleichbleibenden Konzentrationen von LAMP-1.

Die von White *et al.* gewählte Methode der Fluoreszenzauswertung entlang einer durch das phagozytierte Objekt gelegten Linie führte bei der Analyse der Fluoreszenzintensität in der Membran in der Praxis jedoch zu einigen Problemen.

Zum einen war es aufgrund der Morphologie der Makrophagen nicht möglich die phagolysosomale Membran und das normale HRG-1 Signal von Endo- und Lysosomen in eine mikroskopische Fokusebene zu legen. Die Akkumulation der HRG-1⁺-Vesikel um den Zellkern führte zum einen dazu, dass die Zelle in diesem Bereich an Volumen gewann und zum anderen dazu, dass die Phagosomen marginal des Fluoreszenzsignals lagen (Abb. 63). Hierdurch entstand der Eindruck einer steigenden Intensität des Fluoreszenzsignals im Vergleich zur Umgebung (Abb. 63). Ein Vergleich mit dem umliegenden Phagozytose-unspezifischen HRG-1 Signal war jedoch nicht möglich, da dieses

außerhalb der Fokusebene lag (Abb. 63). Zusätzlich erfasste die einzelne durch das Objekt gelegte Linie die Membran nur an zwei distinkten Positionen.

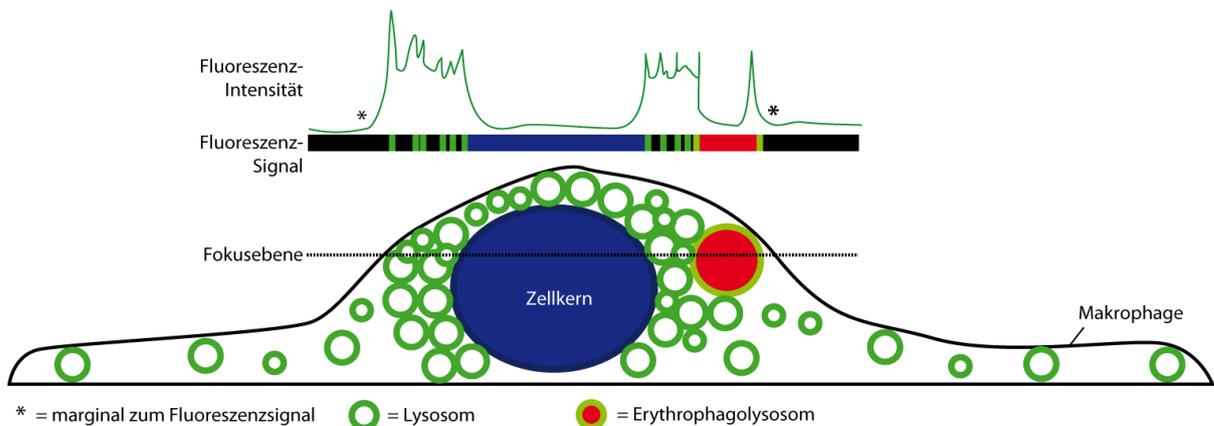


Abb. 63: Schematische Darstellung der Fluoreszenzauswertung des Erythrophagozytoseversuchs in Makrophagen. Die Fluoreszenzintensität eines lysosomalen Membransignals innerhalb der Fokusebene.

Für einen genaueren Vergleich der HRG-1-Konzentration innerhalb der Membran von Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Makrophagen, wurde in einer zweiten Messung die Fluoreszenzintensität entlang der gesamten, den Erythrozyten umschließenden, Membran gemessen und, der Vergleichbarkeit halber, durch die Länge der Membran dividiert. Hieraus ergab sich die Fluoreszenzintensität des entsprechenden Proteins pro Mikrometer Phagosomenmembran. Von Interesse waren lediglich die Unterschiede von Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Makrophagen nach Erythrophagozytose.

Es konnte gezeigt werden, dass HRG-1 und LAMP-1 in LAMP-2 *Knockout* Makrophagen stärker an der Erythrophagosomenmembran vertreten sind, als im Wildtyp. Diese Beobachtung spiegelte die vorhergegangenen Messungen entlang einer Querschnittslinie wider.

Die starken Signale lysosomaler Membranproteine in der phagosomalen Membran der LAMP-2 *Knockout* Makrophagen bestätigt, dass die Fusion zwischen Phagosom und Lysosom in diesen Zellen durch den Verlust von LAMP-2 nicht fundamental gestört sein kann. Zusätzlich ist der Anstieg von LAMP-1 ein Hinweis auf die vorhergesagte, kompensatorische Hochregulation von LAMP-1 in LAMP-2 *Knockout* Zellen, ähnlich des LAMP-2 Anstiegs in LAMP-1 *Knockout* Tieren (Andrejewski *et al.*, 1999). Auch der Anstieg von HRG-1 entspricht dem in dieser Arbeit beobachtetem HRG-1 Signal in LAMP-2 *Knockout* Gewebemakrophagen der Milz. Aufgrund des nicht ebenfalls angestiegenen CD68-Gehalts in der Membran, muss dies nicht zwangsweise als eine kompensatorische Hochregulation als Folge des LAMP-2 Verlusts gewertet werden. Trotzdem ist der prozentuale Anstieg anderer lysosomaler Membranproteine als Konsequenz des *lamp-2 Knockouts* zu bedenken.

Neben den verwendeten Fluoreszenzsignal-basierten Auswertungen könnten zusätzlich Western Blot und qRT-PCR Versuche für die Quantifizierung des HRG-1-Gehalts nach Erythrophagozytose in

Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Zellen hinzugezogen werden. Hierbei sollten ebenfalls neben HRG-1 weitere lysosomale Membranproteine und die in den Hämabbau und Eisenexport involvierten Proteine, wie HO-1, Ferritin und Ferroportin, untersucht werden (White *et al.*, 2013). Im Hinblick auf eine verzögerte oder beschleunigte Hämdegradation nach LAMP-2 *Knockout* sind insbesondere Zeitreihen von Interesse, die den Hämatabolismus von Beginn, eine Stunde nach Phagozytose (Delaby *et al.*, 2005), bis Ende, 20 Stunden nach Phagozytose (Kondo *et al.*, 1988), abdecken. Es ist zu beachten, dass beide Methoden es nicht erlauben den Anstieg von HRG-1 speziell in der Phagolysosomenmembran zu bestimmen, sondern lediglich generell in der Zelle.

Anders als bei Häm-*Uptake Assays*, die nach Überexpression einen Transport über die Plasmamembran bzw. die Oozytenmembran messen (Rajagopal *et al.*, 2008; O'Callaghan *et al.*, 2010), ist die Untersuchung des Hämtransports von endogenem, in der lysosomalen Membran lokalisiertem HRG-1, kaum möglich. Dies wäre allerdings in Bezug auf LAMP-2 von Interesse. Weiter darf nicht vergessen werden, dass der Anstieg von Häm im Zytoplasma nur in hämauxotrophen Organismen wie *C. elegans* unabhängig von der Hämsynthese der Zelle betrachtet werden kann (Rao *et al.*, 2005; Severance und Hamza, 2009).

5 Zusammenfassung

Das lysosomal-assoziierte Membranprotein 2 (LAMP-2) ist eines der häufigsten Membranproteine des Lysosoms und Mutationen in LAMP-2 sind mit der Danon Erkrankung assoziiert, welche sich durch eine Kardio- und Skelettmuskelmyopathie und geistige Retardierungen auszeichnet.

In dieser Arbeit wurden mittels *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screens* neue Interaktionspartner für LAMP-2 gesucht. Hierbei wurde der Hämexporter HRG-1 (*heme-responsive gene 1*) identifiziert, dessen Interaktion nach transienter Expression auch in humanen Zellen validiert werden konnte.

Im Zuge einer Charakterisierung des Membranproteins HRG-1 als Interaktionspartner von LAMP-2 konnte die zytoplasmatische Lokalisation des N-Terminus von HRG-1 belegt werden. Des Weiteren konnte eine proteolytische Prozessierung des N-Terminus nach Überexpression in eukaryotischen Zellen gezeigt und die hierfür verantwortlichen Enzyme auf Cysteinproteasen eingegrenzt werden.

In mikroskopischen Untersuchungen wurde die spät endosomale und lysosomale Lokalisation von endogenem HRG-1 in eukaryotischen Zellen bewiesen. Zudem konnte in murinen Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Fibroblasten gezeigt werden, dass LAMP-2 keinen offensichtlichen Einfluss auf die Lokalisation von HRG-1 hat. Weiterhin konnte unter Verwendung von Alaninmutanten ausgeschlossen werden, dass ein Tyrosin- und auch ein Di-Leucin-basiertes putatives Sortierungsmotiv im C-Terminus von HRG-1 für dessen lysosomale Lokalisation beteiligt ist.

Durch den Vergleich von Wildtyp und LAMP-2 *Knockout* Organlysaten konnte eine geringere HRG-1 Proteinkonzentration in LAMP-2 *Knockout* Geweben detektiert werden, welche jedoch nicht durch eine transkriptionelle Herabregulation der HRG-1 mRNA begründet zu sein scheint.

Die Funktion von HRG-1 als Hämexporter wurde in den retikuloendothelialen Zellen der Milz näher untersucht. Hierbei konnte in Milzen von LAMP-2 *Knockout* Tieren eine Infiltration durch CD68⁺ Gewebemakrophagen und, mit zunehmendem Alter, eine Akkumulation von Eisen (Fe³⁺) in diesen Zellen beobachtet werden. Gleichfalls waren sowohl der HRG-1- als auch der Hämoxygenase-1 (HO-1) Gehalt in den Gewebemakrophagen aus LAMP-2-defizienten Mäusen erhöht. Ein Zusammenhang zwischen einer gestörten autophagozytotischen Degradation der intrazellulären Eisenspeicherproteine (Ferritin) und den für die Danon Erkrankung typischen autophagozytotischen Vesikeln wird postuliert. Die Akkumulation von Eisen in den LAMP-2 *Knockout* Milzen ist zusätzlich von Veränderungen der Erythropoese begleitet, was für eine verminderte Eisenrückgewinnung spricht. Zuletzt konnte durch Untersuchungen der Erythrophagozytose ein Anstieg von HRG-1 und LAMP-1 in der Erythrophagolysosomenmembran von LAMP-2 *Knockout* Makrophagen gegenüber dem Wildtyp gezeigt werden.

Zusammenfassend konnte durch diese Studie HRG-1 als neuer Interaktionspartner von LAMP-2 identifiziert und Veränderungen im Eisenhaushalt von LAMP-2-defizienten Mäusen aufgedeckt werden.

6 Summary

The lysosome-associated membrane protein-2 (LAMP-2) was described as one of the most abundant membrane proteins of the lysosome. Mutations in LAMP-2 are associated with Danon disease, which is characterized by cardiomyopathy, myopathy and mental retardation.

In this study split-ubiquitine yeast two-hybrid screens were used to identify novel interaction partners of LAMP-2. Thereby an interaction between the heme exporter HRG-1 (heme-responsive gene 1) and LAMP-2 could be revealed and further validated after transient expression in human cells.

By characterizing this interaction the cytosolic localization of the N-terminus of HRG-1 was proven. In addition, a proteolytic cleavage of the N-terminus was observed after overexpression in eukaryotic cells and the responsible enzymes could be narrowed down to cysteine proteases.

Microscopic analysis demonstrated the late endosomal and lysosomal localization of endogenous HRG-1 in eukaryotic cells. Using murine wild-type and LAMP-2 knockout fibroblasts no obvious effect of LAMP-2 on the localization of HRG-1 could be observed. Furthermore, alanine mutants showed that neither the tyrosine-based nor the dileucine-based putative sorting signals in the C-terminus of HRG-1 are crucial for its lysosomal localisation.

Comparing the protein levels of HRG-1 in wild-type and LAMP-2 knockout organs a decrease in HRG-1 expression could be observed in LAMP-2 knockout tissues, which is apparently not due to a down regulation of HRG-1 specific transcription.

The function of HRG-1 as a heme exporter was further investigated in splenic reticuloendothelial cells. In LAMP-2 knockout spleens an infiltration of CD68⁺ tissue macrophages was observed as well as an age dependent accumulation of ferric iron (Fe³⁺) in these cells. Both HRG-1 and heme oxygenase 1 (HO-1) levels were increased in tissue macrophages. A connection between defects in the autophagic degradation of intracellular iron stores (ferritin) and the accumulation of autophagic vesicles in patients with Danon disease was postulated. The accumulation of iron in LAMP-2 knockout spleens is accompanied by changes in erythropoiesis, which hints at a deficiency in iron recycling. An erythrophagocytosis assay showed an increase in HRG-1 and LAMP-1 in the erythro-phagolysosomal membrane of LAMP-2 knockout macrophages compared to wild-type.

Taken together, this study shows HRG-1 as a new interaction partner of LAMP-2 and uncovers changes in the iron homeostasis of LAMP-2-deficient mice.

Literaturverzeichnis

- Akasaki, K., A. Michihara, K. Mibuka, Y. Fujiwara und H. Tsuji
1995 Biosynthetic transport of a major lysosomal membrane glycoprotein, lamp-1: convergence of biosynthetic and endocytic pathways occurs at three distinctive points. *Experimental cell research* 220(2):464-73.
- Alberts, Bruce
2002 *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science.
- Anderson, K. E., S. Sassa, D. F. Bishop und R. J. Desnick
2001 Disorders of heme biosynthesis: X-linked sideroblastic anemia and the porphyrias. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*:2991-3062.
- Andrejewski, N., E. L. Punnonen, G. Guhde, Y. Tanaka, R. Lullmann-Rauch, D. Hartmann, K. von Figura und P. Saftig
1999 Normal lysosomal morphology and function in LAMP-1-deficient mice. *The Journal of biological chemistry* 274(18):12692-701.
- Andrews, N. C.
1999 Disorders of iron metabolism. *The New England journal of medicine* 341(26):1986-95.
- Armstrong, J.
2010 Yeast vacuoles: more than a model lysosome. *Trends in cell biology* 20(10):580-5.
- Backer, J. M., L. Bourret und J. F. Dice
1983 Regulation of catabolism of microinjected ribonuclease A requires the amino-terminal 20 amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80(8):2166-70.
- Bagshaw, R. D., D. J. Mahuran und J. W. Callahan
2005 A proteomic analysis of lysosomal integral membrane proteins reveals the diverse composition of the organelle. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 4(2):133-43.
- Balla, G., H. S. Jacob, J. Balla, M. Rosenberg, K. Nath, F. Apple, J. W. Eaton und G. M. Vercellotti
1992 Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *The Journal of biological chemistry* 267(25):18148-53.
- Balla, J., G. M. Vercellotti, K. Nath, A. Yachie, E. Nagy, J. W. Eaton und G. Balla
2003 Haem, haem oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 18 Suppl 5:v8-12.
- Bandyopadhyay, U. und A. M. Cuervo
2007 Chaperone-mediated autophagy in aging and neurodegeneration: lessons from alpha-synuclein. *Experimental gerontology* 42(1-2):120-8.
- Bandyopadhyay, U., S. Kaushik, L. Varticovski und A. M. Cuervo
2008 The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Molecular and cellular biology* 28(18):5747-63.
- Bandyopadhyay, U., S. Sridhar, S. Kaushik, R. Kiffin und A. M. Cuervo
2010 Identification of regulators of chaperone-mediated autophagy. *Molecular cell* 39(4):535-47.
- Beertsen, W., M. Willenborg, V. Everts, A. Zirogianni, R. Podschun, B. Schröder, E. L. Eskelinen und P. Saftig
2008 Impaired phagosomal maturation in neutrophils leads to periodontitis in lysosomal-associated membrane protein-2 knockout mice. *Journal of immunology* 180(1):475-82.

- Berkovic, S. F., L. M. Dibbens, A. Oshlack, J. D. Silver, M. Katerelos, D. F. Vears, R. Lullmann-Rauch, J. Blanz, K. W. Zhang, J. Stankovich, R. M. Kalnins, J. P. Dowling, E. Andermann, F. Andermann, E. Faldini, R. D'Hooge, L. Vadlamudi, R. A. Macdonell, B. L. Hodgson, M. A. Bayly, J. Savige, J. C. Mulley, G. K. Smyth, D. A. Power, P. Saftig und M. Bahlo
2008 Array-based gene discovery with three unrelated subjects shows SCARB2/LIMP-2 deficiency causes myoclonus epilepsy and glomerulosclerosis. *American journal of human genetics* 82(3):673-84.
- Binker, M. G., L. I. Cosen-Binker, M. R. Terebiznik, G. V. Mallo, S. E. McCaw, E. L. Eskelinen, M. Willenborg, J. H. Brumell, P. Saftig, S. Grinstein und S. D. Gray-Owen
2007 Arrested maturation of Neisseria-containing phagosomes in the absence of the lysosome-associated membrane proteins, LAMP-1 and LAMP-2. *Cellular microbiology* 9(9):2153-66.
- Bonifacino, J. S. und L. M. Traub
2003 Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annual review of biochemistry* 72:395-447.
- Bothwell, T. H. und R. W. Charlton
1979 Current problems of iron overload. Recent results in cancer research. *Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer* 69:87-95.
- Boucek, D., J. Jirikowic und M. Taylor
2011 Natural history of Danon disease. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 13(6):563-8.
- Bratosin, D., J. Mazurier, J. P. Tissier, J. Estaquier, J. J. Huart, J. C. Ameisen, D. Aminoff und J. Montreuil
1998 Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie* 80(2):173-95.
- Braulke, T. und J. S. Bonifacino
2009 Sorting of lysosomal proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1793(4):605-14.
- Bridges, K. R. und K. E. Hoffman
1986 The effects of ascorbic acid on the intracellular metabolism of iron and ferritin. *The Journal of biological chemistry* 261(30):14273-7.
- Carlsson, S. R. und M. Fukuda
1989 Structure of human lysosomal membrane glycoprotein 1. Assignment of disulfide bonds and visualization of its domain arrangement. *The Journal of biological chemistry* 264(34):20526-31.
- Carlsson, S. R. und M. Fukuda
1990 The polylactosaminoglycans of human lysosomal membrane glycoproteins lamp-1 and lamp-2. Localization on the peptide backbones. *The Journal of biological chemistry* 265(33):20488-95.
- Carlsson, S. R. und M. Fukuda
1992 The lysosomal membrane glycoprotein lamp-1 is transported to lysosomes by two alternative pathways. *Archives of biochemistry and biophysics* 296(2):630-9.
- Chapel, A., S. Kieffer-Jaquinod, C. Sagne, Q. Verdon, C. Ivaldi, M. Mellal, J. Thirion, M. Jadot, C. Bruley, J. Garin, B. Gasnier und A. Journet
2013 An extended proteome map of the lysosomal membrane reveals novel potential transporters. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 12(6):1572-88.
- Chapman, H. A., R. J. Riese und G. P. Shi
1997 Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annual review of physiology* 59:63-88.
- Chen, J. W., T. L. Murphy, M. C. Willingham, I. Pastan und J. T. August
1985 Identification of two lysosomal membrane glycoproteins. *The Journal of cell biology* 101(1):85-95.

- Chiang, H. L., S. R. Terlecky, C. P. Plant und J. F. Dice
1989 A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* 246(4928):382-5.
- Conrad, M. E. und J. N. Umbreit
2000 Iron absorption and transport-an update. *American journal of hematology* 64(4):287-98.
- Cuervo, A. M. und J. F. Dice
1996 A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* 273(5274):501-3.
- Cuervo, A. M. und J. F. Dice
1998 Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *Journal of molecular medicine* 76(1):6-12.
- Cuervo, A. M. und J. F. Dice
2000 Unique properties of lamp2a compared to other lamp2 isoforms. *Journal of cell science* 113 Pt 24:4441-50.
- Cuervo, A. M., L. Mann, E. J. Bonten, A. d'Azzo und J. F. Dice
2003 Cathepsin A regulates chaperone-mediated autophagy through cleavage of the lysosomal receptor. *The EMBO journal* 22(1):47-59.
- Cuervo, A. M., L. Stefanis, R. Fredenburg, P. T. Lansbury und D. Sulzer
2004 Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* 305(5688):1292-5.
- Dallman, P. R. und H. C. Schwartz
1965 Distribution of Cytochrome C and Myoglobin in Rats with Dietary Iron Deficiency. *Pediatrics* 35:677-86.
- Danon, M. J., S. J. Oh, S. DiMauro, J. R. Manaligod, A. Eastwood, S. Naidu und L. H. Schliselfeld
1981 Lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase. *Neurology* 31(1):51-7.
- de Duve, C., ed.
1959 Lysosomes, a new group of cytoplasmic particles: Ronald Press.
- de Saint-Vis, B., J. Vincent, S. Vandenabeele, B. Vanbervliet, J. J. Pin, S. Ait-Yahia, S. Patel, M. G. Mattei, J. Banchereau, S. Zurawski, J. Davoust, C. Caux und S. Lebecque
1998 A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity* 9(3):325-36.
- Defays, A., A. David, A. de Gassart, F. De Angelis Rigotti, T. Wenger, V. Camossetto, P. Brousset, T. Petrella, M. Dalod, E. Gatti und P. Pierre
2011 BAD-LAMP is a novel biomarker of nonactivated human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 118(3):609-17.
- Delaby, C., N. Pilard, G. Hetet, F. Driss, B. Grandchamp, C. Beaumont und F. Canonne-Hergaux
2005 A physiological model to study iron recycling in macrophages. *Experimental cell research* 310(1):43-53.
- Delaby, C., C. Rondeau, C. Pouzet, A. Willemetz, N. Pilard, M. Desjardins und F. Canonne-Hergaux
2012 Subcellular localization of iron and heme metabolism related proteins at early stages of erythrophagocytosis. *PloS one* 7(7):e42199.
- Dell'Angelica, E. C., J. Klumperman, W. Stoorvogel und J. S. Bonifacino
1998 Association of the AP-3 adaptor complex with clathrin. *Science* 280(5362):431-4.
- Demirel, O., I. Jan, D. Wolters, J. Blanz, P. Saftig, R. Tampe und R. Abele
2012 The lysosomal polypeptide transporter TAPL is stabilized by interaction with LAMP-1 and LAMP-2. *Journal of cell science* 125(Pt 18):4230-40.
- Desjardins, M., N. N. Nzala, R. Corsini und C. Rondeau
1997 Maturation of phagosomes is accompanied by changes in their fusion properties and size-selective acquisition of solute materials from endosomes. *Journal of cell science* 110 (Pt 18):2303-14.

- Dunn, W. A., Jr.
1990 Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *The Journal of cell biology* 110(6):1923-33.
- Edwards, D. R., M. M. Handsley und C. J. Pennington
2008 The ADAM metalloproteinases. *Molecular aspects of medicine* 29(5):258-89.
- Ehrmann, M. und T. Clausen
2004 Proteolysis as a regulatory mechanism. *Annual review of genetics* 38:709-24.
- Eskelinen, E. L., A. M. Cuervo, M. R. Taylor, I. Nishino, J. S. Blum, J. F. Dice, I. V. Sandoval, J. Lippincott-Schwartz, J. T. August und P. Saftig
2005 Unifying nomenclature for the isoforms of the lysosomal membrane protein LAMP-2. *Traffic* 6(11):1058-61.
- Eskelinen, E. L., A. L. Illert, Y. Tanaka, G. Schwarzmann, J. Blanz, K. Von Figura und P. Saftig
2002 Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Molecular biology of the cell* 13(9):3355-68.
- Eskelinen, E. L., C. K. Schmidt, S. Neu, M. Willenborg, G. Fuertes, N. Salvador, Y. Tanaka, R. Lullmann-Rauch, D. Hartmann, J. Heeren, K. von Figura, E. Knecht und P. Saftig
2004 Disturbed cholesterol traffic but normal proteolytic function in LAMP-1/LAMP-2 double-deficient fibroblasts. *Molecular biology of the cell* 15(7):3132-45.
- Fambrough, D. M., K. Takeyasu, J. Lippincott-Schwarz und N. R. Siegel
1988 Structure of LEP100, a glycoprotein that shuttles between lysosomes and the plasma membrane, deduced from the nucleotide sequence of the encoding cDNA. *The Journal of cell biology* 106(1):61-7.
- Fields, S. und O. Song
1989 A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340(6230):245-6.
- Fischbach, F. A., D. W. Gregory, P. M. Harrison, T. G. Hoy und J. M. Williams
1971 On the structure of hemosiderin and its relationship to ferritin. *Journal of ultrastructure research* 37(5):495-503.
- Flannery, A. R., C. Czibener und N. W. Andrews
2010 Palmitoylation-dependent association with CD63 targets the Ca²⁺ sensor synaptotagmin VII to lysosomes. *The Journal of cell biology* 191(3):599-613.
- Fogarty, F. M., J. O'Keefe, A. Zhadanov, D. Papkovsky, V. Ayllon und R. O'Connor
2013 HRG-1 enhances cancer cell invasive potential and couples glucose metabolism to cytosolic/extracellular pH gradient regulation by the vacuolar-H ATPase. *Oncogene*.
- Forgac, M.
2007 Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8(11):917-29.
- Fuertes, G., J. J. Martin De Llano, A. Villarroya, A. J. Rivett und E. Knecht
2003 Changes in the proteolytic activities of proteasomes and lysosomes in human fibroblasts produced by serum withdrawal, amino-acid deprivation and confluent conditions. *The Biochemical journal* 375(Pt 1):75-86.
- Fujiwara, Y., A. Furuta, H. Kikuchi, S. Aizawa, Y. Hatanaka, C. Konya, K. Uchida, A. Yoshimura, Y. Tamai, K. Wada und T. Kabuta
2013 Discovery of a novel type of autophagy targeting RNA. *Autophagy* 9(3):403-9.
- Fukuda, M.
1991 Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *The Journal of biological chemistry* 266(32):21327-30.
- Funato, K., W. Beron, C. Z. Yang, A. Mukhopadhyay und P. D. Stahl
1997 Reconstitution of phagosome-lysosome fusion in streptolysin O-permeabilized cells. *The Journal of biological chemistry* 272(26):16147-51.

- Furuta, A., K. Wakabayashi, J. Haratake, H. Kikuchi, T. Kabuta, F. Mori, F. Tokonami, Y. Katsumi, F. Tanioka, Y. Uchiyama, I. Nishino und K. Wada
2013 Lysosomal storage and advanced senescence in the brain of LAMP-2-deficient Danon disease. *Acta neuropathologica* 125(3):459-61.
- Furuta, K., X. L. Yang, J. S. Chen, S. R. Hamilton und J. T. August
1999 Differential expression of the lysosome-associated membrane proteins in normal human tissues. *Archives of biochemistry and biophysics* 365(1):75-82.
- Futerman, A. H. und G. van Meer
2004 The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature reviews. Molecular cell biology* 5(7):554-65.
- Garner, B., K. Roberg und U. T. Brunk
1998 Endogenous ferritin protects cells with iron-laden lysosomes against oxidative stress. *Free radical research* 29(2):103-14.
- Gelb, B. D., D. Bromme und R. J. Desnick
2001 Pycnodysostosis: Kathepsin K deficiency. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*:3453-3468.
- Gonzalez-Noriega, A., J. H. Grubb, V. Talkad und W. S. Sly
1980 Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhances lysosomal enzyme secretion by impairing receptor recycling. *The Journal of cell biology* 85(3):839-52.
- Gough, N. R. und D. M. Fambrough
1997 Different steady state subcellular distributions of the three splice variants of lysosome-associated membrane protein LAMP-2 are determined largely by the COOH-terminal amino acid residue. *The Journal of cell biology* 137(5):1161-9.
- Gough, N. R., C. L. Hatem und D. M. Fambrough
1995 The family of LAMP-2 proteins arises by alternative splicing from a single gene: characterization of the avian LAMP-2 gene and identification of mammalian homologs of LAMP-2b and LAMP-2c. *DNA and cell biology* 14(10):863-7.
- Goursot, A., T. Mineva, C. Bissig, J. Gruenberg und D. R. Salahub
2010 Structure, dynamics, and energetics of lysobisphosphatidic acid (LBPA) isomers. *The journal of physical chemistry. B* 114(47):15712-20.
- Granger, B. L., S. A. Green, C. A. Gabel, C. L. Howe, I. Mellman und A. Helenius
1990 Characterization and cloning of lgp110, a lysosomal membrane glycoprotein from mouse and rat cells. *The Journal of biological chemistry* 265(20):12036-43.
- Green, S. A., K. P. Zimmer, G. Griffiths und I. Mellman
1987 Kinetics of intracellular transport and sorting of lysosomal membrane and plasma membrane proteins. *The Journal of cell biology* 105(3):1227-40.
- Grisham, M. B.
1985 Myoglobin-catalyzed hydrogen peroxide dependent arachidonic acid peroxidation. *Journal of free radicals in biology & medicine* 1(3):227-32.
- Gross, S., V. Keefer und A. J. Newman
1964 The Platelets in Iron-Deficiency Anemia. I. The Response to Oral and Parenteral Iron. *Pediatrics* 34:315-23.
- Guhde, G.
1999 In vivo Funktionsanalyse des Lysosomen-assoziierten-Membranglykoproteins LAMP-2, Georg-August-Universität zu Göttingen.
- Gunther, W., A. Luchow, F. Cluzeaud, A. Vandewalle und T. J. Jentsch
1998 ClC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(14):8075-80.
- Hammond, C. und A. Helenius
1995 Quality control in the secretory pathway. *Current opinion in cell biology* 7(4):523-9.

- Hara, T., K. Nakamura, M. Matsui, A. Yamamoto, Y. Nakahara, R. Suzuki-Migishima, M. Yokoyama, K. Mishima, I. Saito, H. Okano und N. Mizushima
2006 Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441(7095):885-9.
- Harris, Z. L., A. P. Durley, T. K. Man und J. D. Gitlin
1999 Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(19):10812-7.
- Hayashi, S., Y. Omata, H. Sakamoto, Y. Higashimoto, T. Hara, Y. Sagara und M. Noguchi
2004 Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene* 336(2):241-50.
- Hedrich, Hans J. und Gillian R. Bullock
2004 *The laboratory mouse*. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press.
- Hentze, M. W., M. U. Muckenthaler, B. Galy und C. Camaschella
2010 Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* 142(1):24-38.
- Hirshhorn, R. und A. Reusser
2001 Glycogen storage disease type II: Acid alpha-glucosidase (acid maltase) deficiency. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*:3389-3420.
- Honing, S., J. Griffith, H. J. Geuze und W. Hunziker
1996 The tyrosine-based lysosomal targeting signal in lamp-1 mediates sorting into Golgi-derived clathrin-coated vesicles. *The EMBO journal* 15(19):5230-9.
- Hunziker, W., T. Simmen und S. Honing
1996 Trafficking of lysosomal membrane proteins in polarized kidney cells. *Nephrologie* 17(7):347-50.
- Huotari, J. und A. Helenius
2011 Endosome maturation. *The EMBO journal* 30(17):3481-500.
- Huynh, K. K., E. L. Eskelinen, C. C. Scott, A. Malevanets, P. Saftig und S. Grinstein
2007 LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *The EMBO journal* 26(2):313-24.
- Jäger, S., C. Bucci, I. Tanida, T. Ueno, E. Kominami, P. Saftig und E. L. Eskelinen
2004 Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *Journal of cell science* 117(Pt 20):4837-48.
- Jäger, S., N. Gulbahce, P. Cimermancic, J. Kane, N. He, S. Chou, I. D'Orso, J. Fernandes, G. Jang, A. D. Frankel, T. Alber, Q. Zhou und N. J. Krogan
2011 Purification and characterization of HIV-human protein complexes. *Methods* 53(1):13-9.
- Janvier, K. und J. S. Bonifacino
2005 Role of the endocytic machinery in the sorting of lysosome-associated membrane proteins. *Molecular biology of the cell* 16(9):4231-42.
- Johnsson, N. und 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.
- Jorundsson, E., J. H. Lumsden und R. M. Jacobs
1999 Rapid staining techniques in cytopathology: a review and comparison of modified protocols for hematoxylin and eosin, Papanicolaou and Romanowsky stains. *Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology* 28(3):100-108.
- Jullig, M., W. V. Zhang, A. Ferreira und N. S. Stott
2006 MG132 induced apoptosis is associated with p53-independent induction of pro-apoptotic Noxa and transcriptional activity of beta-catenin. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 11(4):627-41.
- Kabe, Y., M. Ohmori, K. Shinouchi, Y. Tsuboi, S. Hirao, M. Azuma, H. Watanabe, I. Okura und H. Handa
2006 Porphyrin accumulation in mitochondria is mediated by 2-oxoglutarate carrier. *The Journal of biological chemistry* 281(42):31729-35.

- Kabeysa, Y., N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E. Kominami, Y. Ohsumi und T. Yoshimori
2000 LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO journal* 19(21):5720-8.
- Keegan, L., G. Gill und M. Ptashne
1986 Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* 231(4739):699-704.
- Keel, S. B., R. T. Doty, Z. Yang, J. G. Quigley, J. Chen, S. Knoblaugh, P. D. Kingsley, I. De Domenico, M. B. Vaughn, J. Kaplan, J. Palis und J. L. Abkowitz
2008 A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis. *Science* 319(5864):825-8.
- Keyse, S. M. und R. M. Tyrrell
1990 Induction of the heme oxygenase gene in human skin fibroblasts by hydrogen peroxide and UVA (365 nm) radiation: evidence for the involvement of the hydroxyl radical. *Carcinogenesis* 11(5):787-91.
- Khan, A. A. und J. G. Quigley
2013 Heme and FLVCR-related transporter families SLC48 and SLC49. *Molecular aspects of medicine* 34(2-3):669-82.
- Kidane, T. Z., E. Sauble und M. C. Linder
2006 Release of iron from ferritin requires lysosomal activity. *American journal of physiology. Cell physiology* 291(3):C445-55.
- Kimura, S., T. Noda und T. Yoshimori
2007 Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy* 3(5):452-60.
- Klionsky, D. J. und S. D. Emr
2000 Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290(5497):1717-21.
- Knutson, M. und M. Wessling-Resnick
2003 Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 38(1):61-88.
- Kondo, H., K. Saito, J. P. Grasso und P. Aisen
1988 Iron metabolism in the erythrophagocytosing Kupffer cell. *Hepatology* 8(1):32-8.
- Konecki, D. S., K. Foetisch, K. P. Zimmer, M. Schlotter und U. Lichter-Konecki
1995 An alternatively spliced form of the human lysosome-associated membrane protein-2 gene is expressed in a tissue-specific manner. *Biochemical and biophysical research communications* 215(2):757-67.
- Kornfeld, S. und I. Mellman
1989 The biogenesis of lysosomes. *Annual review of cell biology* 5:483-525.
- Kovtunovych, G., M. A. Eckhaus, M. C. Ghosh, H. Ollivierre-Wilson und T. A. Rouault
2010 Dysfunction of the heme recycling system in heme oxygenase 1-deficient mice: effects on macrophage viability and tissue iron distribution. *Blood* 116(26):6054-62.
- Krishnamurthy, P. C., G. Du, Y. Fukuda, D. Sun, J. Sampath, K. E. Mercer, J. Wang, B. Sosa-Pineda, K. G. Murti und J. D. Schuetz
2006 Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter. *Nature* 443(7111):586-9.
- Kuma, A., M. Hatano, M. Matsui, A. Yamamoto, H. Nakaya, T. Yoshimori, Y. Ohsumi, T. Tokuhiya und N. Mizushima
2004 The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432(7020):1032-6.
- Kundra, R. und S. Kornfeld
1999 Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. *The Journal of biological chemistry* 274(43):31039-46.

- Kurz, T., J. W. Eaton und U. T. Brunk
2011 The role of lysosomes in iron metabolism and recycling. *The international journal of biochemistry & cell biology* 43(12):1686-97.
- Laemmli, U. K.
1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-5.
- Lang, F., I. Szabo, A. Lepple-Wienhues, D. Siemen und E. Gulbins
1999 Physiology of Receptor-Mediated Lymphocyte Apoptosis. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* 14:194-200.
- Lang, K. S., S. Myssina, V. Brand, C. Sandu, P. A. Lang, S. Berchtold, S. M. Huber, F. Lang und T. Wieder
2004 Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes. *Cell death and differentiation* 11(2):231-43.
- Lathrop, J. T. und M. P. Timko
1993 Regulation by heme of mitochondrial protein transport through a conserved amino acid motif. *Science* 259(5094):522-5.
- Lawrence, B. P. und W. J. Brown
1992 Autophagic vacuoles rapidly fuse with pre-existing lysosomes in cultured hepatocytes. *Journal of cell science* 102 (Pt 3):515-26.
- Lewis, V., S. A. Green, M. Marsh, P. Vihko, A. Helenius und I. Mellman
1985 Glycoproteins of the lysosomal membrane. *The Journal of cell biology* 100(6):1839-47.
- Lichter-Konecki, U., S. E. Moter, B. R. Krawisz, M. Schlotter, C. Hipke und D. S. Konecki
1999 Expression patterns of murine lysosome-associated membrane protein 2 (Lamp-2) transcripts during morphogenesis. *Differentiation; research in biological diversity* 65(1):43-58.
- Light, W. R., 3rd und J. S. Olson
1990 Transmembrane movement of heme. *The Journal of biological chemistry* 265(26):15623-31.
- Lin, Q., S. Weis, G. Yang, Y. H. Weng, R. Helston, K. Rish, A. Smith, J. Bordner, T. Polte, F. Gaunitz und P. A. Dennery
2007 Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* 282(28):20621-33.
- Lippincott-Schwartz, J. und D. M. Fambrough
1986 Lysosomal membrane dynamics: structure and interorganellar movement of a major lysosomal membrane glycoprotein. *The Journal of cell biology* 102(5):1593-605.
- Liu, B., H. Du, R. Rutkowski, A. Gartner und X. Wang
2012 LAAT-1 is the lysosomal lysine/arginine transporter that maintains amino acid homeostasis. *Science* 337(6092):351-4.
- Lloyd, J. B. und S. Forster
1986 The lysosome membrane. *Trends in Biochemical Sciences* 11(9):365-368.
- Lock, R. und J. Debnath
2008 Extracellular matrix regulation of autophagy. *Current opinion in cell biology* 20(5):583-8.
- Luzio, J. P., P. R. Pryor und N. A. Bright
2007 Lysosomes: fusion and function. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8(8):622-32.
- Meusser, B., C. Hirsch, E. Jarosch und T. Sommer
2005 ERAD: the long road to destruction. *Nature cell biology* 7(8):766-72.
- Mizushima, N. und M. Komatsu
2011 Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147(4):728-41.
- Mizushima, N. und B. Levine
2010 Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nature cell biology* 12(9):823-30.

- Mizushima, N., B. Levine, A. M. Cuervo und D. J. Klionsky
2008 Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451(7182):1069-75.
- Molzer, C., H. Huber, A. Steyrer, G. Ziesel, A. Ertl, A. Plavotic, M. Wallner, A. C. Bulmer und K. H. Wagner
2012 In vitro antioxidant capacity and antigenotoxic properties of protoporphyrin and structurally related tetrapyrroles. *Free radical research* 46(11):1369-77.
- Moser, H. W., T. Linke, A. H. Fenson und et al.
2001 Acid ceramidase deficiency: Farber lipogranulomatosis. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease* 3573-3588.
- Müller-Eberhard, U. und M. Fraig
1993 Bioactivity of heme and its containment. *American journal of hematology* 42(1):59-62.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn und H. Erlich
1986 Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51 Pt 1:263-73.
- Munoz, M., I. Villar und J. A. Garcia-Erce
2009 An update on iron physiology. *World journal of gastroenterology : WJG* 15(37):4617-26.
- Munro, S.
2004 Organelle identity and the organization of membrane traffic. *Nature cell biology* 6(6):469-72.
- Nabi, I. R., A. Le Bivic, D. Fambrough und E. Rodriguez-Boulan
1991 An endogenous MDCK lysosomal membrane glycoprotein is targeted basolaterally before delivery to lysosomes. *The Journal of cell biology* 115(6):1573-84.
- Nath, K. A., G. Balla, G. M. Vercellotti, J. Balla, H. S. Jacob, M. D. Levitt und M. E. Rosenberg
1992 Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat. *The Journal of clinical investigation* 90(1):267-70.
- Neiss, W. F.
1984 A coat of glycoconjugates on the inner surface of the lysosomal membrane in the rat kidney. *Histochemistry* 80(6):603-8.
- Nemeth, E., S. Rivera, V. Gabayan, C. Keller, S. Taudorf, B. K. Pedersen und T. Ganz
2004a IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *The Journal of clinical investigation* 113(9):1271-6.
- Nemeth, E., M. S. Tuttle, J. Powelson, M. B. Vaughn, A. Donovan, D. M. Ward, T. Ganz und J. Kaplan
2004b Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306(5704):2090-3.
- Nicolas, G., C. Chauvet, L. Viatte, J. L. Danan, X. Bigard, I. Devaux, C. Beaumont, A. Kahn und S. Vaulont
2002 The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *The Journal of clinical investigation* 110(7):1037-44.
- Nicolas, G., L. Viatte, D. Q. Lou, M. Bennoun, C. Beaumont, A. Kahn, N. C. Andrews und S. Vaulont
2003 Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis. *Nature genetics* 34(1):97-101.
- Nishino, I., J. Fu, K. Tanji, T. Yamada, S. Shimojo, T. Koori, M. Mora, J. E. Riggs, S. J. Oh, Y. Koga, C. M. Sue, A. Yamamoto, N. Murakami, S. Shanske, E. Byrne, E. Bonilla, I. Nonaka, S. DiMauro und M. Hirano
2000 Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature* 406(6798):906-10.
- O'Callaghan, K. M., V. Ayllon, J. O'Keefe, Y. Wang, O. T. Cox, G. Loughran, M. Forgac und R. O'Connor
2010 Heme-binding protein HRG-1 is induced by insulin-like growth factor I and associates with the vacuolar H⁺-ATPase to control endosomal pH and receptor trafficking. *The Journal of biological chemistry* 285(1):381-91.

- Ohno, H., J. Stewart, M. C. Fournier, H. Bosshart, I. Rhee, S. Miyatake, T. Saito, A. Gallusser, T. Kirchhausen und J. S. Bonifacino
1995 Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* 269(5232):1872-5.
- Pak, Y., W. K. Glowacka, M. C. Bruce, N. Pham und D. Rotin
2006 Transport of LAPT5 to lysosomes requires association with the ubiquitin ligase Nedd4, but not LAPT5 ubiquitination. *The Journal of cell biology* 175(4):631-45.
- Peters, C. und K. von Figura
1994 Biogenesis of lysosomal membranes. *FEBS letters* 346(1):108-14.
- Pitt, A., L. S. Mayorga, A. L. Schwartz und P. D. Stahl
1992 Transport of phagosomal components to an endosomal compartment. *The Journal of biological chemistry* 267(1):126-32.
- Ponka, P.
1997 Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells. *Blood* 89(1):1-25.
- Qi, Z., I. Hamza und M. R. O'Brian
1999 Heme is an effector molecule for iron-dependent degradation of the bacterial iron response regulator (Irr) protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(23):13056-61.
- Quigley, J. G., Z. Yang, M. T. Worthington, J. D. Phillips, K. M. Sabo, D. E. Sabath, C. L. Berg, S. Sassa, B. L. Wood und J. L. Abkowitz
2004 Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis. *Cell* 118(6):757-66.
- Rabinowitz, S. S. und S. Gordon
1991 Macrosialin, a macrophage-restricted membrane sialoprotein differentially glycosylated in response to inflammatory stimuli. *The Journal of experimental medicine* 174(4):827-36.
- Raden, D., S. Hildebrandt, P. Xu, E. Bell, F. J. Doyle, 3rd und A. S. Robinson
2005 Analysis of cellular response to protein overexpression. *Systems biology* 152(4):285-9.
- Raffin, S. B., C. H. Woo, K. T. Roost, D. C. Price und R. Schmid
1974 Intestinal absorption of hemoglobin iron-heme cleavage by mucosal heme oxygenase. *The Journal of clinical investigation* 54(6):1344-52.
- Rajagopal, A., A. U. Rao, J. Amigo, M. Tian, S. K. Upadhyay, C. Hall, S. Uhm, M. K. Mathew, M. D. Fleming, B. H. Paw, M. Krause und I. Hamza
2008 Haem homeostasis is regulated by the conserved and concerted functions of HRG-1 proteins. *Nature* 453(7198):1127-31.
- Rao, A. U., L. K. Carta, E. Lesuisse und I. Hamza
2005 Lack of heme synthesis in a free-living eukaryote. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(12):4270-5.
- Reczek, D., M. Schwake, J. Schröder, H. Hughes, J. Blanz, X. Jin, W. Brondyk, S. Van Patten, T. Edmunds und P. Saftig
2007 LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell* 131(4):770-83.
- Reggiori, F.
2006 1. Membrane origin for autophagy. *Current topics in developmental biology* 74:1-30.
- Rohrer, J., A. Schweizer, D. Russell und S. Kornfeld
1996 The targeting of Lamp1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosine sorting motif relative to the membrane. *The Journal of cell biology* 132(4):565-76.
- Russ, W. P. und D. M. Engelman
2000 The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *Journal of molecular biology* 296(3):911-9.

- Ryter, S. W. und R. M. Tyrrell
2000 The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free radical biology & medicine* 28(2):289-309.
- Ryter, S. W. und R.M. Tyrrell
1997 The role of heme oxygenase-1 in the mammalian stress response: molecular aspects of regulation and function. *Oxidative stress and signal transduction* Springer US:343-386.
- Saftig, P., Y. Tanaka, R. Lullmann-Rauch und K. von Figura
2001 Disease model: LAMP-2 enlightens Danon disease. *Trends in molecular medicine* 7(1):37-9.
- Sagne, C. und B. Gasnier
2008 Molecular physiology and pathophysiology of lysosomal membrane transporters. *Journal of inherited metabolic disease* 31(2):258-66.
- Sahu, R., S. Kaushik, C. C. Clement, E. S. Cannizzo, B. Scharf, A. Follenzi, I. Potolicchio, E. Nieves, A. M. Cuervo und L. Santambrogio
2011 Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Developmental cell* 20(1):131-9.
- Saido, T. C., H. Sorimachi und K. Suzuki
1994 Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 8(11):814-22.
- Salvador, N., C. Aguado, M. Horst und E. Knecht
2000 Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. *The Journal of biological chemistry* 275(35):27447-56.
- Samaniego, F., J. Chin, K. Iwai, T. A. Rouault und R. D. Klausner
1994 Molecular characterization of a second iron-responsive element binding protein, iron regulatory protein 2. Structure, function, and post-translational regulation. *The Journal of biological chemistry* 269(49):30904-10.
- Sassa, S.
2004 Why heme needs to be degraded to iron, biliverdin IXalpha, and carbon monoxide? *Antioxidants & redox signaling* 6(5):819-24.
- Sawkar, A. R., W. D'Haese und J. W. Kelly
2006 Therapeutic strategies to ameliorate lysosomal storage disorders--a focus on Gaucher disease. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63(10):1179-92.
- Saxena, R. K. und S. Khandelwal
2009 Aging and destruction of blood erythrocytes in mice. *Current Science* 97(4):500-507.
- Sazawal, S., U. Dhingra, P. Dhingra, A. Dutta, H. Shabir, V. P. Menon und R. E. Black
2014 Efficiency of red cell distribution width in identification of children aged 1-3 years with iron deficiency anemia against traditional hematological markers. *BMC pediatrics* 14:8.
- Scheel, O., A. A. Zdebik, S. Lourdel und T. J. Jentsch
2005 Voltage-dependent electrogenic chloride/proton exchange by endosomal CLC proteins. *Nature* 436(7049):424-7.
- Schneede, A., C. K. Schmidt, M. Holtta-Vuori, J. Heeren, M. Willenborg, J. Blanz, M. Domansky, B. Breiden, S. Brodesser, J. Landgrebe, K. Sandhoff, E. Ikonen, P. Saftig und E. L. Eskelinen
2011 Role for LAMP-2 in endosomal cholesterol transport. *Journal of cellular and molecular medicine* 15(2):280-95.
- Schröder, B., C. Wrocklage, C. Pan, R. Jager, B. Kusters, H. Schafer, H. P. Elsasser, M. Mann und A. Hasilik
2007 Integral and associated lysosomal membrane proteins. *Traffic* 8(12):1676-86.
- Schuchman, E. H. und R. J. Desnick
2001 Niemann-Pick Disease Types A and B: Acid sphingomyelinase Deficiencies. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*:3589-3610.

- Schuermann, M.
1990 An expression vector system for stable expression of oncogenes. *Nucleic acids research* 18(16):4945-6.
- Schuske, K., M. T. Palfreyman, S. Watanabe und E. M. Jorgensen
2007 UNC-46 is required for trafficking of the vesicular GABA transporter. *Nature neuroscience* 10(7):846-53.
- Severance, S. und I. Hamza
2009 Trafficking of heme and porphyrins in metazoa. *Chemical reviews* 109(10):4596-616.
- Shih, W., A. Gallusser und T. Kirchhausen
1995 A clathrin-binding site in the hinge of the beta 2 chain of mammalian AP-2 complexes. *The Journal of biological chemistry* 270(52):31083-90.
- Srivastava, K. K., E. E. Cable, S. E. Donohue und H. L. Bonkovsky
1993 Molecular basis for heme-dependent induction of heme oxygenase in primary cultures of chick embryo hepatocytes. Demonstration of acquired refractoriness to heme. *European journal of biochemistry / FEBS* 213(3):909-17.
- Stagljar, I., C. Korostensky, N. Johnsson und S. te Heesen
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.
- Steenhuis, P., J. Froemming, T. Reinheckel und S. Storch
2012 Proteolytic cleavage of the disease-related lysosomal membrane glycoprotein CLN7. *Biochimica et biophysica acta* 1822(10):1617-28.
- Steinberg, B. E., K. K. Huynh, A. Brodovitch, S. Jabs, T. Stauber, T. J. Jentsch und S. Grinstein
2010 A cation counterflux supports lysosomal acidification. *The Journal of cell biology* 189(7):1171-86.
- Stypmann, J., P. M. Janssen, J. Prestle, M. A. Engelen, H. Kogler, R. Lullmann-Rauch, L. Eckardt, K. von Figura, J. Landgrebe, A. Mleczko und P. Saftig
2006 LAMP-2 deficient mice show depressed cardiac contractile function without significant changes in calcium handling. *Basic research in cardiology* 101(4):281-91.
- Sultana, G. S., S. A. Haque, T. Sultana und A. N. Ahmed
2013 Value of red cell distribution width (RDW) and RBC indices in the detection of iron deficiency anemia. *Mymensingh medical journal : MMJ* 22(2):370-6.
- Sun, C. C., V. Vaja, J. L. Babitt und H. Y. Lin
2012 Targeting the hepcidin-ferroportin axis to develop new treatment strategies for anemia of chronic disease and anemia of inflammation. *American journal of hematology* 87(4):392-400.
- Sun, J., H. Hoshino, K. Takaku, O. Nakajima, A. Muto, H. Suzuki, S. Tashiro, S. Takahashi, S. Shibahara, J. Alam, M. M. Taketo, M. Yamamoto und K. Igarashi
2002 Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *The EMBO journal* 21(19):5216-24.
- Tanaka, Y., G. Guhde, A. Suter, E. L. Eskelinen, D. Hartmann, R. Lullmann-Rauch, P. M. Janssen, J. Blanz, K. von Figura und P. Saftig
2000 Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* 406(6798):902-6.
- Tenhunen, R., H. S. Marver und R. Schmid
1970 The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 75(3):410-21.
- Thompson, L. M., C. T. Aiken, L. S. Kaltenbach, N. Agrawal, K. Illes, A. Khoshnan, M. Martinez-Vincente, M. Arrasate, J. G. O'Rourke, H. Khashwji, T. Lukacsovich, Y. Z. Zhu, A. L. Lau, A. Massey, M. R. Hayden, S. O. Zeitlin, S. Finkbeiner, K. N. Green, F. M. LaFerla, G. Bates, L. Huang, P. H. Patterson, D. C. Lo, A. M. Cuervo, J. L. Marsh und J. S. Steffan
2009 IKK phosphorylates Huntingtin and targets it for degradation by the proteasome and lysosome. *The Journal of cell biology* 187(7):1083-99.

- Town, M., G. Jean, S. Cherqui, M. Attard, L. Forestier, S. A. Whitmore, D. F. Callen, O. Gribouval, M. Broyer, G. P. Bates, W. van't Hoff und C. Antignac
1998 A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nature genetics* 18(4):319-24.
- Tracz, M. J., J. Alam und K. A. Nath
2007 Physiology and pathophysiology of heme: implications for kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 18(2):414-20.
- Vanier, M. T. und G. Millat
2003 Niemann-Pick disease type C. *Clinical genetics* 64(4):269-81.
- Verheijen, F. W., E. Verbeek, N. Aula, C. E. Beerens, A. C. Havelaar, M. Joosse, L. Peltonen, P. Aula, H. Galjaard, P. J. van der Spek und G. M. Mancini
1999 A new gene, encoding an anion transporter, is mutated in sialic acid storage diseases. *Nature genetics* 23(4):462-5.
- White, C., X. Yuan, P. J. Schmidt, E. Bresciani, T. K. Samuel, D. Campagna, C. Hall, K. Bishop, M. L. Calicchio, A. Lapierre, D. M. Ward, P. Liu, M. D. Fleming und I. Hamza
2013 HRG1 Is Essential for Heme Transport from the Phagolysosome of Macrophages during Erythrophagocytosis. *Cell metabolism* 17(2):261-70.
- Wilke, S., J. Krausze und K. Bussow
2012 Crystal structure of the conserved domain of the DC lysosomal associated membrane protein: implications for the lysosomal glyocalyx. *BMC biology* 10:62.
- Willenborg, M.
2007 Untersuchungen zum Lysosom als Funktionsträger bei der Cholesterinhomöostase und der angeborenen Immunabwehr, Biochemisches Institut, Christian-Albrechts Universität zu Kiel.
- Wixom, R. L., L. Prutkin und H. N. Munro
1980 Hemosiderin: nature, formation, and significance. *International review of experimental pathology* 22:193-225.
- Xilouri, M., O. R. Brekk, N. Landeck, P. M. Pitychoutis, T. Papasilekas, Z. Papadopoulou-Daifoti, D. Kirik und L. Stefanis
2013 Boosting chaperone-mediated autophagy in vivo mitigates alpha-synuclein-induced neurodegeneration. *Brain : a journal of neurology* 136(Pt 7):2130-46.
- Yanatori, I., M. Tabuchi, Y. Kawai, Y. Yasui, R. Akagi und F. Kishi
2010 Heme and non-heme iron transporters in non-polarized and polarized cells. *BMC cell biology* 11:39.
- Yang, F., X. B. Liu, M. Quinones, P. C. Melby, A. Ghio und D. J. Haile
2002 Regulation of reticuloendothelial iron transporter MTP1 (Slc11a3) by inflammation. *The Journal of biological chemistry* 277(42):39786-91.
- Yang, Z., J. D. Philips, R. T. Doty, P. Giraudi, J. D. Ostrow, C. Tiribelli, A. Smith und J. L. Abkowitz
2010 Kinetics and specificity of feline leukemia virus subgroup C receptor (FLVCR) export function and its dependence on hemopexin. *The Journal of biological chemistry* 285(37):28874-82.
- Yu, H., P. Braun, M. A. Yildirim, I. Lemmens, K. Venkatesan, J. Sahalie, T. Hirozane-Kishikawa, F. Gebreab, N. Li, N. Simonis, T. Hao, J. F. Rual, A. Dricot, A. Vazquez, R. R. Murray, C. Simon, L. Tardivo, S. Tam, N. Svrzikapa, C. Fan, A. S. de Smet, A. Motyl, M. E. Hudson, J. Park, X. Xin, M. E. Cusick, T. Moore, C. Boone, M. Snyder, F. P. Roth, A. L. Barabasi, J. Tavernier, D. E. Hill und M. Vidal
2008 High-quality binary protein interaction map of the yeast interactome network. *Science* 322(5898):104-10.
- Yuan, X., M. D. Fleming und I. Hamza
2013 Heme transport and erythropoiesis. *Current opinion in chemical biology* 17(2):204-11.
- Yuan, X., O. Protchenko, C. C. Philpott und I. Hamza
2012 Topologically conserved residues direct heme transport in HRG-1-related proteins. *The Journal of biological chemistry* 287(7):4914-24.

Zhang, C. und A. M. Cuervo

2008 Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function. *Nature medicine* 14(9):959-65.

Anhang

Tab. 11: Liste der putative Interaktionspartner von mLAMP-2A des Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screens. Neben der jeweiligen Anzahl an Interaktionstreffern wird die Protein Abkürzung und der vollständige Name angegeben. Die Qualität der Treffer unterteilt sich in IF = Sequenz befindet sich im Leserahmen (*in-frame*) mit dem *NubG-Tag*; NCD = die nicht für das Protein codierende Sequenz befindet sich im Vektor; OOF = die im Vektor codierte Sequenz befindet sich nicht im Leserahmen (*out-of-frame*) mit dem *NubG-Tag*; STOPP = ein Stoppcodon befindet sich zwischen Proteinsequenz und *NubG-Tag*. Eine zusätzliche Interaktion mit LIMP-2 ist für getestete Proteine angegeben.

mLAMP-2A Screen				
Anzahl	Abkürzung	Name	Qualität	LIMP-2 Interaktion
1	Atp6v0b; Atp6f	V-type proton ATPase 21 kDa proteolipid subunit	IF	Ja
3	Atpase6	Atpase 6	IF	Nein
1	Leprotl1	Leptin receptor overlapping transcript-like 1	IF	
1	Ndufaf3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 3	IF	
1	Plip; Plapi; Pmlp; Tm4sf11	Plasmolipin	IF	Ja
2	Selk	Selenoprotein K	IF	
12	Tecr; Gpsn2	Trans-2,3-enoyl-CoA reductase	IF	
2	Tmem147; Nifie14	Transmembrane protein 147	IF ab nt 113	Ja
1	Asph	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	IF ab nt 128	Ja
1	Slc7a4	Cationic amino acid transporter 4	IF ab nt 1443	Ja
1	Laptm4a; Mtrp	Lysosomal-associated transmembrane protein 4A	IF ab nt 372	
1	Spcs1; Spc12	Signal peptidase complex subunit 1	IF ab nt 49	
1	Zcwpw1; Pilrb2	zinc finger, CW type with PWWP domain 1	IF ab nt 713	Ja
1	Dazap2; Prtb	DAZ-associated protein 2	NCD	
1	Klc1; Kns2	Kinesin light chain 1	NCD	
2	Mbp; Shi	Myelin basic protein	NCD	
1	Rnf41; Flrf; Nrdp1	E3 ubiquitin-protein ligase NRDP1	NCD	
1	Smarca2; Baf190b; Brm; Snf2a; Snf2l2	Probable global transcription activator SNF2L2	NCD	
1	Zfp462	Zfp462 protein	NCD	
1	Armcx2; Kiaa0512	Armadillo repeat-containing X-linked protein 2	OOF	
1	Degs1; Degs; Des1; Mdes	Sphingolipid delta(4)-desaturase DES1	OOF	
1	Dtd1; Hars2	D-tyrosyl-tRNA(Tyr)deacylase 1	OOF	
1	Fdft1; Erg9	Squalene synthase	OOF	
4	Fth1; Fth	Ferritin heavy chain	OOF	
1	Gpm6b; M6b	Neuronal membrane glycoprotein M6-b	OOF	
1	Lrrc49	Leucine rich repeat-containing protein 49	OOF	
1	Ly6e; Ly67; Sca-1; Tsa-1	Lymphocyte antigen 6E	OOF	
1	Mtch2	Mitochondrial carrier homolog 2	OOF	
1	Ociad1; Asrij	O CIA domain-containing protein 1	OOF	
1	Plp1; Plp	Myelin proteolipid protein	OOF	
1	Prdx5; Prdx6	Peroxisome oxidin-5, mitochondrial	OOF	
1	Psmb3	Proteasome subunit beta type-3	OOF	

1	Rab6b; D9Bwg0185e	Ras-related protein Rab-6B	OOF	
1	Rab8a; Mel; Rab8	Ras-related protein Rab-8A	OOF	
6	Rela; Nfkb3	Transcription factor p65	OOF	
1	Slc25a4; Anc1; Ant1	ADP/ATP translocase 1	OOF	
1	Tchp	Trichoplein keratin filament-binding protein	OOF	
1	Acsl3; Acs3; Facl3	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 3	STOPP	
1	ApoE	Apolipoprotein E	STOPP	
1	Calm1; Calm; Cam, Cam1	Calmodulin	STOPP	
1	Pcm1	Pericentriolar material 1 protein	STOPP	
1	Rnf10; Kiaa0262; Rie2; Sid2705	RING finger protein 10	STOPP	
1	Smarcb1; Baf47; Ini1; Snf511	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily B member 1	STOPP	
1	Ubb	Polyubiquitin-B	STOPP	

Tab. 12: Liste der putative Interaktionspartner von mLAMP-2B des *Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screens*. Neben der jeweiligen Anzahl an Interaktionstreffern wird die Protein Abkürzung und der vollständige Name angegeben. Die Qualität der Treffer unterteilt sich in IF = Sequenz befindet sich im Leserahmen (*in-frame*) mit dem *NubG-Tag*; NCD = die nicht für das Protein codierende Sequenz befindet sich im Vektor; OOF = die im Vektor codierte Sequenz befindet sich nicht im Leserahmen (*out-of-frame*) mit dem *NubG-Tag*; STOPP = ein Stoppcodon befindet sich zwischen Proteinsequenz und *NubG-Tag*. Eine zusätzliche Interaktion mit LIMP-2 ist für getestete Proteine angegeben.

mLAMP-2B Screen				
Anzahl	Abkürzung	Name	Qualität	LIMP-2 Interaktion
1	0610007L01Rik	UPF0458 protein C7orf42 homolog	IF	
1	1110021J02Rik	Transmembrane and coiled-coil domain-containing protein C6orf129 homolog	IF	
1	Aqp4	Aquaporin-4	IF	Ja
2	Atp6v0b; Atp6f	V-type proton ATPase 21 kDa proteolipid subunit	IF	
2	Atpase6	Atpase 6	IF	
1	Cox4i1; Cox4; Cox4a	cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1	IF	
1	Cyb561d2; 101f6	Cytochrome b561 domain-containing protein 2	IF	Ja
1	Ergic3; Erv46; Sdbcag84	Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 3	IF	Ja
1	Itn2a; E25; Itm2	Integral membrane protein 2A	IF	
1	Leprotl1	Leptin receptor overlapping transcript-like 1	IF	
1	Pex14	Peroxisomal membrane protein PEX14	IF	Ja
1	Ppia; Cphn, CyP-18, CypA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	IF	Ja
1	Rps2; Lrep3; Rps4	40S ribosomal protein S2	IF	Ja
4	Selk	Selenoprotein K	IF	
1	Slc48a1; Hrg1	Heme transporter HRG1	IF	
1	Surf4; Surf-4	Surfeit locus protein 4	IF	
1	Sys1	Protein SYS1 homolog	IF	
11	Tecr; Gpsn2	Trans-2,3-enoyl-CoA reductase	IF	
2	Tmem223	Transmembrane protein 223	IF	Ja
1	Tmem35, TUF1	Transmembrane protein 35	IF	Ja
1	Tmem42	Transmembrane protein 42	IF	Ja
1	Tprg1; Fam79b; Tprg	Tumor protein p63-regulated gene 1 protein	IF	

1	Mlc1	Membrane protein MLC1	IF bis nt X	Ja
1	Ttr	Transthyretin	IF bis nt 139	
1	Asph	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	IF ab nt 115	Ja
1	Lrp3	low density lipoprotein receptor-related protein 3	IF ab nt 1314	Ja
1	Calcyon, Drd1ip, CALY	Neuron-specific vesicular protein calcyon	IF ab nt 263	
1	Gpm6a; M6a	Neuronal membrane glycoprotein M6-a	IF ab nt 303	
1	Tmem88	Transmembrane protein 88	IF ab nt 36	
2	Slc25a3	Phosphate carrier protein	IF ab nt 385	
4	Laptm4a; Mtrp	Lysosomal-associated transmembrane protein 4A	IF ab nt 49	
1	Fndc4; Fnmp1; Frcp1	Fibronectin type III domain-containing protein 4	IF ab nt 490	
2	Grina; Lag; Nmdara1	Glutamate [NMDA] receptor-associated protein 1	IF ab nt 696	
1	5730508B09Rik	Uncharacterized protein C4orf32 homolog	IF ab nt 76	
1	Atp6v0c; Atp6c; Atp6l; Atpl; Mvp	V-type proton ATPase 16 kDa protolipid subunit	IF ab nt 79	Ja
1	Tox2; RP23-117O11.2-003	TOX high mobility group box family member 2	IF ab nt 84	Ja
4	Spcs1; Spc12	Signal peptidase complex subunit 1	IF ab nt 92	
1	Arl6ip1; Arl6ip	ADP-ribosylation factor-like protein 6-interacting protein 1	IF bis nt X	
1	Ankdd1b	Ankyrin repeat and death domain-containing protein 1B	NCD	
1	Mtrnr2l		NCD	
2	Smarca2; Baf190b; Brm; Snf2a; Snf2l2	Probable global transcription activator SNF2L2	NCD	
1	Ube2v1; Croc1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	NCD	
1	Usp9x; Faf1; Fam	Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X	NCD	
1	Ddr2; Ntrkr3; Tkt; Tyro10	Discoidin domain-containing receptor 2	OOF	
1	Epha4; Sek; Sek1	Ephrin type-A receptor 4	OOF	
1	Fam69a		OOF	
1	Fth1; Fth	Ferritin heavy chain	OOF	
1	Itm2b	Integral membrane protein 2B	OOF	
1	Phactr1	Phosphatase and actin regulator 1	OOF	
3	Rela; Nfkb3	Transcription factor p65	OOF	
1	Rsrc2	Arginine/serine-rich coiled-coil protein 2	OOF	
1	Ywhah	14-3-3 protein eta	OOF	
1	Tbcb; Ckap1	Tubulin-folding cofactor B	STOPP	
1	Tsen34; Leng5; Sen34	tRNA-splicing endonuclease subunit Sen34	STOPP	

Tab. 13: Auflistung der Herstellerfirmen der zur Verwendung gekommenen Produkte.

Firmenname	Hauptsitz	Land
AbD Serotec	Raleigh, NC	USA
Agilent Technologies	Santa Clara	USA
Assistent, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH	Sondheim	Deutschland
BD Biosciences	Heidelberg	Deutschland
BioLegend	San Diego, CA	USA
BioRad	München	Deutschland
BioTek	Bad Friedrichshall	Deutschland

Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
Carl Zeiss AG	Oberkochen	Deutschland
Carmag	Muttenz	Schweiz
Cell Signaling Technology	Cambridge	England, UK
DKFZ	Heidelberg	Deutschland
DMSZ	Braunschweig	Deutschland
DNASTAR	Madison, WI	USA
DSHB	Iowa City, IA	USA
Dualsystems Biotech	Schlieren	Schweiz
eBioscience	San Diego, CA	USA
Emerson Industrial Automation	Danbury, CT	USA
Enzo Life Sciences	Farmingdale, NY	USA
Fluka	Buchs	Schweiz
GE Healthcare	Chalfont St Giles	England, UK
Ibis Biosciences	Carlsbad, CA	USA
ImmunoTools GmbH	Friesoythe	Deutschland
Intas	Göttingen	Deutschland
Invitrogen = Life Technologies	Carlsbad, CA	USA
Leica	Wetzlar	Deutschland
Lonza	Basel	Schweiz
Merck KGaA	Darmstadt	Deutschland
MoBiTec	Göttingen	Deutschland
Olympus	Shinjuku, Tokio	Japan
PAA	Cölbe	Deutschland
Pechiney	Lyon	Frankreich
PeqLab	Erlangen	Deutschland
PerkinElmer	Wellesley, MA	USA
Pierce	Rockford, IL	USA
Pineda Antikörper-Service	Berlin	Deutschland
Promega	Madison, WI	USA
Qiagen	Venlo, Provinz Limburg	Niederlande
Roche	Mannheim	Deutschland
Santa Cruz Biotechnology	Dallas, TX	USA
Sarstedt AG & Co	Nümbrecht	Deutschland
Sigma-Aldrich	St. Louis	USA
Ssniff Spezialitäten GmbH	Soest	Deutschland
Systemex	Norderstedt	Deutschland
Tecnomara Integra Biosciences GmbH	Fernwald	Deutschland
Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA	USA
TPP	Trasadingen	Schweiz
Tree Star Inc.	Ashland, OR	USA
Vector Labs	Burlingame, CA	USA
VWR	Radnor, PA	USA
Whatman GmbH	Dassel	Deutschland

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung des Lysosoms mit einigen lysosomalen Membranproteinen.	3
Abb. 2:	Exonstruktur des murinen lamp-2 mit den durch alternatives Spleißen entstehenden Isoformen.	4
Abb. 3:	Schematische Darstellung der LAMP-2 Proteinisoformen.	5
Abb. 4:	Schematische Darstellung der Makro- und Chaperon-vermittelten Autophagie.	9
Abb. 5:	Putative Topologie des HRG-1 Proteins.	13
Abb. 6:	Schematische Darstellung der Häm synthese.	15
Abb. 7:	Schematische Übersicht der Hämdegradation nach Erythrophagozytose.	17
Abb. 8:	Schematische Darstellung zweier Protein-Interaktionsscreens.	19
Abb. 9:	Validierung des mLAMP-2A bzw. mLAMP-2B tragendem Bait-Vektors pTMBV4.	51
Abb. 10:	Interaktionsvalidierung von N-terminal getaggttem mHRG-1 mit mLAMP-2A, mLAMP-2B und mLIMP-2.	53
Abb. 11:	Interaktionsvalidierung zwischen C-terminal getaggttem mHRG-1 (pPR3-C) mit mLAMP-2A und mLAMP-2B.	54
Abb. 12:	Ko-Immunpräzipitation mit transient transfiziertem hHRG-1.	54
Abb. 13:	Ko-Immunpräzipitation mit transient transfiziertem hHRG-1.	55
Abb. 14:	Subzelluläre Lokalisation von transient transfiziertem, HA-getaggttem mHRG-1 in HeLa-Zellen.	56
Abb. 15:	Spezifische Detektion von HRG-1.	57
Abb. 16:	Knockdown von mHRG-1 durch siRNA.	58
Abb. 17:	Immunfluoreszenzaufnahme von mHRG-1 siRNA behandelten MEF-Zellen.	58
Abb. 18:	LAMP-2 Konzentration in HRG-1 Knockdown Zellen.	59
Abb. 19:	Subzelluläre Lokalisation von endogenem hHRG-1 in HeLa-Zellen.	60
Abb. 20:	LAMP-2 Proteingehalt in murinen embryonalen Fibroblasten von Wildtyp und LAMP-2 <i>Knockout</i> Tieren.	61
Abb. 21:	Subzelluläre Lokalisation von endogenem HRG-1 in Wildtyp und LAMP-2 <i>Knockout</i> MEF-Zellen.	62
Abb. 22:	Übersicht der verwendeten HRG-1 Konstrukte.	63
Abb. 23:	Einfluss von Temperatur auf das HRG-1 Signal im Western Blot.	63
Abb. 24:	Proteinmuster der mHRG-1, hHRG-1, myc-mHRG-1 und mHRG-1-HA Konstrukte.	64
Abb. 25:	Inhibierung der proteolytischen Spaltung von HRG-1.	65
Abb. 26:	Inhibierung der proteolytischen Spaltung von HRG-1.	66
Abb. 27:	Übersicht der verwendeten HRG-1 Konstrukte.	66
Abb. 28:	N-terminale HRG-1 Deletionsmutante.	67
Abb. 29:	Übersicht der verwendeten HRG-1 Konstrukte.	67
Abb. 30:	C-terminale HRG-1 Deletionsmutante.	68
Abb. 31:	Übersicht der verwendeten HRG-1 Konstrukte.	69
Abb. 32:	Subzelluläre Lokalisation der transient transfizierten HRG-1 Alaninmutanten in HeLa-Zellen.	70
Abb. 33:	HRG-1 Gehalt in Wildtyp und LAMP-2 <i>Knockout</i> MEFs.	71
Abb. 34:	HRG-1 Proteingehalt in Wildtyp und LAMP-2 <i>Knockout</i> Mausegeweben.	72
Abb. 35:	Mittels qRT-PCR ermittelte und auf Aktin normalisierte relative Häufigkeit des HRG-1 mRNA Gehalts in Wildtyp und LAMP-2 <i>Knockout</i> Organen.	72
Abb. 36:	Morphologie der Milz in Wildtyp und LAMP-2 <i>Knockout</i> Tieren.	73
Abb. 37:	HRG-1 Verteilung in Wildtyp und LAMP-2 <i>Knockout</i> Milzgewebeschnitten.	74
Abb. 38:	Ko-Lokalisation zwischen HRG-1 und Makrophagenmarkern in Wildtyp und LAMP-2 <i>Knockout</i> Milzgewebeschnitten.	75
Abb. 39:	Eisenablagerungen in Wildtyp und LAMP-2 <i>Knockout</i> Milzgewebeschnitten.	76
Abb. 40:	HRG-1 Verteilung in Wildtyp und LAMP-2 <i>Knockout</i> Milzgewebeschnitten.	77
Abb. 41:	Ko-Lokalisation zwischen HRG-1 und Fe ³⁺ -Ablagerungen in Wildtyp und LAMP-2 <i>Knockout</i> Milzgewebeschnitten.	77

Abb. 42: HO-1 Verteilung in Wildtyp und LAMP-2 <i>Knockout</i> Milzgewebeschnitten.	78
Abb. 43: Ko-Lokalisation zwischen HO-1 und Fe ³⁺ -Ablagerungen in Wildtyp und LAMP-2 <i>Knockout</i> Milzgewebeschnitten.	79
Abb. 44: HO-1 Proteinlevel in Wildtyp und LAMP-2 <i>Knockout</i> Milzen.	79
Abb. 45: Quantifizierung der Blutwerte von Wildtyp und LAMP-2 <i>Knockout</i> Mäusen.	80
Abb. 46: Durchflußzytometrische Analyse der Splenozyten in Wildtyp und LAMP-2 <i>Knockout</i> Mäusen.	82
Abb. 47: Anteil der CD11b ⁺ -Zellen in Wildtyp und LAMP-2 <i>Knockout</i> Milzen.	82
Abb. 48: Phagozytierte Erythrozyten in Knochenmarkmakrophagen im Hellfeld.	83
Abb. 49: Beispielhafte Darstellung phagozytierter Erythrozyten in Wildtyp Knochenmarkmakrophagen.	83
Abb. 50: Beispielhafte Darstellung phagozytierter Latexkügelchen in Wildtyp Knochenmarkmakrophagen.	84
Abb. 51: Beispielhafte Darstellung der HRG-1 Fluoreszenzmessung.	84
Abb. 52: Auswertung der Fluoreszenzintensität entlang eines Erythrozytenquerschnitts in Wildtyp und LAMP-2 <i>Knockout</i> Knochenmarkmakrophagen.	85
Abb. 53: Auswertung der Fluoreszenzintensität entlang eines Latexkügelchenquerschnitts in Wildtyp und LAMP-2 <i>Knockout</i> Knochenmarkmakrophagen.	85
Abb. 54: Darstellung der Fluoreszenzintensitätsauswertung am Beispiel der LAMP-2-Intensität in Wildtyp Makrophagen.	85
Abb. 55: Graphische Darstellung des Mittelwerts der Fluoreszenzintensität.	86
Abb. 56: Fluoreszenzintensität in Wildtyp und LAMP-2 <i>Knockout</i> Phagolysosomenmembranen nach Erythrophagozytose.	86
Abb. 57: Fluoreszenzintensität in Wildtyp und LAMP-2 <i>Knockout</i> Phagolysosomenmembranen nach Phagozytose von Latexkügelchen.	87
Abb. 58: Representative Darstellung der Fluoreszenzauswertung entlang der phagolysosomalen Membran in Wildtyp Knochenmarkmakrophagen.	87
Abb. 59: Fluoreszenzintensität pro Mikrometer Erythrophagosomenmembran in Wildtyp und LAMP-2 <i>Knockout</i> Makrophagen.	88
Abb. 60: Schematische Darstellung des <i>Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid</i> Nachweises für die Interaktion zwischen LAMP-2B und HRG-1 unter Annahme der von Rajagopal <i>et al.</i> (2008) beschriebenen Topologie.	94
Abb. 61: Schematische Darstellung des <i>Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid</i> Nachweises für die Interaktion zwischen LAMP-2B und HRG-1 unter Annahme der von O'Callaghan <i>et al.</i> (2010) beschriebenen Topologie.	94
Abb. 62: Schematische Darstellung des Eisenstoffwechselmodells in LAMP-2 <i>Knockout</i> Makrophagen.	105
Abb. 63: Schematische Darstellung der Fluoreszenzauswertung des Erythrophagozytoseversuchs in Makrophagen.	109

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Zelllinien und Bakterienstämme.	22
Tab. 2: Verwendete Plasmide.	23
Tab. 3: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte.	23
Tab. 4: Verwendete Primärantikörper.	24
Tab. 5: Verwendete Sekundärantikörper.	24
Tab. 6: Oligonukleotide der Genotypisierungs Polymerase-Kettenreaktionen.	26
Tab. 7: Übersicht der für qRT PCR Ansätze verwendeten Oligonukleotide und UPL Proben.	30
Tab. 8: Pipettierschema der qRT PCR-Ansätze.	31
Tab. 9: Liste der verwendeten Inhibitoren und die eingesetzten Konzentrationen.	34
Tab. 10: Ergebnisauswertung der <i>Split-Ubiquitin Yeast Two Hybrid Screens</i>	51
Tab. 11: Liste der putative Interaktionspartner von mLAMP 2A des <i>Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screens</i>	127
Tab. 12: Liste der putative Interaktionspartner von mLAMP 2B des <i>Split-Ubiquitin Yeast Two-Hybrid Screens</i>	128
Tab. 13: Auflistung der Herstellerfirmen der zur Verwendung gekommenen Produkte.	129

Lebenslauf

Name: Mirka Allerding
Geburtsdatum: 28. Januar 1982
Geburtsort: Kiel
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Promotion: am Biochemischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
seit März 2010 in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Paul Saftig
Thema: Charakterisierung des *Heme-Responsive Gene 1*-Proteins (HRG-1) als Interaktionspartner des Lysosomal-Assoziierten Membranproteins Typ 2 (LAMP-2)

2009 – 2010 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Klinische Molekularbiologie in Kiel im Exzellenzcluster „*Inflammation at Interfaces*“

Studium der Biologie: an der Christian-Albrechts Universität zu Kiel
2002 – 2008 Abschluss: Diplom
Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Karin Krupinska
Thema: ‚Chloroplasten-Vesikel‘ in Gerste (*Hordeum vulgare* L.) während der Seneszenz und unter Stressbedingungen

Schulbildung: Max-Planck Gymnasium, Kiel
1992 – 2001 Abschluss: Abitur

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Paul Saftig und Dr. Judith Blanz für die Möglichkeit der Promotion in dieser Arbeitsgruppe, die Bereitstellung von Arbeitsmitteln und die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit.

Desweiteren gilt mein Dank Prof. Dr. Roeder für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Meryem Senkara und Inez Götting danke ich für ihre zuverlässige und tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung verschiedener Experimente.

Den Mitarbeitern der AG Saftig, insbesondere Dr. Michelle Rothaug und Christian Raab, danke ich für ihre Freundschaft und eine schöne Zeit im Labor und außerhalb.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für ihre stete Unterstützung, während der Anfertigung dieser Arbeit und darüber hinaus.

Eidesstattliche Erklärung

Diese Arbeit entstand im Zeitraum von März 2010 bis März 2014 am Lehrstuhl von Herrn Prof. Dr. Paul Saftig am Biochemischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Hiermit versichere ich an Eides statt,

- Dass die Arbeit, abgesehen von der Beratung durch die Betreuer, nach Inhalt und Form die eigene ist und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel selbstständig verfasst wurde,
- Dass die Arbeit weder ganz, noch zu Teilen an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt oder zur Veröffentlichung eingereicht wurde,
- Dass die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist.

Die Bestimmungen der Promotionsprüfungsordnung sind mir bekannt.

Kiel, den 10. März 2014

Mirka Allerdig