

Identifizierung und Charakterisierung neuer  
Interaktionspartner des lysosomalen integralen  
Membranproteins Typ-2 (LIMP-2/SCARB2)

Dissertation

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

Vorgelegt von Frau Judith Peters  
Institut für Biochemie  
Kiel Oktober, 2014

Referent/in: Prof. Dr. Paul Saftig

Korreferent/in: Prof. Dr. Eric Beitz

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2014

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 15.12.2014

*Imagination is more than knowledge.  
Knowledge is limited. Imagination  
encircles the world.*

- Albert Einstein

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>3.1</b>	<b>DAS LYSOSOM ALS WICHTIGES ORGANELL FÜR DIE DEGRADATIONS- UND RECYCLINGPROZESSE IN DER ZELLE</b>	<b>3</b>
3.1.1	LYSOSOMALE PROTEINE UND DEREN FUNKTION	4
3.1.2	MUTATIONEN ODER FEHLSORTIERUNGEN LYSOSOMALER PROTEINE KÖNNEN LYSOSOMALE SPEICHERERKRANKUNGEN AUSLÖSEN	7
<b>3.2</b>	<b>DAS LYSOSOMALE INTEGRALE MEMBRAN PROTEIN TYP-2 (LIMP-2)</b>	<b>9</b>
3.2.1	LIMP-2 ERMÖGLICHT DEN TRANSPORT DER B-GLUKOCEREBROSIDASE INS LYSOSOM	11
3.2.2	LIMP-2 ALS REZEPTOR VERSCHIEDENER VIREN	12
3.2.3	MUTATIONEN IM HUMANEN LIMP-2 GEN FÜHREN ZUM <i>ACTION-MYOCLONUS AND RENAL FAILURE</i> (AMRF) SYNDROM	13
<b>3.3</b>	<b>PRAF2 ALS MEMBRANPROTEIN MIT NOCH UNBEKANNTER FUNKTION</b>	<b>15</b>
<b>3.4</b>	<b>VAMP-2 – EIN ESSENTIELLES SNARE-PROTEIN IN DER NEURONALEN REIZWEITERLEITUNG</b>	<b>17</b>
<b>3.5</b>	<b>DER PRORENIN REZEPTOR: FUNKTIONEN ALS REZEPTOR UND TEIL DER V-ATPASE</b>	<b>18</b>
3.5.1	DIE FUNKTION DES PRORENIN REZEPTORS ALS TEIL DER V-ATPASE IM WNT-SIGNALWEG	19
<b>3.6</b>	<b>CATHEPSIN F – EINE LYSOSOMALE CYSTEINPROTEASE</b>	<b>23</b>
3.6.1	CATHEPSIN F MUTATIONEN VERURSACHEN DIE TYP-B-KUFS-ERKRANKUNG	25
<b>4</b>	<b>ZIELSETZUNG</b>	<b>27</b>
<b>5</b>	<b>METHODEN</b>	<b>28</b>
<b>5.1</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>28</b>
5.1.1	POLYMERASE-KETTENREAKTION	28
5.1.2	AGAROSEGELELEKTROPHORESE	31
5.1.3	KLONIERUNGSEXPERIMENTE	32
5.1.4	RNA-ISOLIERUNG	35
5.1.5	QUANTITATIVE REAL TIME PCR	36
<b>5.2</b>	<b>ZELLBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>37</b>
5.2.1	KULTIVIERUNG VON ADHÄRENTEN ZELLEN	37
5.2.2	KRYOKONSERVIERUNG UND REAKTIVIERUNG VON ZELLINIEN	38
5.2.3	ERNTE DES WNT-3A ANGEREICHERTEN MEDIUMS	38



5.2.4	TRANSFEKTION	39
5.2.5	MANIPULATION VON PROTEASEN/TRANSPORTMECHANISMEN	40
<b>5.3</b>	<b>PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN</b>	<b>40</b>
5.3.1	HERSTELLUNG VON PROTEINLYSATEN AUS ZELLKULTUREN	40
5.3.2	HERSTELLUNG VON PROTEINLYSATEN AUS ORGANEN	41
5.3.3	MEMBRANPRÄPARATIONEN	41
5.3.4	BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION	42
5.3.5	N-GLYKOSIDASE F UND ENDOGLYKOSIDASE H VERDAU VON PROTEINEN	42
5.3.6	KOIMMUNPRÄZIPITATION	43
5.3.7	SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE	44
5.3.8	WESTERN BLOTTING	45
5.3.9	LUZIFERASE-ASSAY	46
5.3.10	TRITOSOMENPRÄPARATION	48
5.3.11	<i>IN VITRO</i> PROTEOLYSE-ASSAY	49
<b>5.4</b>	<b>MIKROSKOPISCHE METHODEN</b>	<b>50</b>
5.4.1	FIXIERUNG VON ZELLEN UND IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG VON PROTEINEN	50
5.4.2	PROBENAUFNAHME MIT EINEM KONFOKALEN LASER SCANNING MIKROSKOP	50
<b>5.5</b>	<b>STATISTISCHE AUSWERTUNGEN</b>	<b>51</b>
<b>5.6</b>	<b>ARBEITEN MIT MÄUSEN</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>52</b>
<b>6.1</b>	<b>LIMP-2 GEHT EINE STABILE DIMERISIERUNG EIN</b>	<b>53</b>
<b>6.2</b>	<b>IDENTIFIZIERUNG NEUER INTERAKTIONSPARTNER MITTELS HEK-SCREENS</b>	<b>58</b>
6.2.1	PRAF2 UND LIMP-2: MÖGLICHE INTERAKTIONSPARTNER IN NEURONALEN ZELLEN	61
6.2.2	VALIDIERUNG VON VAMP-2 ALS POTENZIELLER INTERAKTIONSPARTNER VON LIMP-2	71
<b>6.3</b>	<b>LIMP-2 UND DER PRORENIN REZEPTOR: PUTATIVE INTERAKTIONSPARTNER IM WNT-SIGNALWEG</b>	<b>79</b>
6.3.1	UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON LIMP-2 AUF DEN PRR	79
6.3.2	UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS DES LIMP-2 PROTEINS UND DES PRRS AUF DEN WNT-SIGNALWEG	83
<b>6.4</b>	<b>IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON LIMP-2 ALS SUBSTRAT VON CATHEPSIN F</b>	<b>89</b>
6.4.1	IDENTIFIZIERUNG VON CATHEPSIN F ALS PROTEASE VON LIMP-2	89
6.4.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTION DER LIMP-2 SPALTUNG DURCH CATHEPSIN F	100
6.4.3	FUNKTIONELLE ANALYSEN VON KUF5-ERKRANKUNG ASSOZIIERTEN CATHEPSIN F-MUTANTEN	102
<b>6.5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE</b>	<b>104</b>
<b>7</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>105</b>

<b>7.1</b>	<b>POTENZIELLE FUNKTIONEN VON LIMP-2 ALS MULTIMER</b>	<b>106</b>
<b>7.2</b>	<b>IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG NEUER INTERAKTIONSPARTNER VON LIMP-2 MITTELS AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE</b>	<b>108</b>
7.2.1	PRAF2 UND LIMP-2: MÖGLICHE INTERAKTIONSPARTNER IN NEURONALEN ZELLEN	108
7.2.2	VALIDIERUNG VON VAMP-2 ALS POTENZIELLER INTERAKTIONSPARTNER VON LIMP-2	111
<b>7.3</b>	<b>LIMP-2 UND DER PRORENIN REZEPTOR: MÖGLICHE INTERAKTIONSPARTNER IM WNT-SIGNALWEG</b>	<b>114</b>
<b>7.4</b>	<b>IDENTIFIZIERUNG VON CATHEPSIN F ALS PROTEASE VON LIMP-2</b>	<b>119</b>
7.4.2	LIMP-2 WIRD ALS LYSSOSOMALES MEMBRANPROTEIN DURCH CATHEPSINE PROZESSIERT	120
7.4.3	MODULATION DER LIMP-2 FUNKTIONALITÄT DURCH SPALTUNG IN DER LIGANDENBINDEREGION	120
7.4.4	MUTATIONEN VON CATHEPSIN F, DIE DIE TYP-B-KUFS-ERKRANKUNG AUSLÖSEN KÖNNEN, PROZESSIEREN	124
	LIMP-2 NICHT	124
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>126</b>
<b>9</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>139</b>
<b>9.1</b>	<b>LABORMATERIALIEN</b>	<b>139</b>
9.1.1	GERÄTE	139
9.1.2	MATERIALIEN	140
9.1.3	CHEMIKALIEN, REAGENZIEN, ENZYME	141
9.1.4	KITS UND FERTIGGELE	141
<b>9.2</b>	<b>ANTIKÖRPER</b>	<b>142</b>
9.2.1	PRIMÄRANTIKÖRPER	142
9.2.2	SEKUNDÄRANTIKÖRPER	143
<b>9.3</b>	<b>ZELLINIEN</b>	<b>144</b>
<b>9.4</b>	<b>REKOMBINANTE PROTEINE</b>	<b>145</b>
<b>9.5</b>	<b>OLIGONUKLEOTIDE, VEKTOREN, PLASMIDE</b>	<b>146</b>
9.5.1	EXPRESSIONSVEKTOREN	146
9.5.2	KONSTRUKTE	148
9.5.3	KLONIERUNGSPRIMER	150
9.5.4	PRIMER FÜR DIE QRT-PCR	151
<b>9.6</b>	<b>COMPUTER SOFTWARE</b>	<b>151</b>
<b>9.7</b>	<b>PUFFER, LÖSUNGEN</b>	<b>151</b>
<b>10</b>	<b>ANHANG</b>	<b>155</b>

<b>10.1</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>155</b>
<b>10.2</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>158</b>
<b>10.3</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>162</b>
<b>10.4</b>	<b>PUBLIKATIONEN UND POSTER</b>	<b>163</b>
<b>10.5</b>	<b>EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>164</b>
<b>10.6</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>165</b>

## 1 Zusammenfassung

Das lysosomale integrale Membranprotein Typ-2 (LIMP-2/SCARB2) ist wichtig für den Transport der lysosomalen Hydrolase  $\beta$ -Glukocerebrosidase vom Endoplasmatischen Retikulum ins lysosomale Kompartiment. Die eigentliche Funktion von LIMP-2 im Lysosom ist hingegen noch weitestgehend unbekannt. Mutationen in LIMP-2 führen im Menschen zum *Action-Myoclonus And Renal Failure* (AMRF)-Syndrom, einer Form der myoklonalen Epilepsie mit schweren Nierenfunktionsstörungen bis hin zu Nierenversagen. Mutationen innerhalb des Liganden von LIMP-2,  $\beta$ -Glukocerebrosidase, verursachen die Gaucher Erkrankung, dessen Symptome sich vom AMRF-Syndrom unterscheiden. Dies lässt auf weitere  $\beta$ -Glukocerebrosidase-unabhängige Funktionen von LIMP-2 schließen. Deshalb wurde nach weiteren mit LIMP-2 interagierenden Proteinen gesucht.

In der vorliegenden Arbeit konnten verschiedene Interaktionspartner von LIMP-2 identifiziert und charakterisiert werden, die die Funktion von LIMP-2 beeinflussen könnten. So wurden Interaktionen mit dem synaptischen SNARE-Protein VAMP-2 und dem ebenfalls neuronal assoziierten Rab-Akzeptor Protein PRAF2 verifiziert, was eine mögliche Funktion von LIMP-2 in der neuronalen Reizweiterleitung nahelegt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass LIMP-2 mit dem Prorenin Rezeptor (ATP6AP2) interagiert, einem Chaperon der vesikulären Protonenpumpe (v-ATPase). LIMP-2 zeigt hierbei einen negativen Effekt auf den durch den Prorenin Rezeptor-beeinflussten Wnt-Signalweg.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit eine Proteolyse des LIMP-2-Proteins selbst beschrieben und charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass Cathepsin F hauptverantwortlich für die Spaltung des endogen und heterolog exprimierten Proteins innerhalb seiner Ektodomäne in späten Endosomen/Lysosomen ist. Zusätzlich wurde die Ligandenbinderegion in LIMP-2 als wichtige Region zur Induktion der Spaltung identifiziert. Die Identifizierung von LIMP-2 als eines der ersten natürlichen Substrate von Cathepsin F ermöglichte es darüber hinaus die Folge von Mutationen im Gen für Cathepsin F, das die neuronale Lipofuszinose Kufs-Erkrankung auslöst, zu untersuchen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass alle *bis dato* identifizierten klinischen Cathepsin-F Mutanten LIMP-2 nicht mehr prozessieren können und dementsprechend proteolytisch inaktiv waren.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit Interaktionspartner von LIMP-2 identifiziert und charakterisiert werden, die in Zukunft die noch unbekannt Funktion von LIMP-2 in Lysosomen identifizieren können. Dabei könnte auch die Ursache, die zum AMRF-Syndrom führt, geklärt werden.

## 2 Summary

The lysosomal integral membrane protein type-2 (LIMP-2/ SCARB2) is important for the transport of the lysosomal hydrolase  $\beta$ -glucocerebrosidase from the endoplasmic reticulum to the lysosomal compartment. However, the actual function of LIMP-2 within lysosomes remains largely unknown. Mutations in LIMP-2 lead to the *Action Myoclonus And Renal Failure* (AMRF) syndrome, a form of myoclonic epilepsy associated with severe renal impairment and kidney failure. Mutations within the ligand of LIMP-2,  $\beta$ -glucocerebrosidase, cause Gaucher disease, which symptoms are different from the AMRF syndrome. This suggests further  $\beta$ -glucocerebrosidase-independent functions of LIMP-2. This prompted the search for additional LIMP-2 interacting proteins.

In the present work different interaction partners of LIMP-2 were identified and characterized, that could affect the function of LIMP-2. Thereby, interactions with the synaptic SNARE protein VAMP-2 and the neuronal-associated Rab acceptor protein PRAF2 were verified, suggesting a possible role of LIMP-2 in the neuronal transmission. In addition, it was shown in this work that LIMP-2 interacts with the prorenin receptor (ATP6AP2), a chaperone of the vesicular proton pump (v-ATPase). In this case LIMP-2 was shown to exert a negative effect on the Wnt-signaling pathway that is influenced by the prorenin receptor.

Furthermore, in this work a proteolysis of the LIMP-2 protein itself was described and characterized. It was shown that cathepsin F is mainly responsible for the cleavage of the endogenous and heterologous expressed protein within its ectodomain in late endosomes/lysosomes. In addition, the ligand binding region in LIMP-2 was revealed as an important region for induction of the cleavage. The identification of LIMP-2 as one of the first natural substrates of cathepsin F allowed it to examine the consequences of mutations in the gene encoding cathepsin F, that trigger the development of neuronal lipofuscinosis called Kufs disease. It could be shown that all so far identified clinical cathepsin F-mutants are not able to cleave LIMP-2 and accordingly were proteolytically inactive.

In summary, in this work interaction partner of LIMP-2 could be identified and characterized that could next to others clarify still unknown functions of LIMP-2 in lysosomes in future. This may thereby determine the cause that leads to the AMRF syndrome.

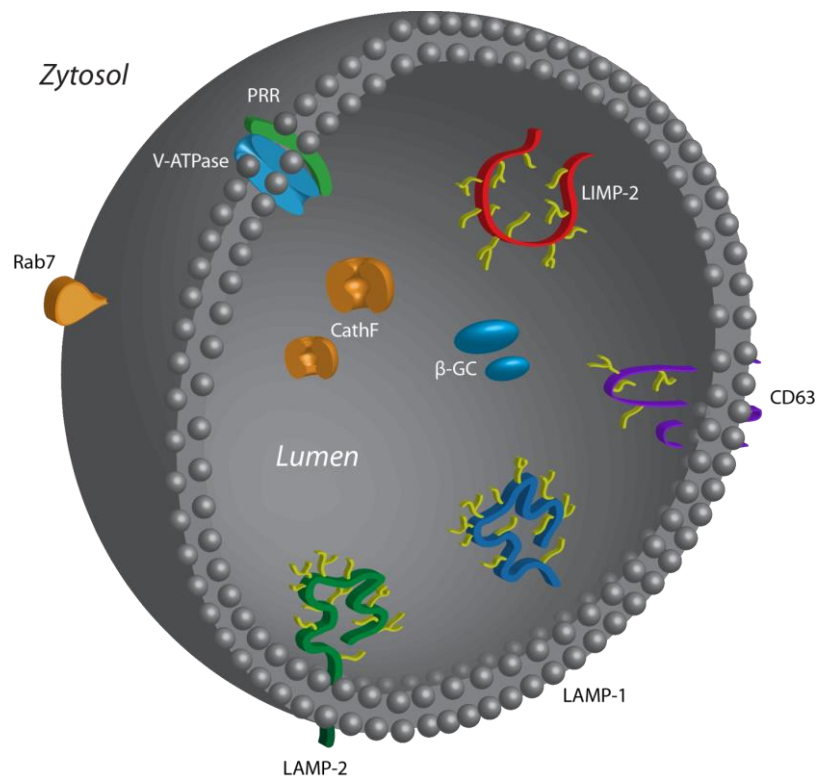
### **3 Einleitung**

#### **3.1 Das Lysosom als wichtiges Organell für die Degradations- und Recyclingprozesse in der Zelle**

Lysosomen sind Organellen in eukaryotischen Zellen, die 1955 von Christian DeDuve entdeckt wurden (DeDuve 1955). Lange wurde angenommen, dass diese Organellen lediglich als Degradations- und Recyclingsysteme der Zelle fungieren. Neuste Erkenntnisse zeigen allerdings auch fundamentale Funktionen im Energiemetabolismus, in der Beteiligung in zellulären Signalwegen und bei der Plasmamembranreparatur (Saftig and Klumperman 2009; Settembre et al. 2013).

Morphologisch handelt es sich bei Lysosomen um ubiquitär vorkommende Organellen in zellkerntragenden Zellen, die umschlossen werden von einer Lipid-Doppelmembran, die das saure Lumen vom Zytosol abgrenzt (Schulze et al. 2009) (Abb. 1). Des Weiteren beinhaltet die lysosomale Membran keine Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (Repnik et al. 2012). Lysosomen gehen aus der Maturierung oder Fusion später Endosomen hervor und sind durch einen niedrigen pH-Wert (4,6-5,0) gekennzeichnet. Der niedrige pH-Wert des Lumens ist essentiell, um die Funktionalität der lysosomalen Enzyme zu gewährleisten, da diese erst unter sauren pH-Wert Bedingungen ihr Aktivitätsoptimum erreichen (Lloyd and Forster 1986). Mittlerweile konnten ungefähr 60 Hydrolasen und Enzyme im Lysosomen identifiziert werden, die die Degradationsmaschinerie des Lysosoms bilden (Settembre et al. 2013). Die lysosomale Membran kann durch eine Glykokalyx-ähnliche Struktur dem sauren pH-Wert standhalten, die durch die an lysosomale Membranproteine gekoppelten Polysaccharide aufgebaut wird (Wilke et al. 2012). Diese hochglykosylierten lysosomalen Membranproteine machen den Großteil der lysosomalen Membranen aus (Andrejewski et al. 1999).

Extrazelluläre Abbauprodukte können durch Endozytose oder Phagozytose aufgenommen werden und das Lysosom auf endozytotischem Weg erreichen (Luzio et al. 2009; Saftig and Klumperman 2009). Intrazelluläre Makromoleküle werden durch Autophagie zum Abbau in das Lysosom transportiert (Kaushik and Cuervo 2012).



**Abb. 1 Schematische Darstellung eines Lysosoms und einige seiner Proteine.** Das Lysosom ist von einer Lipiddoppelmembran umgeben. Lysosomal-assoziierte (LAMP-1/2) und -integrale (LIMP-2, CD63) Membranproteine sind beispielhaft dargestellt. Die v-ATPase und ihr assoziiertes Protein, der Prorenin Rezeptor (PRR), sind essentiell für den Transport von  $H^+$ -Ionen über die Membran und ermöglichen dadurch die Azidifizierung des lysosomalen Lumens. Cathepsin F (CathF) und  $\beta$ -Glukocerebrosidase ( $\beta$ -GC) stehen beispielhaft für die verschiedensten Enzyme des Lysosoms. Rab7 als GTPase ist beispielsweise wichtig für die Fusion mit anderen Vesikeln/ Endosomen.

### 3.1.1 Lysosomale Proteine und deren Funktion

#### 3.1.1.1 Lysosomale Membranproteine: Vielfältige Aufgaben an und in der lysosomalen Membran

LAMP-1 und LAMP-2 (*lysosomal associated membrane proteins* – 1 and 2) machen 50% der vorkommenden lysosomalen Membranproteine aus (Andrejewski et al. 1999) und sind aufgrund ihres hohen Glykosilierungsgrades hauptverantwortlich für die Bildung der lysosomalen Glykokalyx (Wilke et al. 2012). Zusätzlich wurde gezeigt, dass LAMP-1 und LAMP-2 im Zusammenhang mit dem lysosomalen Cholesterinmetabolismus stehen (Eskelinen et al. 2004). Zellen, denen beide Proteine fehlen, zeigen eine starke Akkumulation von Cholesterin in Lysosomen. Außerdem zeigten diese Zellen Störungen in der Fusion später autophagozytischer Vesikel mit Lysosomen, was ein Hinweis auf eine Funktion der lysosomalen Membranproteine in der Vesikelfusion sein könnte.

Ein weiteres häufig vorkommendes lysosomales Membranprotein ist LIMP-2 (*lysosomal integral membrane protein type-2*). Dieses Protein spielt in dieser Arbeit eine zentrale Rolle und wird unter 3.2 näher beleuchtet. LIMP-2 besitzt wie die LAMPs viele Glykosylierungen,

ist aber vor allem wichtig für den Transport der lysosomalen Hydrolase  $\beta$ -Glukocerebrosidase ( $\beta$ -GC) vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) ins Lysosom (Reczek et al. 2007).

Essentielle, wenn auch nicht in großer Anzahl in der lysosomalen Membran vorkommende, lysosomale Membranproteine sind Proteine zur Aufrechterhaltung des sauren pH-Wertes im Lumen. Hierbei ist vor allem die v-Typ  $H^+$ -ATPase zu nennen, die durch den Verbrauch von ATP Protonen ins lysosomale Lumen transportiert und somit zum sauren pH-Wert beiträgt (Ohkuma et al. 1982). Neuste Studien konnten außerdem zeigen, dass die v-Typ  $H^+$ -ATPase wichtig zur Messung des lysosomalen Nährstoffgehalts ist und die entsprechenden Signale an den Nukleus weiterleiten kann (Zoncu et al. 2011). Eine akzessorische Untereinheit der v-Typ  $H^+$ -ATPase, der Prorenin Rezeptor (PRR), wird in dieser Arbeit als möglicher Interaktionspartner von LIMP-2 untersucht und unter 3.5 näher beschrieben. Weitere für die Azidifizierung des lysosomalen Lumens wichtige Membranproteine sind der Kationtransporter Mucolin 1 (MCOLN1) und der Zwei-Poren-Kalziumkanal 1 und 2 (TPC1/2) (Dong et al. 2008; Cang et al. 2013).

Um die Abbauprodukte aus dem Lumen der Lysosomen zu transportieren und so einer Wiederverwendung zugänglich zu machen, besitzt die lysosomale Membran zahlreiche spezielle Transporter für Aminosäuren und Mono- und Oligosaccharide (Eskelinen et al. 2003). Lysosomale Membranen besitzen zusätzliche Proteine zur Fusion mit Endosomen und der Plasmamembran. Darunter sind sowohl SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*)-Proteine wie VAMP7 und Syntaxin7 als auch Rab GTPasen wie Rab7 (Weber et al. 1998; Pfeffer 2001; Pryor et al. 2004).

### **3.1.1.2 Lysosomale Hydrolasen: Werkzeuge der intrazellulären Degradation**

Die lysosomalen Hydrolasen sind im Lumen des Organells lokalisiert. Diese Enzyme besitzen alle im sauren Milieu ihr Aktivitätsoptimum (Brix 2005). Viele Enzyme werden ubiquitär exprimiert, wobei einzelne auch nur zell- oder gewebespezifisch (z.B. Cathepsin K im Knochen und Cathepsin W in Immunzellen) vorkommen können (Dodds et al. 1998; Ondr and Pham 2004). Obwohl diese Enzyme als lysosomal beschrieben werden, sind sie auch in anderen Vesikeln des endosomalen Weges lokalisiert (Brix 2005). Grundsätzlich kann hierbei je nach Abbauprodukt zwischen Proteasen, Glykosidasen, Lipasen, Nukleasen, Phosphatasen und Sulfatasen unterschieden werden (Braulke and Bonifacino 2009). Die meisten lysosomalen Proteasen, welche die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysieren, gehören zur Familie der Cathepsine und sind Aspartyl-, Cystein-, oder Serinproteasen, die oft redundant fungieren können (Brix 2005). Cathepsin F wird in dieser Arbeit als Protease von LIMP-2 untersucht und unter 3.6 eingehender beschrieben.



Lysosomale Glykosidasen, die nach Spaltung der glykosidischen Bindung zwischen zwei Zuckern oder einem Zucker und einem weiteren organischen Rest das Zuckermolekül freisetzen, sind hingegen oft sehr spezifisch und zeigen untereinander nur wenige Homologien (Mason 1997). Verschiedene Lipasen werden vor allem zum Abbau von Membranbestandteilen wie Phospholipiden benötigt. Cholesterolester und Triglyceride werden im Lysosom hingegen von der sogenannten sauren Lipase A degradiert (Goldstein et al. 1975). Nukleasen werden in Desoxiribonukleasen und Ribonukleasen unterteilt, je nachdem ob sie DNA oder RNA abbauen (Howell et al. 2003). Phosphatasen oder Sulfatasen entfernen Phosphat beziehungsweise Sulfat von den zu degradierenden Makromolekülen (Braulke and Bonifacino 2009).

### **3.1.1.3 Der unterschiedliche Transport lysosomaler Membranproteine und lysosomaler Proteasen**

Lysosomale Enzyme werden hauptsächlich über den Mannose-6-Phosphat-Weg (M6P) ins Lysosom transportiert (Abb. 3). Hierfür besitzen die Enzyme ein N-terminales Signalpeptid, das wichtig für die Translokation der Proteine ins Lumen des ER ist, und auch dort abgespalten wird. Im ER werden die Enzyme glykosyliert, wobei ein Oligosaccharid, bestehend aus Glukose, Mannose und N-Acetylglukosamin (GlcNac), an ein Asparagin gebunden wird. Anschließend werden die Enzyme in den Golgi-Apparatus weiter transportiert. Hier wird mittels GlcNac-Phosphotransferase ein Phospho-GlcNac an die Mannose assoziiert. Eine Phosphodiesterase spaltet danach ebenfalls noch im Golgi das GlcNac ab, wodurch das Mannose-6-Phosphat zugänglich gemacht wird. M6P-Rezeptoren erkennen dann im Trans-Golgi-Netzwerk die entsprechenden lysosomalen Enzyme und transportieren sie zu frühen Endosomen, die dann zu späten Endosomen maturieren oder fusionieren, in denen beide Proteine aufgrund des niedrigen pH-Wertes dissoziieren. Die M6P-Rezeptoren werden anschließend recycelt (Abb. 3) (Braulke and Bonifacino 2009). Gewebs- und zellspezifisch können Enzyme auch durch spezifische Transporter ins Lysosom gelangen. Dies ist der Fall für das  $\beta$ -GC Enzym, das durch LIMP-2 transportiert wird (Reczek et al. 2007), und den Transporter Sortilin und seinen Liganden Cathepsin H (Canuel et al. 2008).

Lysosomale Membranproteine erreichen das Lysosom über einen anderen Weg als die Enzyme. Die Proteine werden im ER synthetisiert und in den Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) transportiert. Die meisten lysosomalen Membranproteine besitzen zytosolische Sortierungsmotive (Tyrosin oder Di-Leucin), die durch Adaptorproteine im TGN erkannt werden, wodurch die lysosomalen Membranproteine dann in Clathrin-Vesikeln Endosomen

erreichen (Bonifacino and Traub 2003; Braulke and Bonifacino 2009). Vereinzelt können lysosomale Membranproteine auch den TGN verlassen und zur Plasmamembran transportiert werden, wo sie dann durch den endozytotischen Weg das Lysosom erreichen (Janvier and Bonifacino 2005).

### **3.1.2 Mutationen oder Fehlsortierungen lysosomaler Proteine können lysosomale Speichererkrankungen auslösen**

Lysosomale Enzyme und Membranproteine sind essentiell für den Abbau von Makromolekülen in der Zelle und den Transport der degradierten Moleküle aus dem Lysosom. Können diese Proteine aufgrund von Fehlsortierung oder Fehlfunktion ihre Aufgaben nicht mehr ausführen, kann es zur Akkumulation der entsprechenden Makromoleküle im Lysosom kommen. Führt dies zu einem pathologischen Krankheitsbild, spricht man von lysosomalen Speichererkrankungen (*lysosomal storage disorders*, LSD) (Platt et al. 2012). Von diesen Erkrankungen ist jeder 5000. Neugeborene betroffen (Fuller et al. 2006).

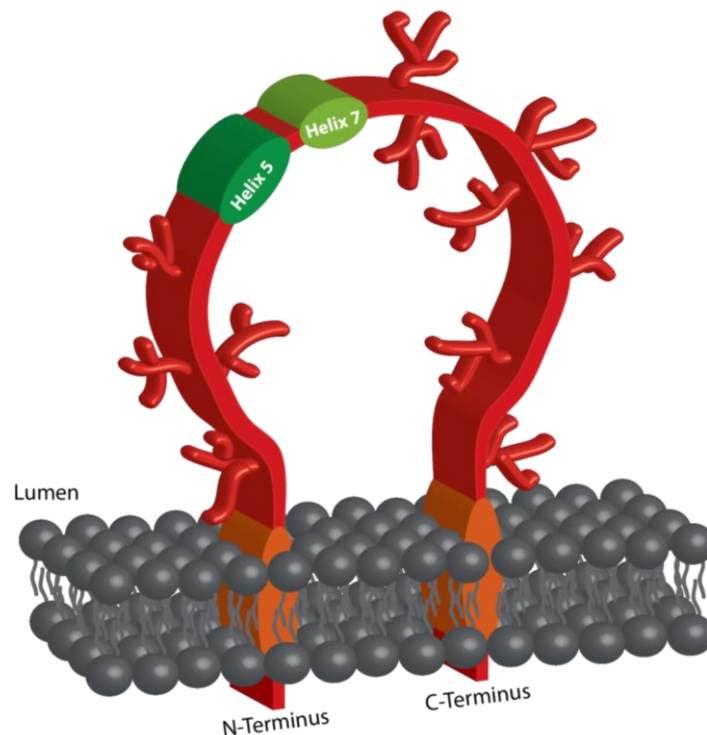
Da lysosomale Proteine in unterschiedlichen Zellen/Geweben exprimiert sein können, kann es je nach Erkrankung zu zellspezifischen Akkumulationen kommen. Dies führt dazu, dass sich LSDs nicht nur in den akkumulierenden Makromolekülen unterscheiden, sondern auch in den betroffenen Geweben und dem Alter der Patienten, in dem erste Symptome auftreten (Platt and Lachmann 2009). Bis heute sind ungefähr 45 verschiedene LSDs beschrieben, die vor allem durch eine Dysfunktion lysosomaler Hydrolasen entstehen (Meikle et al. 1999). Mutationen im Liganden von LIMP-2, der  $\beta$ -Glukocerebrosidase, sind mit Morbus Gaucher (*Gaucher disease*, GD) assoziiert. Die Mutation von  $\beta$ -GC führt dazu, dass Glykosylceramid nicht mehr in Ceramid und Glukose degradiert werden kann. Glykosylceramid reichert sich dann vor allem in Makrophagen der Milz, Leber, Lymphknoten und des Knochenmarks an. Diese Makrophagen werden als Gaucher-Zellen bezeichnet und dienen der Diagnose von GD (Wang et al. 2011). Das Krankheitsbild von GD kann in drei Subtypen unterteilt werden. Die häufigste Form ist Typ-1, die erst im Jugend- oder Erwachsenenalter erste Symptome zeigt. Dazu gehören vor allem Hepatosplenomegalie (vergrößerte Leber und Milz), Anämie, ein Mangel an Leuko- und Thrombozyten und Skelettdeformierungen. Typ-2 und 3 treten bereits im Kindesalter auf und unterscheiden sich vor allem im schnellen (Typ-2) bzw. langsameren (Typ-3) Verlauf der Erkrankung. Beiden Subtypen ist gemein, dass sie zusätzlich neurologische Symptome wie Muskelkrämpfe (Konvulsionen und Myoklonien), Demenz und mentale Retardierung zeigen (Wang et al. 2011). GD war die erste LSD, welche erfolgreich mittels Enzymersatztherapie behandelt werden konnte (Charrow 2009). Danach konnten mit

der gleichen Methode weitere LSDs, die durch fehlende/ mutierte Enzyme in Lysosomen entstehen, behandelt werden. Dazu gehört Morbus Fabry (Mutation der  $\alpha$ -Galactosidase A) (Lee et al. 2003), Morbus Pompe (Mutation in der  $\alpha$ -1,4-Glucosidase) und Mukopolysaccharidose (Mutationen in Enzymen zum Abbau von Glykosaminoglykanen) (Ohashi 2012).

Ein besonders häufiges Merkmal der LSDs sind Akkumulationen von Makromolekülen in Neuronen, die zu Neurodegenerationen bereits im Kindesalter oder auch erst später im Leben führen können. Diese Art der LSDs werden als Neuronale Ceroid-Lipofuszinosen (NCL) zusammengefasst (Schulz et al. 2013). Mutationen im lysosomalen Enzym Cathepsin F, das in dieser Arbeit näher untersucht wird, führen zur sogenannten Kufs-Erkrankung, welche eine Form der späten Neuronalen Ceroid-Lipofuszinose darstellt und 3.6.1 ausführlich beschrieben wird (Smith et al. 2013).

### 3.2 Das Lysosomale Integrale Membran Protein Typ-2 (LIMP-2)

Das lysosomale integrale Membranprotein Typ-2 (LIMP-2/ SCARB2/ LGP85) wurde erstmals 1991 charakterisiert (Fujita et al. 1991). LIMP-2 ist sowohl mit der Entstehung des *Action-myoclonus and renal failure* (AMRF) Syndroms assoziiert (Berkovic et al. 2008), als auch als Rezeptor für verschiedene Enteroviren beschrieben (Yamayoshi et al. 2012). Es handelt sich um ein ubiquitär exprimiertes, 478 Aminosäuren langes und etwa 85kDa schweres Membranprotein, das bis zu elf Glykosylierungsstellen besitzt, wobei die Glykosylierungen das Protein vor der schnellen Degradation in Lysosomen schützen (Barriocanal et al., 1986). Als Typ-III-Transmembranprotein sind jeweils ein 2-4 bzw. 20-21 Aminosäuren (AS) kurzer Teil des N- bzw. des C-Terminus des Proteins im Zytosol lokalisiert, wobei der Großteil (ca. 400 AS) als luminale Domäne in Lysosomen zu finden ist (Abb. 2) (Barriocanal et al. 1986; Vega et al. 1991, Fujita et al. 1991, Neculai et al. 2013).



**Abb. 2** Schematische Darstellung des Lysosomalen Integralen Membranproteins Typ-2 (LIMP-2). Als Typ-III-Transmembranprotein befinden sich sowohl der N- als auch der C-Terminus des Proteins im Zytosol. Die große luminale Domäne des Proteins ist stark glykosyliert. Helix 5 und Helix 7 stellen die entscheidenden Regionen zur Bindung des Liganden  $\beta$ -GC an LIMP-2 dar und sind nicht durch Glykosylierungen abgeschirmt.

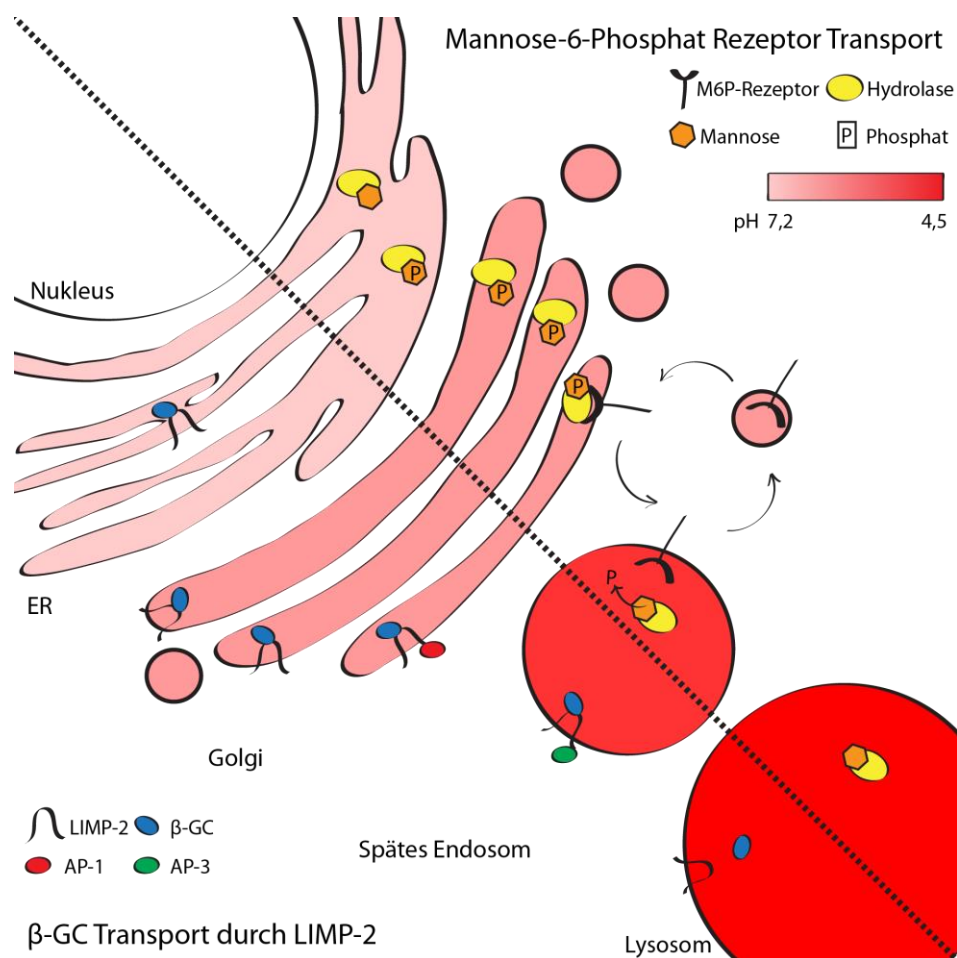
LIMP-2 wird zur CD36-Superfamilie gezählt. CD36 gehört zusammen mit LIMP-2 und SR-BI zu den Scavenger Klasse B Rezeptoren (Febbraio et al. 2001). CD36 und SR-BI sind bekannt dafür, dass sie Lipoproteine binden und somit eine essentielle Rolle im Fettstoffwechsel spielen (Neculai et al. 2013). Interessanterweise konnte nachgewiesen

werden, dass an gleicher Position, an der diese beiden Proteine die Lipoproteine binden, LIMP-2 mit seinem Liganden  $\beta$ -GC interagiert. Hierbei zeigt sich, dass die Ligandenbinderegion, die frei von Glykosylierungen ist, durch die drei  $\alpha$ -helices 5-7 in der luminalen Domäne des Proteins gebildet wird. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das LIMP-2-Protein mit seiner luminalen Domäne einen Kanal bilden kann. Die anderen Familienmitglieder transportieren durch diesen Kanal Cholesterin aus den Lipoproteinen (Neculai et al. 2013). Die potenziellen Substrate für die Kanalfunktion in LIMP-2 sind nicht bekannt. So zeigen sich starke strukturelle Ähnlichkeiten der Scavenger-Proteine bei sehr unterschiedlichen Funktionen in der Zelle.

LIMP-2 selbst wird ähnlich anderer lysosomaler Membranproteinen durch ein Sortierungsmotif im zytosolischen C-Terminus ins Lysosom transportiert. Dieses Di-Leucinmotif ([DE]XXXL[LI]) führt dazu, dass LIMP-2 direkt vom Golgi-Apparatus die Endosomen und somit das Lysosom erreicht, ohne den Umweg über die Plasmamembran und eine anschließende Endozytose zu gehen (Barriocanal et al. 1986; Vega et al. 1991; Ogata and Fukuda 1994; Braulke and Bonifacino 2009).

### 3.2.1 LIMP-2 ermöglicht den Transport der $\beta$ -Glukocerebrosidase ins Lysosom

Nachdem gezeigt werden konnte, dass  $\beta$ -Glukocerebrosidase Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-unabhängig ins Lysosom transportiert wird (Aerts et al. 1988; Rijnboutt et al. 1991; Reczek et al. 2007), konnten Affinitätschromatografie-Analysen 2007 zeigen, dass LIMP-2 wichtig für den Transport des Enzyms ins Lysosom ist (Reczek et al. 2007). Es zeigte sich, dass LIMP-2  $\beta$ -GC bereits im Endoplasmatischen Retikulum bindet und die Proteine dann ins Lysosomen wandern. Dort dissoziieren beide Proteine in Abhängigkeit vom sauren pH-Wert des lysosomalen Lumens (Abb. 3) (Zachos et al. 2012). Untersuchungen in LIMP-2-defizienten Zellen und Organen konnten zeigen, dass die Aktivität und die Proteinmenge von  $\beta$ -GC in diesen Zellen/ Geweben stark reduziert sind (Reczek et al. 2007).



**Abb. 3: Schematische Darstellung des LIMP-2 bzw. Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-abhängigen Transports lysosomaler Hydrolasen.** Lysosomale Hydrolasen werden durch ihr Signalpeptid ins Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert. Dort werden sie entweder am Mannose-6-Phosphat-Rezeptor phosphoryliert oder im Falle von  $\beta$ -Glukocerebrosidase ( $\beta$ -GC) direkt an LIMP-2 gebunden. Der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor bindet phosphorylierte Enzyme dann im Golgi-Apparat (Golgi) und transportiert sie weiter in späte Endosomen, wo Ligand und Rezeptor dissoziieren. Der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor wird dann zum Golgi-Apparat zurück transportiert.  $\beta$ -GC andererseits wird durch LIMP-2 vom ER bis ins Lysosom transportiert, wo dann beide Proteine dissoziieren.

Mit dem Transport von  $\beta$ -GC zum Lysosom konnte zwar eine essentielle Funktion von LIMP-2 aufgezeigt werden, doch beantwortet dies nicht die Frage, welche Funktion LIMP-2 im Lysosom selbst besitzt. Aufgrund der Tatsache, dass LIMP-2 zusammen mit den LAMPs den Großteil der lysosomalen Membran ausmacht (Andrejewski et al. 1999), scheint es wahrscheinlich, dass LIMP-2 auch im Lysosom essentielle Funktionen besitzt. Dabei ist der Einfluss von LIMP-2 auf die lysosomale Biogenese beschrieben worden. 2002 konnten Kuronita et al. zeigen, dass eine Überexpression von LIMP-2 in Cos7-Zellen, wie auch in anderen Zellkulturen, zu vergrößerten Vesikeln führt. Diese haben den Charakter von frühen und späten Endosomen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Entstehung dieser vergrößerten Endosomen abhängig ist von Rab5b, einer GTPase in frühen Endosomen (Kuronita et al. 2002).

### **3.2.2 LIMP-2 als Rezeptor verschiedener Viren**

Auch wenn LIMP-2 als endosomales/ lysosomales Protein bekannt ist, kann ein kleiner Teil an der zellulären Plasmamembran nachgewiesen werden (Yamayoshi et al. 2009). Kürzlich wurde gezeigt, dass LIMP-2 an dieser Stelle als Rezeptor für verschiedene Enteroviren dienen kann (Yamayoshi et al. 2009; Yamayoshi et al. 2012; Yamayoshi et al. 2012). Darunter sind Viren, die die Hand-Fuß-Mund-Erkrankung auslösen (Enterovirus 71 (EV71), Coxsackivirus A16 (CVA16)). Diese Erkrankung kommt weltweit epidemisch vor und wird direkt von Mensch zu Mensch übertragen. Symptome sind vor allem Fieber und Hautausschläge an Händen, Füßen und der Mundschleimhaut. In seltenen Fällen kann es vor allem bei der Infektion mit EV71 auch zu neurologischen Komplikationen wie Meningitis, Enzephalitis und akuten Gesichtslähmungen kommen (Chan et al. 2000). LIMP-2 ist in der Lage den EV71 Virus an der Plasmamembran zu binden. Interessanterweise wurde gezeigt, dass die Interaktion über die gleiche Interaktionsstelle im LIMP-2 Protein stattfindet, an die auch  $\beta$ -GC bindet. Nachdem LIMP-2 den EV71 gebunden hat, gelangt der Komplex in die Endosomen. Dabei kommt es zu einer pH-Wert-abhängigen Konformationsänderung in der Ligandenbindestelle von LIMP-2. Das hat zur Folge, dass die Hülle des Virus geöffnet wird und die viralen Nukleinsäuren freigesetzt werden. Somit bindet LIMP-2 nicht nur den EV71 an der Plasmamembran, sondern hilft auch beim Öffnen der Virenkapsel (Dang et al. 2014).

### 3.2.3 Mutationen im humanen LIMP-2 Gen führen zum *Action-myoclonus and renal failure* (AMRF) Syndrom

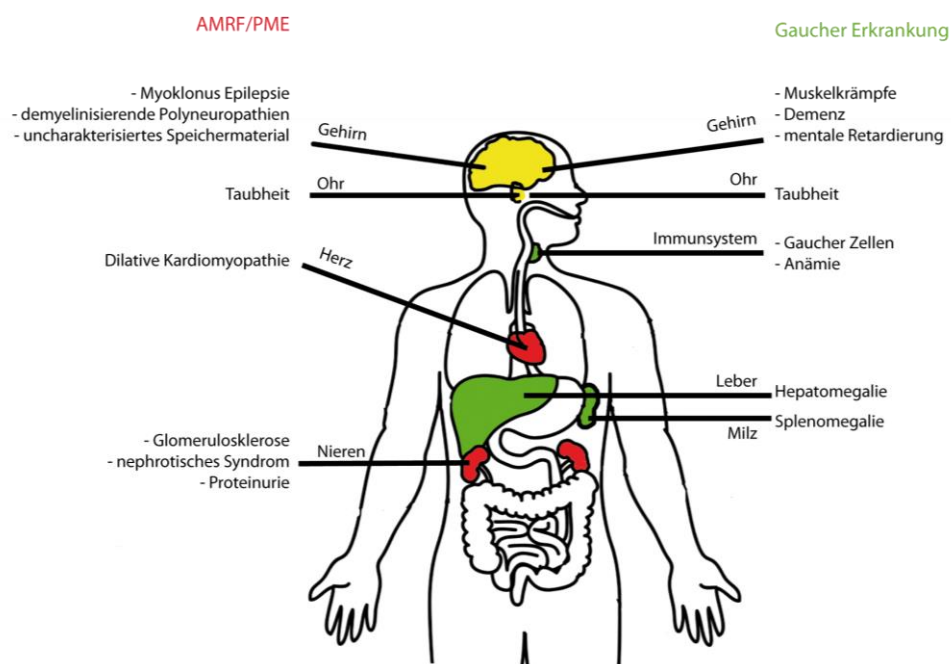
2008 konnte gezeigt werden, dass Mutationen in LIMP-2 zur progressiven Myoklonus Epilepsie (PME) führen können. Eine spezifische Form der durch LIMP-2-Mutation ausgelösten PME ist das *Action-myoclonus and renal failure* (AMRF) Syndrom (Balreira et al. 2008; Berkovic et al. 2008). PME ist eine seltene Form von Epilepsie (ca. 1% aller Epilepsiefälle), die auf bekannte Behandlungsformen nicht anspricht und somit eine schlechte Prognose aufweist (Shahwan et al. 2005). Das AMRF-Syndrom ist eine besondere Form der PME, da Patienten neben den Myoklonien (Muskelzuckungen) der PME auch schwere Nierenfunktionsstörungen (beginnend mit Proteinurie) aufweisen, die häufig zum Tod der Patienten im frühen Erwachsenenalter führen. Die AMRF-Patienten mit LIMP-2 Mutationen weisen zusätzlich auch eine Ataxie, milde sensomotorische Neuropathien, eine demyelinisierende Polyneuropathie, eine schwere Glomerulosklerose mit vollständigem Nierenversagen und Speichermaterial im Gehirn auf (Abb. 4) (Berkovic et al. 2008; Hopfner et al. 2011).

Wichtig ist hierbei, dass in Patientenzellen teilweise zwar niedrigere Proteinmengen an lysosomaler  $\beta$ -GC festgestellt werden können, diese aber nicht der entscheidende Faktor für die Ausprägung der Erkrankungen sind, da kein Morbus-Gaucher-Krankheitsbild zur Ausprägung kommt (Abb. 4) (Dardis et al. 2009; Blanz et al. 2010).  $\beta$ -GC scheint in diesen Patienten teilweise unabhängig von LIMP-2 das Lysosom zu erreichen und seine Funktion zu erfüllen. Das deutet auf weitere Funktionen von LIMP-2 unabhängig vom  $\beta$ -GC-Transport hin, die zur Ausprägung von AMRF und PME führen.

Die Defizienz von LIMP-2 in Mäusen hat einen Phänotyp, der nur teilweise mit den Symptomen des AMRF-Syndroms korreliert, zur Folge. LIMP-2-defiziente Mäuse weisen ebenfalls einen Nierenphänotyp auf, da bei diesen Mäusen die Entwicklung einer Hydronephrose mit einer Nierenbeckenabgangsstenose, einhergehend mit einer Proteinurie, festgestellt werden konnte (Gamp et al. 2003). Als Grund wird eine Störung der Membrantransportprozesse vermutet, da es zu einem starken Anstieg intrazellulärer Vesikel – vermutlich Lysosomen – in epithelialen Uretherzellen kommt (Gamp et al. 2003). Zusätzlich sind LIMP-2-defiziente Mäuse taub, was wahrscheinlich die Folge der Degeneration der *stria vascularis* im Innenohr ist (Knipper et al., 2006). Zusätzlich können in LIMP-2-defizienten Mäusen auch periphere demyelinisierende Polyneuropathien nachgewiesen werden, wie es ebenfalls für zwei AMRF-Patienten beschrieben ist. Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass LIMP-2-defiziente Mäuse eine leichte Ataxie sowie Speichermaterial in Neuronen und Astrozyten aufweisen, aber keine Glomerulosklerose wie die AMRF-Patienten entwickeln (Berkovic et al. 2008).



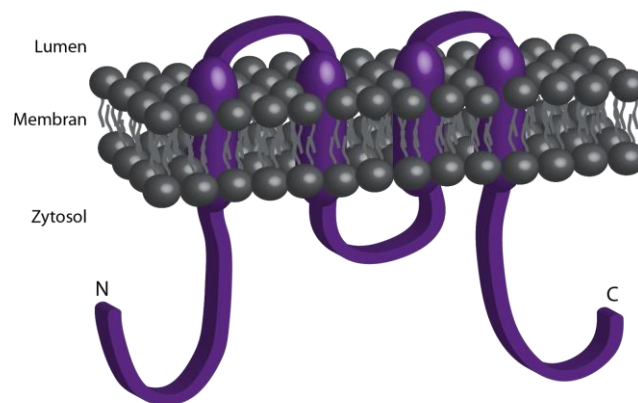
Nach der Entdeckung von LIMP-2 als Transporter von  $\beta$ -GC, wurden die Mäuse auch auf die Expression und Aktivität des Enzyms getestet. Beides war stark reduziert in den Geweben und Zellen der LIMP-2-defizienten Mäuse (Reczek et al. 2007). Neuste Untersuchungen der LIMP-2-defizienten Mäuse beschreiben noch weitere neurologische Pathologien. Die Defizienz von LIMP-2 führt, vermutlich aufgrund der Fehllokalisierung von  $\beta$ -GC, zu einer toxischen Akkumulation von  $\alpha$ -Synuclein in Neuronen des Gehirns. Eine  $\alpha$ -Synuclein Akkumulation ist ein Merkmal der Parkinson-Erkrankung. Eine Überexpression von LIMP-2 kann in Zellkultur-Experimenten die  $\alpha$ -Synuclein Akkumulation reduzieren und somit als Modulator für die Parkinson-Erkrankung fungieren (Rothaug et al. 2014).



**Abb. 4: Zusammenfassung der Symptome von Menschen mit LIMP-2-Mutationen bzw. Morbus-Gaucher Patienten.** Körperzeichnung nach superteacherworksheets.com. Quellen: Gamp et al. 2003, Berkovic et al. 2008, Uyama et al. 1987, Perandones et al. 2012, Veinot et al. 1999, Schroen et al. 2007; Hopfner et al. 2011, Conlon et al. 1999, Balreira et al. 2008; Berkovic et al. 2008, Becker-Cohen et al. 2005, Cox 2010, Chaves et al. 2011, Grabowski 2008.

### 3.3 PRAF2 als Membranprotein mit noch unbekannter Funktion

Das *PRA-1-domain family member 2* (PRAF2)-Protein wurde in dieser Arbeit als potenzieller Interaktionspartner von LIMP-2 untersucht. Es handelt es sich um ein Transmembranprotein, das vier putative Transmembrandomänen aufweist und dessen C- und N-Termini im Zytoplasma lokalisiert sind (Abb. 5). Sein Name leitet sich von seiner großen *prenylated Rab acceptor 1* (PRA1)-Domäne ab und daher zählt PRAF2 zur PRAF-Protein-Familie, die zusätzlich auch die Proteine PRAF1 (PRA1/ Prenylin/ Yip3) und PRAF3 (JWA/ GTRAP3-18) umfasst (Fo et al. 2006; Geerts et al. 2007).



**Abb. 5: Schematische Darstellung der Topologie des PRAF2-Proteins.** PRAF2 ist ein Transmembranprotein mit vier Transmembrandomänen. Sowohl der C- als auch der N-Terminus sind im Zytoplasma lokalisiert.

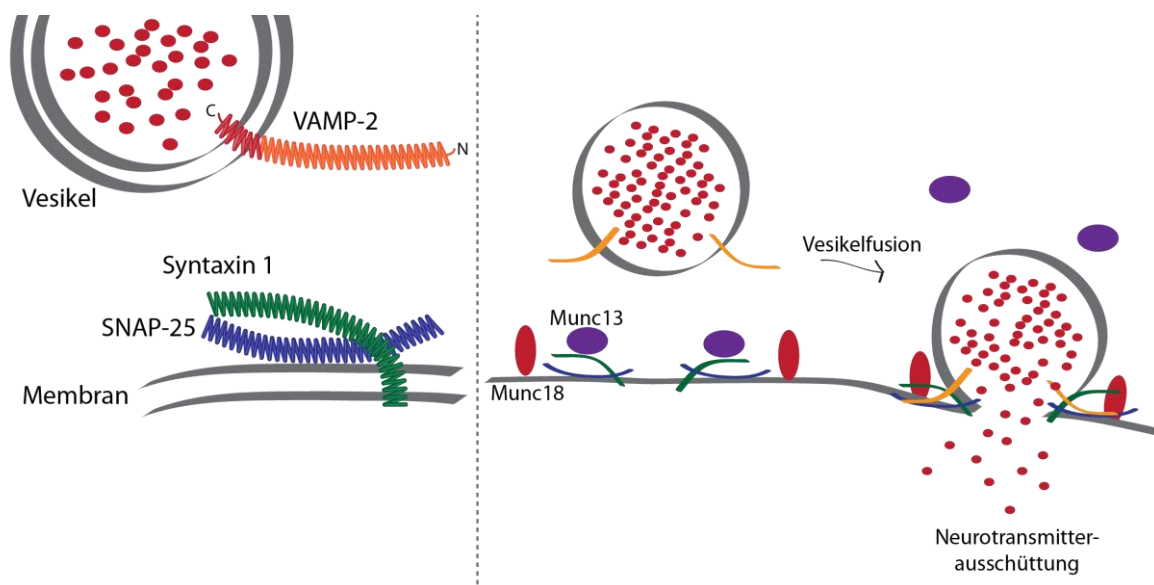
Das Protein ist 178 Aminosäuren lang und zeigt ein Molekulargewicht von circa 19kDa. Western-Blot-Analysen deuten auch auf eine Dimerisierung des Proteins hin (Fo et al. 2006; Geerts et al. 2007). PRAF2 ist in fast allen humanen Geweben exprimiert (Schweneker et al. 2005; Fo et al. 2006; Borsics et al. 2010), wobei mehrere Arbeitsgruppen eine vermehrte Proteinkonzentrationen in Tumorgeweben – vor allem Neuroblastomen (Geerts et al. 2007; Yco et al. 2013) – detektieren konnten (Fo et al. 2006; Borsics et al. 2010). Immunfluoreszenz-Analysen zeigten eine Lokalisation des Proteins mit Markerproteinen des Endoplasmatischen Reticulums und trans-Golgi Apparatus (Schweneker et al. 2005). Des Weiteren kann das Protein in nicht näher definierten punktuellen Strukturen im Zytoplasma detektiert werden (Geerts et al. 2007; Borsics et al. 2010).

Zunächst wurde PRAF2 als JM4 (*Jena-Muenchen 4*)-Protein beschrieben, das mit dem Korezeptor für HIV (*human immunodeficiency virus*) *CC chemokine receptor 5* (CCR5) interagiert (Schweneker et al. 2005). Aufgrund seiner Lokalisation und der Funktion verwandter Familienmitglieder wird vermutet, dass PRAF2 eine Funktion im vesikulären Transport vom ER zum Golgi und zur Plasmamembran besitzt. Des Weiteren könnte PRAF2 auch eine Rolle in

der Endozytose spielen, da das Protein eine Amphiphysin SH3-Domäne aufweist, die bekannt dafür ist mit Dynamin zu interagieren und somit eine Rolle bei der Clathrin-abhängigen Endozytose zu spielen (Schwenker et al. 2005; Fo et al. 2006; Geerts et al. 2007; Koomoa et al. 2008). Letztendlich wurde PRAF2 aber noch keine eindeutige Funktion zugeordnet.

### 3.4 VAMP-2 – ein essentielles SNARE-Protein in der neuronalen Reizweiterleitung

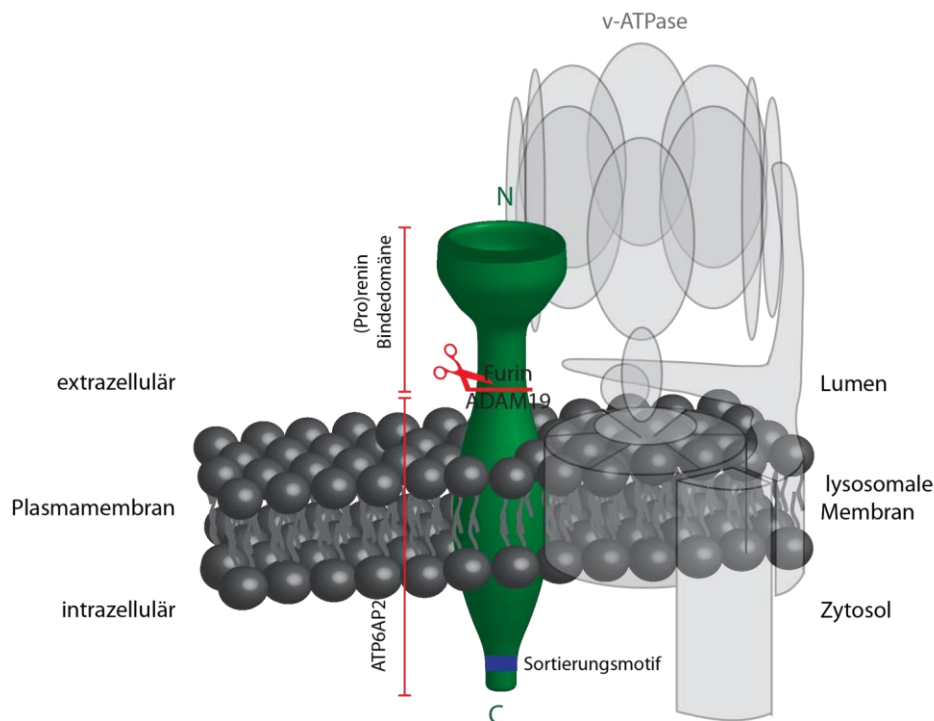
Ein weiteres in dieser Arbeit untersuchtes Protein ist das *Vesicle-associated membrane protein-2* (VAMP-2). VAMP-2 ist eine der beiden Isoformen von Synaptobrevin (Trimble et al. 1990). Synaptobrevin wurde 1989 zum ersten Mal als Protein in den für die Neurotransmitter-Sekretion wichtigen synaptischen Vesikeln in Neuronen beschrieben (Baumert et al. 1989). VAMP-2 ist ein circa 18kDa großes Typ-II-Transmembranprotein, das in seinem zytosolischen Teil ein SNARE-Motiv aufweist und somit zur Familie der SNARE-Proteine zählt (Baumert et al. 1989; Sutton et al. 1998; Deak et al. 2006). SNARE-Proteine sind essentiell für die Fusion von Membranen, dabei unterscheidet man zwischen den R- und den Q-SNAREs: SNARE-Proteine bilden  $\alpha$ -Helices aus, über die sie miteinander interagieren. An diesen Interaktionsstellen kann ein konserviertes Arginin (R) oder Glutamin (Q) im Protein vorhanden sein, das die SNAREs dementsprechend eingruppiert (Fasshauer 2003). Synaptobrevin ist ein R-SNARE auf synaptischen Vesikeln, das bei der Vesikelfusion mit der Plasmamembran mit den Q-SNAREs syntaxin 1 und SNAP (Synaptosomal-associated protein)-25 interagiert und dadurch zusammen mit weiteren Kofaktoren die Neurotransmitterausschüttung ermöglicht (Abb. 6) (Sollner et al. 1993; Weber et al. 1998; Hu et al. 2003).



**Abb. 6: Schematische Darstellung des VAMP-2-Proteins und der synaptischen Vesikelfusion.** VAMP-2 besitzt als Typ-II-Transmembranprotein eine C-terminale Transmembrandomäne und einen N-terminalen zytosolischen Bereich, der die SNARE-Domäne beinhaltet. VAMP-2 ist in die Membran von Vesikeln integriert. Syntaxin 1 und SNAP-25 sind als Q-SNARE-Proteine auf der Plasmamembran lokalisiert. Bei der Neurotransmitterausschüttung in Neuronen sind die synaptischen Vesikel mit Neurotransmittern beladen und VAMP-2 in der Membran lokalisiert. Das Protein kann dann mit den Q-SNAREs Syntaxin und SNAP-25 unter Einfluss weiterer Kofaktoren (Munc13/ 18) interagieren und die Vesikelfusion mit anschließender Neurotransmitterausschüttung ermöglichen.

### 3.5 Der Prorenin Rezeptor: Funktionen als Rezeptor und Teil der v-ATPase

Der Prorenin Rezeptor (PRR) wurde zum ersten Mal 2002 beschrieben (Nguyen et al. 2002). Nguyen et al. untersuchten das Renin-Angiotensin-System (RAS), das wichtig für die Kontrolle des Blutdrucks und des Natriumhaushalts in Säugetieren ist. Hierbei ist Renin bzw. seine inaktive Proform Prorenin die entscheidende Protease, die in der Niere im juxtaglomerulären Apparat gebildet und bei entsprechenden Stimuli, bei niedrigem Blutdruck oder niedriger Natriumkonzentration, ins Plasma sezerniert wird. Die Spaltung von Angiotensin im Plasma durch Renin aktiviert das RAS (Krop et al. 2013). Bei den Untersuchungen konnte ein Rezeptor von Renin und auch Prorenin identifiziert werden, der daraufhin als (Pro)Renin Rezeptor bezeichnet wurde (Nguyen et al. 2002).



**Abb. 7: Schematische Darstellung des Prorenin Rezeptors.** Der Prorenin Rezeptor ist ein Typ-1-Membranprotein, das die Membran einmal durchspannt und dessen C-Terminus ins Zytosol ragt. Dem kurzen C-terminalen Bereich folgen die Transmembrandomäne und ein großer N-terminaler Bereich, der entweder ins Lumen oder in den extrazellulären Raum ragen kann. Zwischen dem N- und dem C-Terminus befindet sich eine Furin- bzw. ADAM19-Schnittstelle, die das Protein in den C-terminalen (ATP6AP2) Bereich, der mit der v-ATPase interagiert und den N-terminalen Bereich, der wichtig für die (Pro)Reninbindung ist, teilt (v-ATPase nach Kinouchi et al., 2011).

Es konnte gezeigt werden, dass es sich um ein 35kDa Typ-I-Transmembranprotein handelt, das eine große N-terminale Domäne, eine Transmembrandomäne und einen kurzen zytosolischen Bereich mit potenziellen Phosphorylierungsstellen besitzt (Abb. 7) (Nguyen et al. 2002). Die N-terminale Domäne ist nur unter Vertebraten konserviert und dient der (Pro)Renin-Bindung. Der C-terminale Bereich ist hingegen in allen Metazoa zu finden und

wurde bereits 1998 als akzessorische Untereinheit der v-ATPase identifiziert und als ATP6AP2 bezeichnet (Ludwig et al. 1998; Burckle et al., 2006). Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei dem PRR um ein Protein handelt, das proteolytisch gespalten wird. Tatsächlich fanden 2009 Cousin et al. den N-terminalen Teil des PRRs als lösliche Form im Plasma und identifizierten darüber hinaus Furin als Protease zur Spaltung des PRRs in eine N-terminale und C-terminale Domäne (Cousin et al. 2009). 2011 konnten Yoshikawa et al. neben Furin auch ADAM19 als Protease ausmachen (Yoshikawa et al. 2011).

Bei der Untersuchung von Organen aus Ratten konnte der PRR zu einem großen Teil im Gehirn und zu geringeren Teilen in weiteren Organen wie Herz, Leber, Niere, Muskulatur, Pankreas und Ovarien detektiert werden (Nguyen et al. 2002). Die mRNA des PRRs kann ubiquitär nachgewiesen werden (Su et al. 2004). In Überexpression kolokalisiert der PRR mit Markern für das ER, dem Golgi-Apparatus und Endo- und Lysosomen (Cousin et al. 2009). Darüber hinaus befindet sich am C-Terminus des Proteins ein Tyrosin-basiertes Sortierungsmotif (YxxØ) für den Transport in Endosomen/ Lysosomen (Burckle et al., 2006). Durch die Bindung von (Pro)Renin an die N-terminale Domäne konnten dem PRR Funktionen im RAS, im *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalweg und der Translokation des Transkriptionsfaktors *promyelocytic leukemia zinc finger* (PLZF) nachgewiesen werden (Nguyen et al. 2002; Schefe et al. 2006). Der C-terminale Teil spielt als Untereinheit der v-ATPase eine Rolle im Wnt-Signalweg und zur Azidifizierung intrazellulärer Vesikel als Grundlage autophagozytotischen Abbaus und ist möglicherweise wichtig für die Assemblierung der v-ATPase (Kinouchi et al. 2010).

Bis heute ist eine Mutation des PRRs im Menschen bekannt (Ramser et al. 2005). Da Untersuchungen an Mäusen zeigten, dass eine Deletion des PRRs zum Tod im frühen embryonalen Stadium führt (Sihn et al. 2010), könnte dies auch beim Menschen der Fall sein und zu nicht lebensfähigen Individuen führen. Der eine Patient weist ein mutiertes, um Exon 4 verkürztes, PRR-Protein auf. Er zeigt mentale Retardierung und Epilepsie, allerdings keine Abnormalitäten im Herz-Kreislauf- oder Nierensystem (Ramser et al. 2005). Darüber hinaus sind lediglich Polymorphismen des PRRs bekannt, die ein Risiko für erhöhten Blutdruck und lakunäre Infarkte darstellen (Hirose et al. 2009; Hirose et al. 2011).

### 3.5.1 Die Funktion des Prorenin Rezeptors als Teil der v-ATPase im Wnt-Signalweg

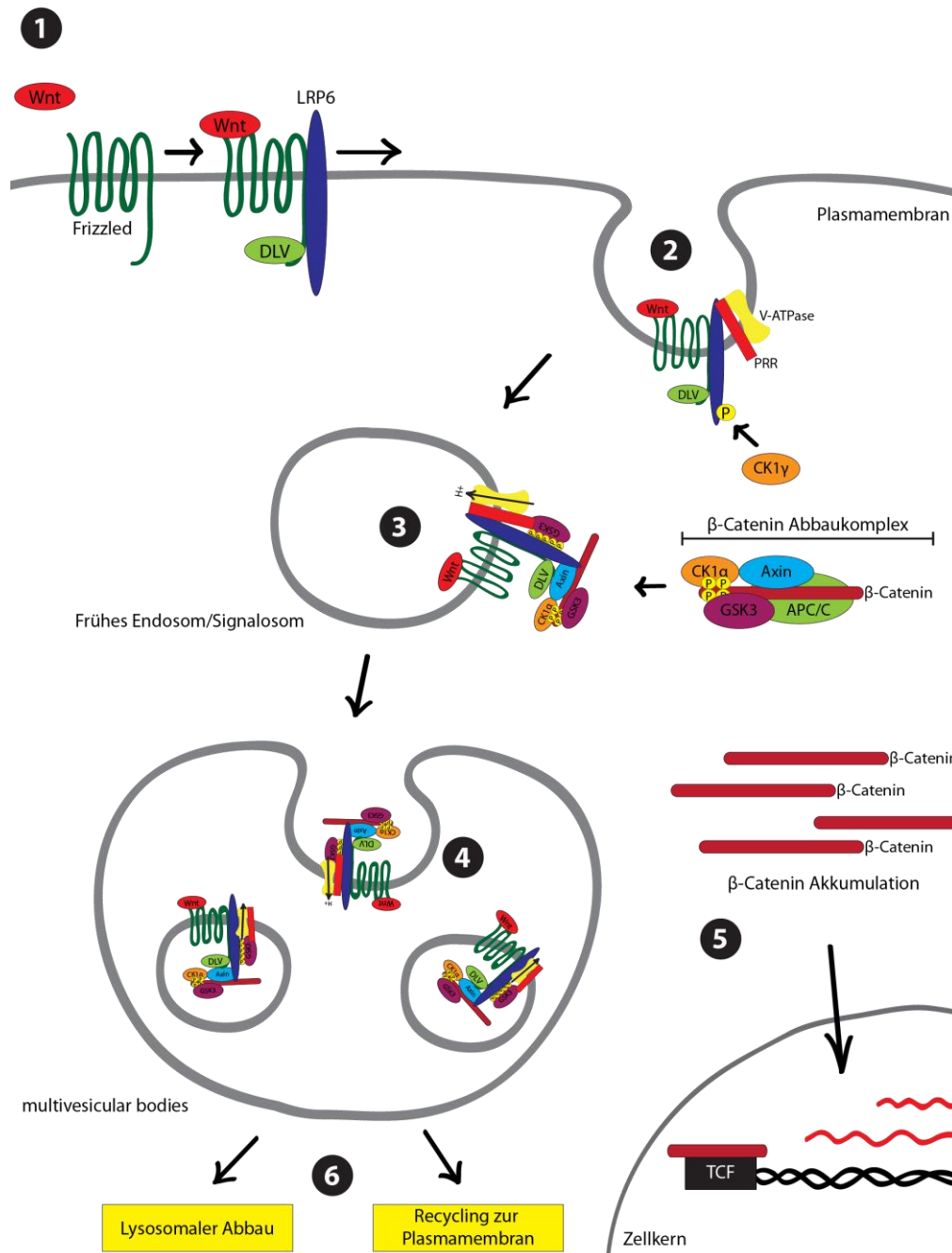
Der C-terminale Teil des PRRs wurde als erstes 1998 von Ludwig et al. als assoziierte Untereinheit der v-ATPase identifiziert (Ludwig et al. 1998). v-ATPasen sind vakuoläre H<sup>+</sup>-ATPasen, bei denen es sich um einen großen Proteinkomplex handelt, der den aktiven Transport von Protonen über die Membran ermöglicht. Diese Funktion spielt insbesondere bei der

Azidifizierung intrazellulärer Kompartimente eine Rolle, wodurch die v-ATPase auch ubiquitär exprimiert und in verschiedensten Organellen zu finden ist (Jefferies et al. 2008).

Advani et al. (2009) zeigten, dass der PRR in Nierengewebe mit der v-ATPase kolokalisiert und somit möglicherweise ebenfalls eine Funktion im H<sup>+</sup>-Transport im distalen Nephron besitzt (Advani et al. 2009). PRR-defiziente Mäuse sterben bereits in einem frühen embryonalen Stadium (Sihn et al. 2010), so dass lediglich Untersuchungen mittels konditionalen PRR-*Knock-out*-Mäusen beschrieben sind: Der PRR wurde von Kinouchi et al. (2010) in Kardiomyozyten deletiert. Diese Mäuse starben innerhalb der ersten drei Wochen aufgrund der Degeneration der Kardiomyozyten, die wegen einem gestörten autophagozytotischen Abbaus Akkumulation von vergrößerten lysosomalen Vesikeln und autophagozytotischen Einschlüssen aufwiesen. Der *Knock-down* des PRRs in murinen embryonalen Fibroblasten zeigte darüber hinaus, dass einzelne Untereinheiten der v-ATPase ebenfalls herunterreguliert waren. Außerdem wiesen die Zellen eine verminderte Azidifizierung der intrazellulären Vesikel auf (Kinouchi et al. 2010). Vergleichbare Ergebnisse fanden sich in Podozyten der Niere, nachdem in diesen der PRR konditional deletiert wurde (Oshima et al. 2011). Diese Ergebnisse identifizieren den PRR als wichtiges Protein für die Funktionalität der v-ATPase (Kinouchi et al. 2010).

Eine direkte Interaktion des PRRs als Teil der v-ATPase im Wnt-Signalweg konnten zwei unabhängige Arbeitsgruppen in *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis* bzw. in humanen Zelllinien (HEK293T) nachweisen (Cruciat et al. 2010; Buechling et al., 2010). Der PRR wurde jeweils mittels eines siRNA bzw. RNAi Screens als Modulator des Wnt-Signalweges identifiziert.

Der Wnt-Signalweg ist essentiell für die embryonale Entwicklung, spielt aber auch eine wichtige Rolle bei der Proliferation adulter Zellen, so dass ein gestörter Wnt-Signalweg auch in kanzerös veränderten Geweben - wie verschiedenen Krebsarten - zu finden ist (Clevers 2006). Im Wnt-Signalweg bindet der Ligand Wnt3a an den Membranrezeptor Frizzled. Dies führt zur Interaktion und Phosphorylierung von LRP6 (*low density lipoprotein receptor-related protein 6*). Dadurch wird der  $\beta$ -Catenin Degradationskomplex gebunden und der  $\beta$ -Catenin Abbau verhindert. Neu synthetisiertes  $\beta$ -Catenin wirkt dann zusammen mit dem Transkriptionsfaktor TCF auf die Wnt-abhängigen Zielgene (Clevers and Nusse 2012).



**Abb. 8: Schematische Darstellung des Wnt-Signalwegs** (adaptiert von Dobrowolski und De Robertis (2012) und Sihm et al. (2010)). Im  $\beta$ -Catenin-abhängigen Wnt-Signalweg bindet zunächst der Ligand Wnt an den Plasmamembranrezeptor Frizzled. Dieser interagiert daraufhin mit Dishevelled (DLV) und *low-density lipoprotein receptor-related 6* (LRP6). Dieser Komplex wird dann Dynamin- und v-ATPase-anhängig internalisiert. Nach der Phosphorylierung von LRP6, interagiert der  $\beta$ -Catenin-Degradationskomplex aus dem Zytosol mit LRP6. Der gesamte Komplex wird daraufhin weiter in *multivesicular bodies* transportiert. Da der  $\beta$ -Catenin-Degradationskomplex somit aus dem Zytosol entfernt wurde, kann neu synthetisiertes  $\beta$ -Catenin im Zytosol akkumulieren und als Transkriptionsfaktor in den Zellkern wandern, wo es dann zur Transkription Wnt-abhängiger Gene kommt. Der internalisierte Komplex kann im Lysosom abgebaut oder wieder an die Plasmamembran transportiert und somit wiederverwendet werden. Prorenin Rezeptor (PRR), Casein Kinase (CK), Axis Inhibition Protein (AXIN), Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3), Anaphase-Promoting Complex (APC/C).

Es konnte gezeigt werden, dass der *Knock down* des PRRs (HEK293T) zu einer verminderten Expression Wnt-spezifischer Gene nach Wnt3a Stimulation führt (Cruciat et al. 2010). Hierbei wurde festgestellt, dass der Einfluss des PRRs nicht auf der Ebene des  $\beta$ -Catenin

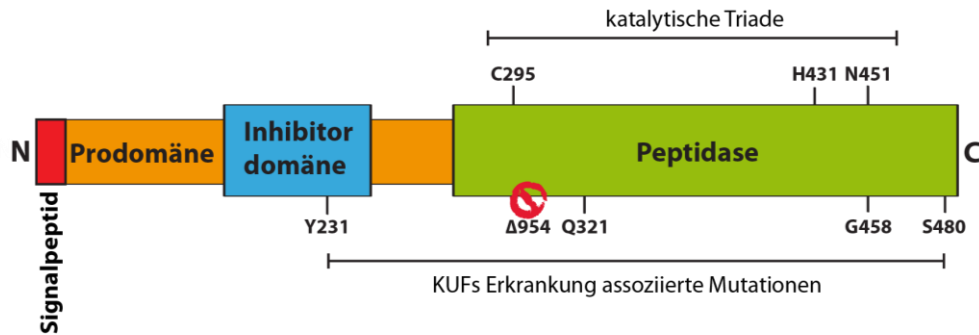


Degradationskomplexes oder der LRP6-Phosphorylierung stattfindet, sondern bereits früher einsetzt (Abb. 8). Es war möglich den PRR sowohl mit Frizzled als auch mit LRP6 zu präzipitieren und eine Interaktion des PRR mit diesen Proteinen zu verifizieren. Cruciat et al. (2010) konnten darüber hinaus zeigen, dass der PRR als Teil der v-ATPase den Wnt-Signalweg beeinflusst. Es war bereits bekannt, dass LRP6 nach Wnt-Stimulation internalisiert wird, was zur  $\beta$ -Catenin-Akkumulation führt (Bilic et al. 2007). Hierbei zeigte sich, dass der PRR zusammen mit der v-ATPase wichtig für die Phosphorylierung und Internalisierung des LRP6 ist (Cruciat et al. 2010). Auf der Basis dieser Versuche wurde ein Modell entwickelt (Abb. 8): Nach Wnt3a Stimulation der Zellen interagiert LRP6 mit Frizzled (Abb. 8-1). Dieser Komplex wird daraufhin internalisiert (Abb. 8-2). In Abhängigkeit des PRR und der v-ATPase und der damit zusammenhängenden Azidifizierung der sogenannten Signalosomen wird LRP6 phosphoryliert und der  $\beta$ -Catenin-Degradationskomplex gebunden (Abb. 8-3). Beide Komplexe werden dann weiter in multivesicular bodies internalisiert (Abb. 8-4), so dass neu synthetisiertes  $\beta$ -Catenin akkumuliert und schließlich als Transkriptionsfaktor für Wnt-abhängige Gene wirken kann (Abb. 8-5). Der internalisierte Komplex inklusive dem PRR kann dann möglicherweise wieder zur Membran zurück transportiert oder in Lysosomen degradiert werden (Abb. 8-6) (Sihn et al. 2010; Dobrowolski and De Robertis 2012).

### 3.6 Cathepsin F – eine lysosomale Cysteinprotease

Cathepsin F ist ein Teil der lysosomalen Degradationsmaschinerie. Cathepsine werden in Asparatyl-, Serin- und Cystein-Proteasen unterteilt, wobei die Cystein-Proteasen unter den Cathepsinen die am besten untersuchte Gruppe darstellen (Turk et al. 2012). Sie sind stark konserviert unter verschiedensten Organismen (Brix et al. 2008). Unter den elf bekannten Cysteinproteasen werden die meisten ubiquitär exprimiert und stellen Endopeptidasen dar (Turk et al. 2001; Rossi et al. 2004). Cysteinproteasen sind zum größten Teil im endo-lysosomalen System lokalisiert und erst unter reduzierenden, leicht sauren Bedingungen aktiv (Turk et al. 2000). Den Cysteinproteasen ist gemein, dass sie eine sogenannte katalytische Triade besitzen, die sich aus einem Cystein, Histidin und Asparagin zusammensetzt und das aktive Zentrum des Enzyms bildet. Cysteinproteasen werden als Präprocathepsine hergestellt und ins ER transportiert, wo das Signalpeptid abgespalten wird. Das Procathepsin wird dann durch den Golgi Apparat mittels Mannose-6-Phosphat-Transports in die Endosomen befördert. Dort wird die Proform katalytisch prozessiert und somit aktiviert. Cathepsine, die nicht im endo-lysosomalen System verbleiben, werden von dort weiter an ihren Zielort transportiert (Brix et al. 2008).

Das humane Cathepsin F-Gen und -Protein wurde als erstes 1998/1999 von drei unabhängigen Arbeitsgruppen beschrieben (Wang et al. 1998; Nagler et al. 1999; Santamaria et al. 1999). Über die Länge der kodierenden cDNA wurden dabei unterschiedliche Aussagen getroffen, wobei Santamaria et al. und Nagler et al. darin übereinstimmen, dass Cathepsin F von einer 1455 Nukleotide langen mRNA kodiert wird. Das entsprechende Protein ist 484 Aminosäuren lang und circa 53 kDa schwer. Sie zeigten außerdem, dass Cathepsin F ein Signalpeptid zur Translokation in das ER besitzt. Das pH-Optimum von rekombinantem Cathepsin F liegt bei 5,2-6,8 und die kurze Halbwertszeit von nur zwei Minuten bei neutralem pH-Wert war mit anderen lysosomalen Proteasen (z.B. Cathepsin L) vergleichbar. Des Weiteren zeigten Immunfluoreszenzaufnahmen eine vesikuläre, perinukleäre Lokalisation. Das deutet darauf hin, dass es sich bei Cathepsin F um eine lysosomale Protease handelt (Wang et al. 1998). Vor allem Nægler et al. charakterisierten die Prodomäne von Cathepsin F im Detail. Sie stellt die längste Prodomäne innerhalb der Cathepsin-Familie dar. Ein Teil der Domäne zeigt klare Homologien zu anderen Prodomänen von Cathepsinen, wobei ein zweiter Teil eine starke Homologie zu Cysteinprotease-Inhibitoren der Cystatin-Familie aufweist (Abb. 9). Diese Beobachtung ist erstaunlich, da die Cathepsin F Prodomäne somit den Inhibitor für die eigene enzymatische Aktivität beinhaltet.



**Abb. 9: Schematische Darstellung des humanen Cathepsin F-Proteins.** Das Enzym besitzt N-terminal ein Signalpeptid, gefolgt von einer großen Prodomäne, die ebenfalls eine Inhibitor-Domäne (Cystatin-Domäne) beinhaltet. Die Peptidase-Domäne beinhaltet an Position C295, H431 und N451 die Aminosäuren der katalytischen Triade. Zusätzlich sind die Mutationen abgebildet, die mit der Entstehung der Kufs-Typ-B-Erkrankung assoziiert sind. Vier Mutationen führen zu einem Aminosäureaustausch. Die  $\Delta 954$  führt zur Deletion eines Nukleotids und somit zu einer Leserasterverschiebung und vermutlich zu einer Trunktationsmutante.

Cathepsin F konnte durch Proteinsequenzvergleiche der Papain-Familie der Cysteinproteasen zugeordnet werden, wobei Cathepsin F die stärkste Ähnlichkeit mit Cathepsin W zeigt und die beiden Cathepsine durch Wex et al. (2000) zu einer eigenen Subgruppe zusammengefasst wurden. Santamaria et al. (1999) identifizierten die Aminosäuren der katalytischen Triade an Position 295 (Cys), 431 (His) und 451 (Asn). Bezüglich der präferierten Substrate konnten *in vitro* Studien mit rekombinantem Cathepsin F zeigen, dass die Spezifität von Cathepsin F den Spezifitäten der Cathepsine L, S und K gleicht, wobei in der Studie nicht Cathepsin W getestet worden ist (Wang et al. 1998). Allgemein lassen die Ähnlichkeiten in der Sequenz und der Substratspezifität auf eine Redundanz der Cathepsine schließen, was bedeutet, dass die Inaktivität eines Cathepsins durch andere Cathepsine kompensiert werden kann (Nagler et al. 1999). Für Cathepsin F kann eine Expression des Gens in fast allen Geweben nachgewiesen werden, wobei die höchste Expression in der Skelettmuskulatur, in den Testis und Ovarien, im Herzen und im Gehirn gezeigt werden konnte (Wang et al. 1998; Nagler et al. 1999; Santamaria et al. 1999). Humanes und murines Cathepsin F zeigen eine Ähnlichkeit von 82,8% auf Aminosäureebene. Auch die Genexpression des murinen Cathepsin F in den Geweben ist mit humanem Cathepsin F vergleichbar. Dies lässt eine konservierte Funktion von Cathepsin F in Menschen und Mäusen vermuten (Deussing et al. 2000).

Die Funktionen von Cathepsin F und entsprechender Substrate sind bis heute nur initial charakterisiert. So konnte in *in vitro* Studien mit rekombinantem Cathepsin F gezeigt werden, dass das Enzym die Funktion von Cathepsin S in der Prozessierung der *Invariant Chain* im Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC II) übernehmen kann. Der MHC II ist wichtig zur Präsentation von körperfremden Peptiden (z.B. von Bakterien oder Viren) auf der Zelloberfläche von spezifischen Zellen (z.B. dendritischen Zellen). Die Peptide werden von CD4+T-

Lymphozyten erkannt, welche ihrerseits dann B-Zellen zur entsprechenden Antikörperproduktion anregen. Die zu präsentierenden körperfremden Peptide befinden sich in den Lysosomen, nachdem die Bakterien oder Viren endozytiert und degradiert wurden. Dies bedeutet, dass der MCH-II-Komplex auch erst hier die Peptide binden kann. Deswegen wird der Komplex im ER mit der *invariant chain* beladen, die erst in Lysosomen von Cathepsin S oder F prozessiert wird und somit die Beladung des MHC II mit zelleigenen Peptiden während des Transports zum Lysosom verhindert (Berger and Roche 2009, Shi et al., 2000). Eine weitere Funktion von Cathepsin F, wie auch Cathepsin K und S, ist die Degradation des Apolipoproteins B-100 (ApoB-100). Dieses Protein ist Teil des *low density lipoproteins* (LDL). Der LDL-Rezeptor auf den Zellen des Zielgewebes bindet an ApoB-100 und ermöglicht so die Aufnahme des LDLs. Rekombinantes Cathepsin F kann ApoB-100 prozessieren. Die Prozessierung des ApoB-100 hat zur Folge, dass das Lipoprotein (z.B. LDL) nicht mehr von den Zielzellen aufgenommen werden kann. Dies führt zur Bildung von *Lipid droplets*, die Lipidspeicherorganellen der Zelle darstellen. Cathepsin F spielt dabei in Arterien eine Rolle. Hier werden diese *Lipid droplets* von Proteoglykanen auf den Endothelzellen des arteriellen Lumens gebunden, was auf Dauer zu arteriosklerotischen Läsionen und letztendlich zur Arteriosklerose führen kann (Oorni et al. 2004).

### 3.6.1 Cathepsin F Mutationen verursachen die Typ-B-Kufs-Erkrankung

Auch wenn bis heute noch kein *in vivo* Substrat von Cathepsin F bekannt ist, so konnten Mutationen im Cathepsin F-Gen mittlerweile mit der Typ-B-Kufs-Erkrankung, eine Form der späten neuronalen Ceroid-Lipofuszinose (NCL), assoziiert werden (Smith et al. 2013).

Erste Hinweise auf die Bedeutung von Cathepsin F im Gehirn lieferten bereits die Analysen von Cathepsin F-defizienten Mäusen (Tang et al. 2006). Die Mäuse entwickelten sich zunächst normal, zeigten aber bereits früh Koordinationsstörungen im Bewegungsapparat mit Paraparese der Hinterbeine und allgemeinem Muskelschwund bis hin zu einem frühzeitigen Tod mit sechs Monaten. Histologische Schnitte des zentralen Nervensystems konnten eine Akkumulation von lysosomalem Lipofuscin nachweisen, wie man sie auch in anderen lysosomalen Speichererkrankungen findet. Besonders interessant war an diesen Ergebnissen, dass die Defizienz von Cathepsin F alleine diesen Phänotyp induzierte, andere Cathepsine also nicht kompensatorisch wirken konnten. Dies lässt auf spezifische und nicht redundante Funktionen von Cathepsin F im zentralen Nervensystem schließen (Tang et al. 2006).

Tang et al. postulierten bereits nach der Untersuchung der Cathepsin F-defizienten Mäuse, dass Mutationen im Gen für Cathepsin F im Menschen eine späte neuronale Ceroid-Lipofuszinose verursachen könnten. Bestätigt wurde das 2013 von Smith et al., die zeigen

konnten, dass in fünf Patienten mit Typ-B-Kufs-Erkrankung eine Mutation im Cathepsin F Gen der Krankheit zu Grunde liegt (Smith et al. 2013). Kufs-Erkrankung ist die am häufigsten vorkommende Form der späten neuronalen Ceroid-Lipofuszinose. Sie wird unterteilt in Typ-A und Typ-B, wobei Typ-A mit PME assoziiert ist und Typ-B eher durch Demenz und Koordinationsstörungen gekennzeichnet ist (Lewandowska et al. 2009). Die Diagnose der Erkrankung ist schwierig, da sich die Lipopigmente auch bei Hirnbiopsien der Patienten nicht immer von gewöhnlichen Alterserscheinungen unterscheiden lassen (Arsov et al. 2011). Somit ist es essentiell, die der Erkrankung zugrunde liegenden Mutationen in entsprechenden Genen zu finden und die Diagnose zu vereinfachen.

Cathepsin F ist das erste Gen, das mit der Entstehung der Typ-B-Kufs-Erkrankung assoziiert werden konnte. Die entsprechenden Mutationen erstrecken sich über das ganze Protein und sind in Abb. 9 grafisch dargestellt. Ob die Mutationen zur Inaktivität oder Fehlsortierung des Enzyms führen, wurde von Smith et al. nur anhand von *in silico* Analysen diskutiert (Smith et al. 2013).

## 4 Zielsetzung

Das lysosomale integrale Membranprotein Typ-2 (LIMP-2) wurde bereits als wichtiger Bestandteil lysosomaler Membranen beschrieben. Es ist essentiell für den Transport des lysosomalen Enzyms  $\beta$ -Glukocerebrosidase ( $\beta$ -GC). Untersuchungen an LIMP-2-defizienten Mäusen und Patienten, die eine Mutation im LIMP-2-Gen aufweisen, zeigen vielfältige Phänotypen bzw. Symptome, die nicht allein auf die Funktion von LIMP-2 als lysosomaler Transporter von  $\beta$ -GC zurückzuführen sind.

Aufgrunddessen lag der Fokus dieser Arbeit auf der Identifizierung neuer Funktionen von LIMP-2. Funktionen von Proteinen können auf verschiedene Arten beeinflusst werden. So ist es unter anderem möglich, dass andere Interaktionspartner Einfluss nehmen oder selbst beeinflusst werden. Andererseits kann auch eine Dimerisierung des Proteins funktionell von Bedeutung sein. Nicht zuletzt kann die Proteolyse eines Proteins essenziell für die Funktionalität sein.

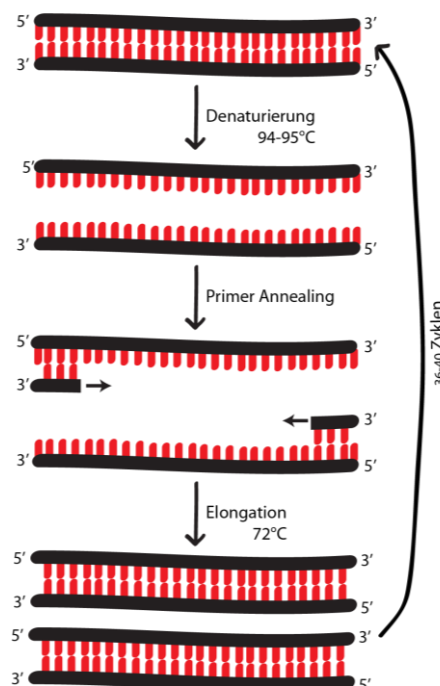
Aller drei Aspekte wurden in dieser Arbeit untersucht. Zunächst sollte die Dimerisierung von LIMP-2 analysiert werden. Des Weiteren sollten verschiedene neue Interaktionspartner, die zuvor in einem Screening identifiziert worden waren, bezüglich ihrer Interaktion zu LIMP-2 untersucht werden. Dazu gehörte der Prorenin Rezeptor, VAMP-2 und PRAF2. Außerdem sollte analysiert werden, welche Protease für die in dieser Arbeit identifizierte Proteolyse von LIMP-2 verantwortlich ist und welche funktionelle Relevanz diese Spaltung für LIMP-2 besitzt. Nachdem gezeigt werden konnte, dass Cathepsin F wichtig für die Spaltung von LIMP-2 ist, sollten auch noch Krankheits-assoziierte Mutanten funktionell untersucht werden.

## 5 Methoden

### 5.1 Molekularbiologische Methoden

#### 5.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* PCR) ist eine Methode zur Amplifikation von spezifischen DNA (*Deoxyribonucleic acid*) Fragmenten. Auf der Grundlage mehrerer Zyklen von Erhitzen und Abkühlen der Reaktion wird hierbei der DNA Doppelstrang denaturiert und mittels enzymatischer Reaktion repliziert.



**Abb. 10 Schematische Darstellung der Polymerase-Kettenreaktion.** Zur Amplifikation spezifischer DNA Fragmente wird zunächst die doppelsträngige DNA (dsDNA) denaturiert. Im nächsten Schritt binden die Primer an die komplementären Sequenzen der einzelsträngigen DNA. Die Polymerase verlängert anschließend diese Primer und stellt somit doppelsträngige DNA Fragmente her. In 36-40 Zyklen werden diese Fragmente vervielfältigt.

Ausgangsmaterial für die PCR war die doppelsträngige DNA (dsDNA, *Template*), die das zu vervielfältigende Fragment (Matrize) beinhaltete. Die dsDNA lag in dieser Arbeit grundsätzlich in Form eines Plasmides vor. Zur spezifischen Amplifikation der Matrize wurden Primer benötigt, die komplementär zu den flankierenden Bereichen der Matrize waren, wobei jeweils Primer (kurze DNA Fragmente) zu verwenden waren, die an den *sense* (hin-Primer) bzw. an den *antisense* (rück-Primer) Strang der dsDNA banden. Die Amplifikation der DNA wurde mittels einer thermostabilen Pfu-DNA-Polymerase ermöglicht, die eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität besaß. Weitere Komponenten der PCR sind den entsprechenden folgenden Tabellen zu entnehmen. In der ersten Phase wurde der Reaktionsansatz auf 94-95°C erhitzt, wodurch es zur Denaturierung der dsDNA in

einzelsträngige DNA (ssDNA) kommt (Abb. 10). Der nächste Schritt war das Primer-*Annealing*, währenddessen sich die spezifischen Primer an die entsprechenden komplementären Sequenzen in der DNA Matrize anlagern. Die *Annealing* Temperatur musste Primer-spezifisch gewählt werden, wobei sie sich 2-5°C unterhalb der Schmelztemperatur befinden sollte. Diese berechnet sich nach der Formel:  $2 \times (\text{Arginin} + \text{Tyrosin}) + 4 \times (\text{Guanin} + \text{Cytosin})$ . Die Elongation der Primer mittels der DNA-Polymerase fand anschließend bei 72°C statt. Die Dauer dieser Phase richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA Fragments und der Schnelligkeit mit der die Polymerase die Elongation durchführt (2 min pro 1000 bp).

### 5.1.1.1 Klonierungs-PCR

Um cDNA in spezielle Plasmide zu integrieren, insbesondere, um die entsprechenden Proteine mit einem Aminosäure-*Tag* zu markieren, war es notwendig eine Klonierungs-PCR durchzuführen. Hierbei wurde die entsprechende cDNA entsprechend der Tab. 2 zusammen pipettiert und wie unter 5.1.1 beschrieben amplifiziert. Dabei sind die gewählten Primer zusätzlich um eine Restriktionsstelle erweitert worden, die es ermöglichte das entsprechende PCR-Produkt in den gewünschten Vektor zu integrieren (siehe 5.1.3). Neben der reinen Umklonierung, war es teilweise auch notwendig Mutationen (Punktmutationen, Deletionen) in das entsprechende Gen einzubringen. Hierfür wurde die Methode der Mutagenese-PCR verwendet.

Substanz	Menge
10x PFU-Polymerasepuffer	5µl
dNTPs (2µM)	2µl
DMSO	2,5µl
<i>sense</i> -Primer (20µM)	1µl
<i>antisense</i> -Primer (20µM)	1µl
Template (Matrize)	1µg
PFU-Polymerase	0,5µl
ddH <sub>2</sub> O	Auffüllen auf 50µl

Tab. 1 PCR-Ansatz für die Amplifikations-PCR

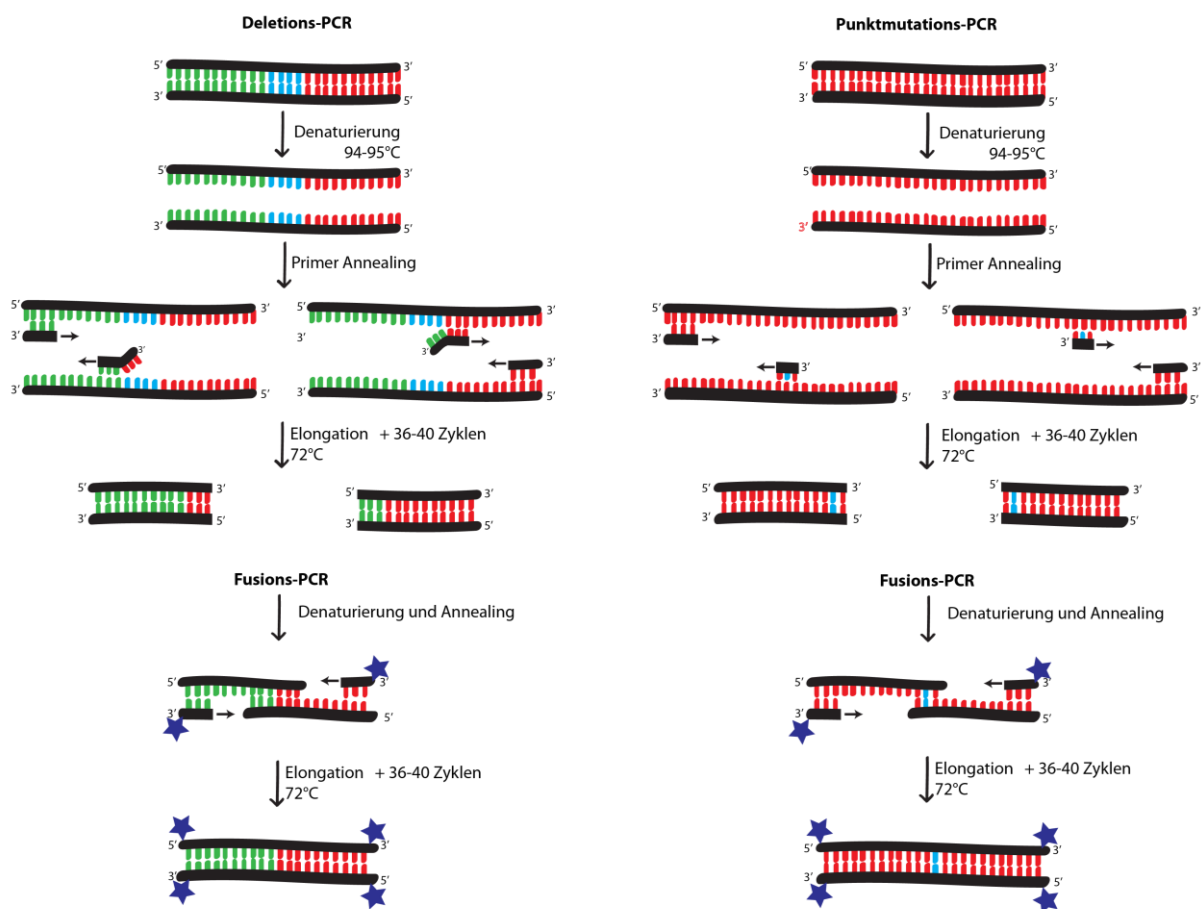
Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	5 min	36-40x
95°C	30 sec	
55-65°C	30 sec	
72°C	Je nach Länge des Amplifikats	
72°C	5 min	
10°C	∞	

Tab. 2 PCR-Programm für die Amplifikations-PCR



### 5.1.1.2 Mutagenese-PCR

Bei der Deletion spezifischer Bereiche in einer cDNA wurde die Deletions-PCR verwendet (Abb. 11). Hierfür wurden die *sense* und *antisense* Primer so gewählt, dass sie die flankierenden Bereiche der Deletionsstelle umspannen. Primer, die das 3' und 5' Ende der cDNA begrenzen, komplementierten die beiden Primerpaare. Durch zwei separate Deletions-PCRs entstanden zwei PCR-Produkte. In einer anschließenden Fusions-PCR wurden diese beiden PCR Produkte zu einer Deletionsmutante kombiniert. Zusätzlich beinhalteten die äußeren Primer in der Fusions-PCR Restriktionsstellen für die anschließenden Klonierungsexperimente.



**Abb. 11 Schematische Darstellung zur Deletions- und Punktmutations-PCR.** Bei der Deletions-PCR entstehen durch die Amplifikation mittels spezifischer, die flankierenden Bereiche des zu deletierenden Bereichs umspannender Primer, zwei PCR-Produkte. Die anschließende Fusions-PCR vereint diese. Die Sterne symbolisieren die eingefügten Restriktionsstellen. Die Primer bei der Punktmutations-PCR beinhaltet bereits die zu mutierende Base. Somit entstehen zwei PCR Produkte, die die Punktmutation beinhalten und durch die Fusions-PCR kombiniert werden

Um Punktmutationen mittels PCR in eine cDNA einzubringen, wurde der gewünschte Basenaustausch bereits in die Primer eingebracht. Trotz der nicht vollständigen Komplementarität zwischen den Primern und der Matrize, konnte sich der Primer an die ssDNA anlagern. So entstanden in zwei unabhängigen PCRs wie bei der Deletions-PCR zwei

PCR-Produkte, die in einer anschließenden Fusions-PCR kombiniert wurden. Auch hier wurden durch die äußeren Primer, Restriktionsstellen an das PCR-Produkt angebracht (Abb. 11). Tab. 3 und Tab. 4 fassen die einzelnen PCR-Ansätze zusammen. Das PCR-Programm entspricht Tab. 2.

Substanz	Menge
10x PFU-Polymerasepuffer	5µl
dNTPs (2µM)	2µl
DMSO	2,5µl
sense-Primer A1 bzw. B1 (20µM)	1µl
antisense-Primer A2 bzw. B2 (20µM)	1µl
Template (Matrize)	1µg
PFU-Polymerase	0,5µl
ddH <sub>2</sub> O	Auffüllen auf 50µl

Tab. 3 PCR-Ansatz für die Mutagenese-PCR. Für jedes Primerpaar (A1/A2 bzw. B1/B2) wird ein eigener Ansatz erstellt.

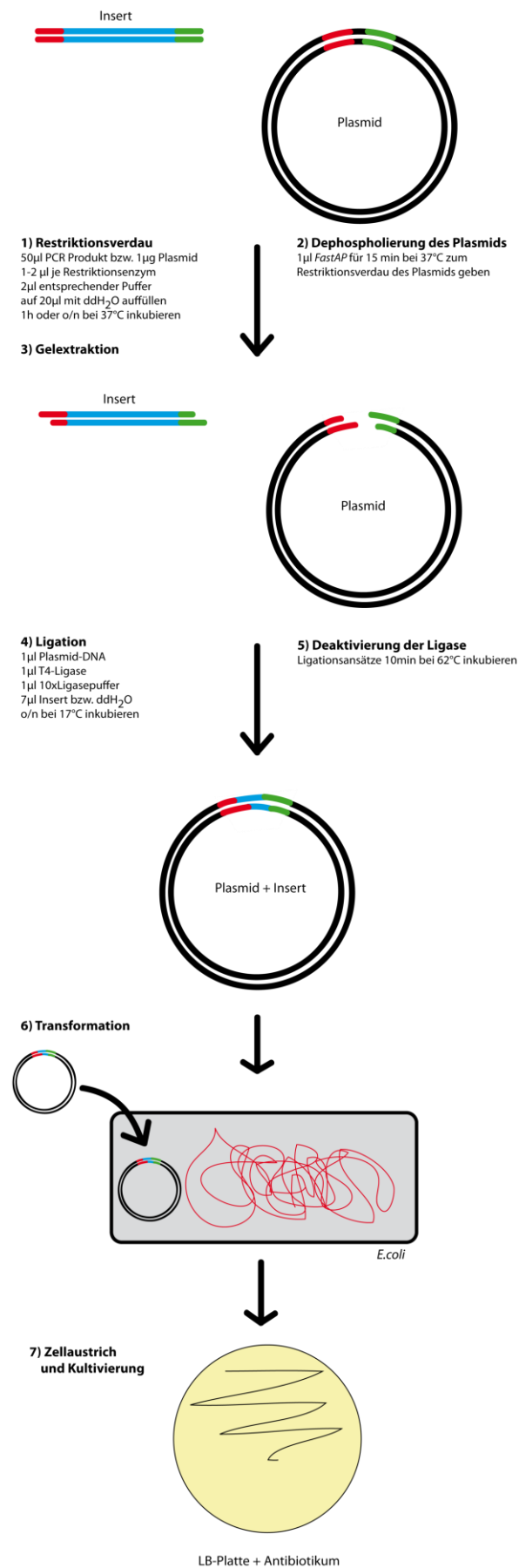
Substanz	Menge
10x PFU-Polymerasepuffer	5µl
dNTPs (2µM)	2µl
DMSO	2,5µl
sense-Primer A1 (20µM)	1µl
antisense-Primer B2 (20µM)	1µl
Template A und B aus Mutagenese-PCR	1µg
PFU-Polymerase	0,5µl
ddH <sub>2</sub> O	Auffüllen auf 50µl

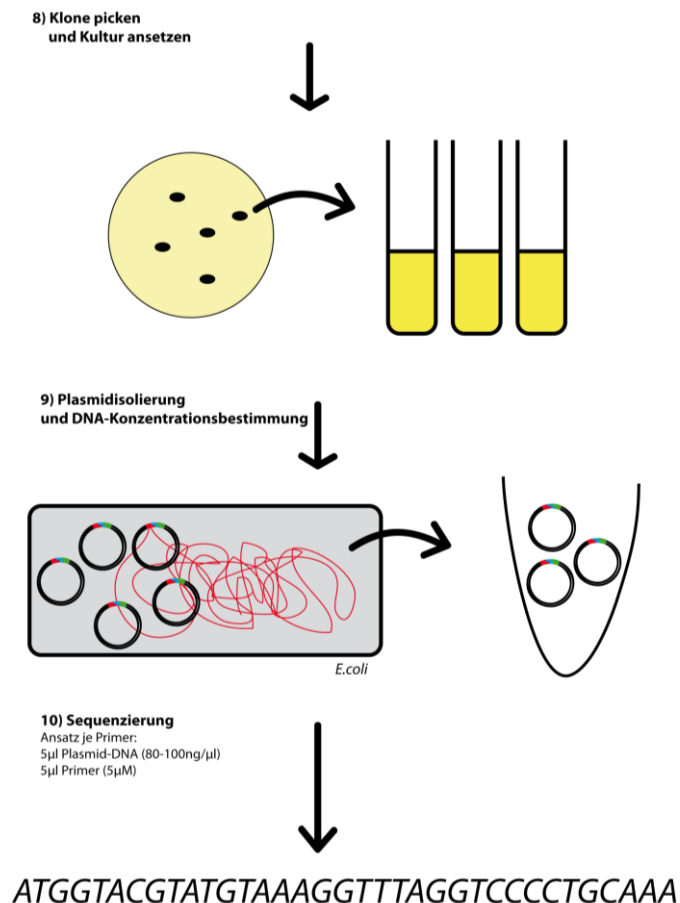
Tab. 4 PCR-Ansatz für die Fusions-PCR

### 5.1.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde verwendet, um DNA bzw. RNA der Größe nach zu trennen. Hierbei wurde ein Gel aus Agarosepolymeren verwendet, durch das die negativ geladenen Nukleinsäuren mittels elektrischen Feldes wandern. Dabei konnten kürzere Fragmente schneller das Gel passieren als längere Nukleinsäuren und wurden somit voneinander getrennt. Je nach Länge der zu trennenden Nukleinsäuren, variierte der Agaroseanteil im Gel zwischen 1 und 2 %. Die DNA/RNA Proben wurden vor dem Auftragen mit 6x Loading Puffer (Fermentas) versetzt. Das Gel wurde bei einer Spannung von 120V laufen gelassen. Die Nukleinsäuren wurden mittels Ethidiumbromid (10µl/400ml Agarose in TBE) sichtbar gemacht. Diese Substanz interkalierte in die DNA/RNA und fluoreszierte dann unter ultraviolettem Licht. Um die Größe der Nukleinsäuren zu ermitteln, wurde zusätzlich ein DNA Marker auf das Gel aufgetragen (1kb DNA-Ladder, Fermentas). Falls die Nukleinsäuren anschließend für weitere Experimente benötigt wurden, wurden Gelstücke, die die gewünschte DNA beinhalteten ausgeschnitten und mittels *High Pure PCR Product Purification Kit* nach Herstellerangaben aufgereinigt.

### 5.1.3 Klonierungsexperimente





**Abb. 12 Schematische Darstellung von Klonierungsexperimenten.** Nähere Erläuterungen zu den einzelnen Schritten finden sich im Text (5.1.3)

In dieser Arbeit wurden verschiedenste cDNA Konstrukte verwendet, die vorher mittels PCR (siehe 5.1.1.1) amplifiziert worden sind. Diese mussten wie im Folgenden beschrieben in die entsprechenden Plasmide eingebracht werden (Abb. 12).

### 5.1.3.1 Restriktionsverdau

Wie bereits beschrieben wurden an die PCR Produkte (*Insert*) spezielle Restriktionsstellen mittels Primern angebracht. Diese wurden so gewählt, dass diese Stellen ebenfalls in dem benötigten Plasmid vorkommen, sodass das Insert eingebracht werden konnte. Sowohl das Insert als auch der Vektor wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten (Abb. 12.1). Restriktionsenzyme sind bakterielle Proteine, die spezifische palindromische DNA Sequenzen schneiden können. Die Menge an eingesetztem Enzym und der entsprechende Puffer wurden nach Angaben des Herstellers ermittelt (Fermentas).

Durch die Restriktion bilden sich sogenannte *sticky ends* an den Restriktionsstellen. Zur Vermeidung einer Religation des Vektors wurde dieser nach der Restriktion noch zusätzlich

dephosphoryliert (Abb. 12.2). Das Insert und der Vektor wurden dann mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und durch die Gelextraktion isoliert (5.1.2).

### 5.1.3.2 Ligation

Nachdem das Insert und der Vektor restringiert wurden, konnten diese ligiert werden (Abb. 12.4). Die T4-Ligase war in der Lage die bei der Restriktion entstandenen *sticky ends* des Inserts und des Plasmid miteinander zu verknüpfen und somit das Insert in den Vektor einzufügen.

### 5.1.3.3 Herstellung elektrokompenter E.coli XL1 Blue Zellen

Bevor *E.coli* XL1 Blue Zellen transformiert werden konnten, mussten zunächst elektrokompente Zellen hergestellt werden. Hierfür wurden die Bakterien zunächst mittels Einzelkoloniausstrichs auf eine mit 50µl Tetrazyklin (20µg/ml) bestrichene LB-Platte ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50ml (mit 50µl Tetrazyklin) LB Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und ebenfalls über Nacht bei 37°C inkubiert. Gleichzeitig wurden 2x500ml LB Medium bei 37°C warmgestellt. Diese wurden am nächsten Tag mit je 10ml der Vorkultur beimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 – 0,6 wachsen gelassen. Dann wurden die Bakterien für 15 min bei 4°C bei 5000rpm abzentrifugiert. Die beiden Pellets wurden daraufhin in 250ml eiskaltem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Jedes Pellet wurde dann in 50ml 10%iger Glycerinlösung aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend bei 0°C und 3200 rpm für 20 min zentrifugiert. Jedes Pellet wurde dann in 2ml 10%-iger Glycerinlösung resuspendiert und jeweils zu 50µl aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

### 5.1.3.4 Transformation elektrokompenter Zellen

Das Einbringen von Fremd-DNA in *E.coli* XL1 Blue Zellen wurde mittels eines elektrischen Feldes, das zu Poren in der bakteriellen Zellwand führt, ermöglicht. Hierzu wurden die zuvor hergestellten elektrokompenten Zellen auf Eis aufgetaut und 1µl des Ligationsansatzes aus 5.1.3.2 zu den Zellen gegeben. Dieser Ansatz wurde dann in eine gekühlten Elektroporationsküvette gegeben und mit dem *Genepulser* (Biorad) elektroporiert (Einstellungen: 25 µFD; 2,5 kV; 200 Ω; Zeitkonstante zwischen 8-9 ms). Dann wurde 1ml LB Medium in die Küvette gegeben und die Zellen resuspendiert und in ein Eppendorf-Gefäß (1,5ml) überführt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Dadurch konnten die Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, die Resistenz, die auf dem Plasmid kodiert ist, ausbilden. Danach wurden die gesamten Zellen auf einer LB Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 5.1.3.5 Plasmidamplifikation und Plasmidaufreinigung

Nach der Transformation der Bakterien und dem Ausstrich auf Selektionsplatten, wurden im nächsten Schritt Einzelklone gepickt und in 3ml LB-Selektionsmedium überführt. Diese Kultur wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Plasmide mittels *Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Wurde eine größere Menge an Plasmiden benötigt, wurde eine Übernachtskultur mit 100ml LB-Selektionsmedium beimpft (mit der 1ml Kultur, die man nach der Transformation erhält) und ebenfalls über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Plasmide wurden dann mit *dem PureYield Plasmid Midiprep System* (Promega, Mannheim) ebenfalls nach Herstellerangaben aufgereinigt.

### 5.1.3.6 DNA und RNA- Konzentrationsbestimmung

Nukleinsäuren haben ein spezifisches Absorptionsspektrum zwischen 250 und 280 nm (Maximum: 260nm). Wobei  $A_{260} = 1$  einer Konzentration von 50µg/ml entspricht. Gemessen wurde die Konzentration mit dem Lesegerät der Firma BioTek. Der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  wurde hierbei zusätzlich ermittelt und wies bei einem Wert zwischen 1,8 – 2,0 auf keine Verunreinigungen durch Proteine hin.

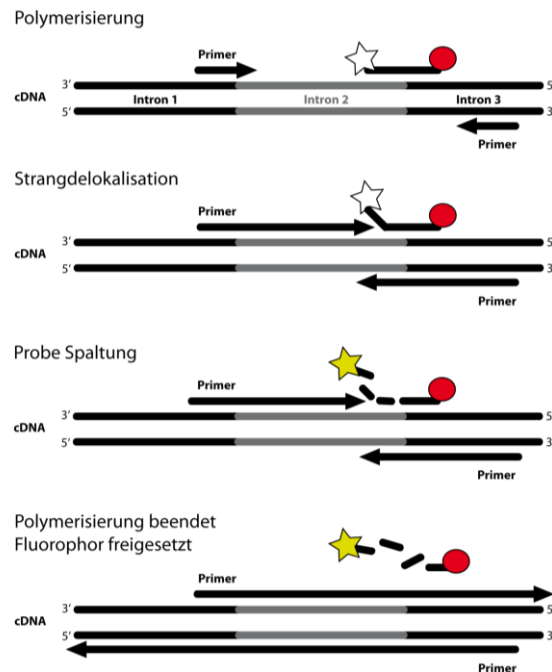
### 5.1.3.7 Sequenzierung

Um sicherzustellen, dass die erstellte cDNA die gewünschte Nukleotidsequenz aufwies, wurden die Konstrukte anschließend mittels Sanger-Methode sequenziert. Hierzu wurde die DNA-Konzentration auf 100ng/µl und die Primerkonzentration auf 5µM eingestellt. Jeweils 5µl der DNA Probe und des Primers wurden in ein 1,5ml Eppendorf Gefäß pipettiert und an die Firma GATC-Biotech geschickt. Die erhaltene Sequenz wurde mittels *SeqMan-Software* von DNASTAR ausgewertet.

### 5.1.4 RNA-Isolierung

Zur Kontrolle der Expression einzelner Gene (siehe 5.1.5) war es notwendig mRNA aus Zellen bzw. aus Organen zu isolieren. Hierfür wurde das *Kit NucleoSpin<sup>®</sup> RNA* von Macherey-Nagel verwendet und die RNA laut Herstellerangaben isoliert. Die RNA Konzentration wurde wie unter 5.1.3.6 beschrieben bestimmt. Um eine Degradation der RNA ausschließen zu können, wurde 1µg der isolierten RNA auf ein frisch gegossenes 1%iges Agarosegel aufgetragen und bei 120V für 20 min laufen gelassen. Waren zwei klare Banden zu erkennen, war eine Degradation der RNA auszuschließen. Die RNA wurde nun bis zum weiteren Verwenden bei -80°C gelagert.

### 5.1.5 Quantitative Real Time PCR



**Abb. 13** Schematische Darstellung der qRT-PCR Amplifikation in der *Universal Probe Library* (UPL) von Roche. Schema adaptiert von Applied Biosystems. Nähere Erläuterungen zum Mechanismus siehe 5.1.5.

Zur Detektion der Menge an exprimierter mRNA wurde die quantitative real-time-PCR verwendet. Zunächst wurde wie unter 5.1.4 die RNA isoliert. Um die RNA in cDNA umzuschreiben wurde das *First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Scientific) verwendet. Die anschließende quantitative real-time-PCR wurde in dem Roche Light Cycler 480 mit der dazugehörigen *Universal Probe Library* durchgeführt. Diese Technik verwendet fluoreszierende Reporter (sogenannte *Probes*). Eine *Probe* ist eine einsträngige 8-9 Basen lange Nukleinsäure. An diese sind ein Fluorophor und ein Quencer, der die Fluoreszenz unterdrückt, gekoppelt. Die *Probe* bindet an spezifische Stellen der cDNA. Während der qRT-PCR binden nun die gewählten Primer, die links und rechts der *Probe* binden können, an die cDNA. Während der Elongation der Primer wurde die *Probe* durch die Nuklease-Aktivität der DNA-Polymerase geschnitten und von der cDNA gelöst. Nun konnte der Quencer nicht mehr das Fluorophor unterdrücken und der LightCycler konnte das entsprechende Fluoreszenzsignal messen. Die Primer wurden möglichst so gewählt, dass sie einen Intron-überspannenden Bereich einschließen, sodass lediglich cDNA (die aufgrund der Umschrift aus mRNA keine Exons beinhaltet) und keine chromosomale DNA amplifiziert werden konnte.

Die spezifischen Primer und die entsprechende *Probe* wurden auf der Internetseite von Roche (<http://www.roche-applied-science.com>) im *Assay Design Center* ermittelt. Pro Well einer 384 Well Plate wurden der cDNA-Mix und der UPL-Mix entsprechend der Tab. 5

Substanz	Menge
<b>UPL-Assay</b>	Pro 100µl
Je Primer (100µM)	6µl
Probe	20µl
ddH <sub>2</sub> O	74µl
<b>UPL-Mix</b>	Je Well 5µl
<i>UPL-Assay</i>	0,5µl
ddH <sub>2</sub> O	4,5µl
<b>cDNA-Mix</b>	Je Well 5 µl
qPCR-Mix (Roche)	4,5µl
cDNA	0,5µl

Tab. 5 Pipettierschema für die qRT-PCR.

zusammenpipettiert. Die Platte wurde dann im Roche LightCycler 480 nach Herstellerangaben für die *Universal Probe Library* gemessen.

Zur Quantifizierung wurde mit Hilfe der *LightCycler* Software zunächst der Cp-Wert (*Crossing Point*) der einzelnen Proben ermittelt. Zur Berechnung der Effizienz der Primer wurde eine Verdünnungsreihe der cDNA hergestellt. Aus den Cp-Werten der Verdünnungsreihe ließ sich so die Effizienz der Primer berechnen. Dazu wurde eine Steigungsgerade ermittelt. Auf der X-Achse wurde der LOG der jeweiligen Verdünnung (z.B. LOG(0,5)=-0,30103) und auf der Y-Achse die dazugehörigen Cp-Werte eingetragen und die Steigung der Gerade ermittelt.  $10^{(-1/\text{Steigung})}$  ergab dann die Effizienz der Primer. Um nun die einzelnen Proben zu quantifizieren, subtrahierte man den Cp-Wert des Kontrollgens (z.B. Aktin) vom Cp-Wert des zu testenden Gens ( $\Delta\text{Cp}$ ). Die Expression des Gens berechnete sich anschließend wie folgt: Effizienz des Primers  $^{-\Delta\text{Cp}}$ . Die Werte wurden anschließend noch z.B. auf die Kontrollzellen oder einen Wildtyp normiert.

## 5.2 Zellbiologische Methoden

### 5.2.1 Kultivierung von adhärennten Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden, falls nicht anders angegeben, in einem Inkubator bei 37°C und 5%igem CO<sub>2</sub>-Gehalt gelagert. Zur Kultivierung wurden die Zellen auf einer 60cm<sup>2</sup> Schale in 6-10ml DMEN *high Glucose* Medium (versetzt mit 10% FCS, 100U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin) ausplattiert. Um die Zellen über einen



längeren Zeitraum halten zu können, wurden diese bei 100% Konfluenz passagiert. Hierfür wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit sterilem PBS mit 1ml Trypsin(0.5 mg/ml) /EDTA (0.22 mg/ml) in PBS versetzt und für 10-30 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen lösten sich hierdurch von der Zellkulturschale und die Zellen konnten in neuem Medium aufgenommen und verdünnt auf eine neue Schale ausplattiert werden.

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die verwendeten Materialien und Utensilien wurden zuvor autoklaviert oder mit 70%igem sterilisiert, um Verunreinigungen der Zellkulturen zu verhindern.

### **5.2.2 Kryokonservierung und Reaktivierung von Zelllinien**

Es war möglich Zelllinien durch Konservierung in flüssigem Stickstoff bei -196°C einzulagern und zu einem späteren Zeitpunkt zu reaktivieren. Hierfür wurde eine 60cm<sup>2</sup> Kulturschale zu einer Konfluenz von 100% wachsen gelassen. Die Zellen wurden wie oben beschrieben durch Trypsin gelöst und in 5ml Kulturmedium aufgenommen und in ein 15ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 200g für 5min abzentrifugiert und in 1ml Einfriermedium (1 % Penicillin/ Streptomycin, 20 % DMSO, 30 % FCS in DMEM *high Glucose*) resuspendiert und direkt auf Trockeneis eingefroren. Die Zellen wurden für eine Nacht bei -80°C aufbewahrt, bevor die Zellen in flüssigem Stickstoff für eine längere Dauer gelagert werden konnten.

Zur Reaktivierung der Zellen, wurden diese kurz im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Danach wurden die Zellen in 5ml Zellkulturmedium in ein 15ml Falcon-Röhrchen überführt. Um die Zellen vom DMSO in dem Einfriermedium zu befreien, wurden sie 5min bei 200g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10ml frischem Zellkulturmedium aufgenommen und in eine Zellkulturschale überführt.

### **5.2.3 Ernte des Wnt-3a angereicherten Mediums**

In dieser Arbeit wurden Stimulationsversuche mit Wnt3a-Protein angereichertem Medium durchgeführt. Dieses Medium musste zunächst hergestellt werden. Hierfür wurden Fibroblasten verwendet, die das Wnt3a-Gen stabil überexprimieren (zur Selektion wurde 125µg/ml Zeomycin benutzt). Die Zellen wurden nach 100%iger Konfluenz auf eine 175cm<sup>2</sup> Kulturflasche (Sarstedt) ausplattiert. Nun wurden die Zellen ohne Zeomycin inkubiert. Die Zellen wurden mit 50ml Zellkulturmedium überschichtet. Dieses Medium wurde alle 2-3 Tage ausgewechselt. Die Zellen hatten in dieser Zeit das Medium mit Wnt3a-Protein angereichert. Um das Medium von eventuellen toten Zellen zu befreien, wurde das abgenommene Medium für 5min bei 200g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen

und bei 4°C für höchstens ein Jahr gelagert. Das Medium kann bis zu 50mal ausgewechselt werden, bevor die Zellen nicht mehr ausreichend Wnt3a-Protein herstellen. Das Kontrollmedium (L-Medium) wurde ähnlich gewonnen, nur das hier Wildtyp-Fibroblasten verwendet wurden, die kein Wnt3a-Protein herstellen. Die Wirksamkeit des Wnt3a-Mediums wurde in einem Kontroll Luziferaseassay getestet (5.3.9).

#### **5.2.4 Transfektion**

Als Transfektion wird die Methode bezeichnet, bei der cDNA meist in Form von Plasmiden durch chemische Reagenzien oder mittels Lentiviren in eukaryotische Zellen eingebracht wird. Dabei kann zwischen transienter und stabiler Transfektion unterschieden werden.

##### **5.2.4.1 Transiente Transfektion**

Zellen, die für eine anschließende Proteinisolierung und Western Blot Analysen transfiziert wurden, wurden zunächst auf 6cm oder 10cm Kulturschalen ausplattiert und bei einer Konfluenz von ca. 70% transfiziert. Zellen, die für mikroskopische Analysen verwendet werden sollten, wurden in einem 6-Well auf Coverslips ausplattiert und bei einer Konfluenz von ca. 30% transfiziert. Zur Transfektion wurde die entsprechende Menge cDNA (3µg cDNA bei einer 10cm Schale, 1µg cDNA bei einer 6cm Schale oder einem 6-Well) mit der doppelten Menge (v/w) Transfektionsreagenz (Turbofekt®, Fugene® oder Polyethylenimin) und 50µl DMEM *only* (ohne Zusatz von FCS oder Antibiotikum) für 20min inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf die Zellen gegeben. Nach 4-6 Stunden wurde das Zellkulturmedium gegen frisches ausgewechselt. Die Zellen wurden für 24-48h im Inkubator gelagert und anschließend weiterverarbeitet.

##### **5.2.4.2 Herstellung stabiler Zelllinien**

Zur Herstellung von stabilen Zelllinien wurde zunächst wie unter 5.2.4.1 beschrieben vorgegangen. 48h nach der Transfektion wird auf transfizierte Zellen selektioniert. Hierbei machte man es sich zur Nutze, dass auf dem transfizierten Plasmid eine Antibiotikum Resistenz kodiert war. Nur Zellen, die das Plasmid aufgenommen hatten und transkribierten, wiesen die entsprechende Resistenz auf. Eine untransfizierte Kontrollplatte mit dem gleichen Zelltyp wurde genauso wie die transfizierte Kulturschale mit einer niedrigen Dosis des Antibiotikums versetzt (z.B. 100µg/ml G418). Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Die Antibiotikum Dosis wurde solange erhöht, bis sich keine lebenden Zellen mehr auf der Kontrollplatte befanden. Die noch lebenden Zellen auf der transfizierten Platte, sollten nun alle das Plasmid aufgenommen haben. Um sicherzustellen, dass die Zellen stabil transfiziert

blieben, musste das entsprechende Antibiotikum dauerhaft zu den Zellen gegeben werden. Die stabile Transfektion wurde mittels Western Blot Analysen verifiziert (5.3.8).

### 5.2.5 Manipulation von Proteasen/Transportmechanismen

Bei der Arbeit mit Zellkulturen ist es möglich durch Zugabe bestimmter chemischer Substanzen, spezifische Proteasen oder andere Proteine in ihrer Funktion zu inhibieren oder aber innerzelluläre Bedingungen zu verändern.

#### 5.2.5.1 Inhibitionstests von Proteinasen

In dieser Arbeit wurden vor allem lysosomale Proteinasen mittels spezieller Inhibitoren gehemmt. Hierfür wurden die Zellen zunächst wie unter 5.2.4.1 ausplattiert und falls notwendig transfiziert. Die Inkubation der Zellen mit den Inhibitoren fand falls nicht anders angegeben über Nacht statt. Die verwendeten Konzentrationen sind in Tab. 6 aufgeführt. Um auszuschließen, dass das Lösungsmittel der Inhibitoren keinen Einfluss auf innerzelluläre Prozesse hat, wurde eine Kontrollplatte mit dem Lösungsmittel versetzt (die Menge orientiert sich an der eingesetzten Menge des Inhibitors).

Substanz	Konzentration
Bafilomycin A1	100 nM
NH <sub>4</sub> Cl	25 mM
Leupeptin	100 µM
E-64-d (EST)	50 µM
Pepstatin A	10 µM

Tab. 6 Konzentrationen eingesetzter Inhibitoren/Chemikalien

#### 5.2.5.2 pH-Veränderungen in Zellkulturen

Neben der Inhibition von Proteasen wurde in dieser Arbeit auch der lysosomale pH-Wert mittels Bafilomycin A1 und Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl) erhöht. Auch diese Substanzen wurden wie oben beschrieben über Nacht mit den Zellen inkubiert und eine Kontrollplatte mit dem Lösungsmittel versetzt.

## 5.3 Proteinbiochemische Methoden

### 5.3.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Zellkulturen

Bei der Herstellung von Proteinlysaten aus Zellkulturen wurden alle folgenden Schritte auf Eis durchgeführt, um eine Degradation der Proteine zu verhindern. Die Kulturschalen wurden zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde je 1ml pro 10cm Schale PBS/complete® auf die Zellen gegeben und die Zellen mittels Zellschabers in ein 1,5ml

Eppendorfgesäß überführt. Die Zellen wurden anschließend bei 3000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Je nach Größe des Pellets wurden die Zellen in 50-500µl PBS/complete® mit 1% Triton X-100 resuspendiert. Die Zellen wurden dann 2x 15sec mittels Ultraschall aufgeschlossen, 30 min auf Eis gelagert und nochmals 2x15sec geultraschallt. Um die Proteine von den Zelltrümmern zu trennen, wurden die Proben anschließend bei 13000rpm für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand enthält die Proteine und wurde in ein neues Eppendorfgesäß überführt. Die Proteinkonzentration wurde wie unter 5.3.4 bestimmt und die Proteine in Lämmli-Puffer aufgenommen und die Proben für 15min bei 55°C erhitzt. Anschließend konnten die Proben mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt oder für einen längeren Zeitraum bei -20°C gelagert werden.

### 5.3.2 Herstellung von Proteinlysaten aus Organen

Um Proteine aus Mausorganen zu gewinnen, wurden die Organe direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die folgenden Schritte wurden ausschließlich auf Eis durchgeführt. Die Organe wurden gewogen und mit 15µl/µg einkaltem TBS/PI versetzt. Die Organe wurden mittels *Precellys Beads* (Bertin Technologies) im *Precellys 24* Rotor nach Angaben des Herstellers homogenisiert. Nachdem die Organlysate eine Stunde auf Eis inkubiert wurden, konnten die Lysate bei 13000rpm für 15 min abzentrifugiert werden. Die Proteinkonzentration wurde wie unter 5.3.4 beschrieben gemessen und die Proteine in Lämmli-Puffer aufgenommen und für 15 min bei 55°C erhitzt. Anschließend konnten die Proben mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt oder für einen längeren Zeitraum bei -20°C gelagert werden.

### 5.3.3 Membranpräparationen

Die Membranpräparation dient der Trennung von Membranproteinen von zytosolischen Proteinen. Die Zellen wurden wie in 5.2 beschrieben ausplattiert gegebenenfalls transfiziert. Anschließend wurden die Zellen wie unter 5.3.1 dargestellt geerntet, in 300µl PBS/Complete® aufgenommen und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Zu 50µl der dieser Lösung wurde 1% Triton-X 100 gegeben und nochmals geultraschallt. Diese Fraktion entsprach dem Totallysate (TL). Die verbliebenen 250µl wurden 10 min bei 3000 rpm abzentrifugiert. 50µl des Überstandes wurde erneut mit 1% Triton X-100 versetzt und mittels Ultraschall behandelt. Diese Probe entsprach der Postnukleären Fraktion (PN). Die restlichen 200µl der Probe wurden in der Beckmann Ultrazentrifuge bei 50000 rpm für 60 min zentrifugiert. Der Überstand beinhaltete nun die zytosolischen (löslichen) Proteine und konnte mit 1% Triton X-100 versetzt werden. Im Pellet befanden sich die Membranproteine. Das

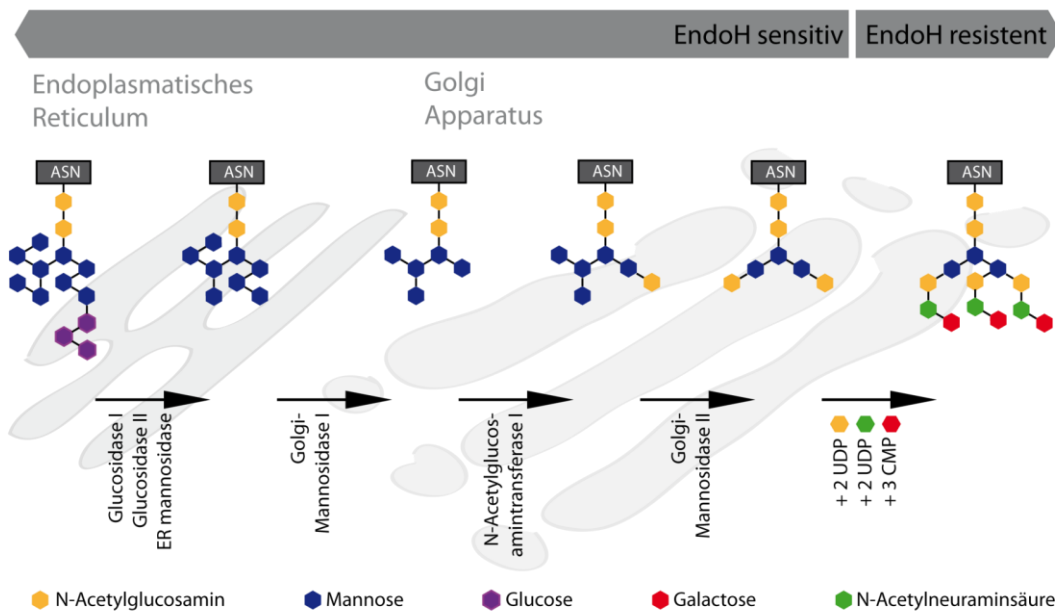
Pellet wurde in 50µl PBS/complete®/1% Triton X-100 aufgenommen und einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Probe bei 13000 rpm für 15 min abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Von allen Proben wurde die Proteinkonzentration wie unter 5.3.4 beschrieben bestimmt und die Proteine in Lämmli-Puffer aufgenommen und für 15 min bei 55°C erhitzt. Anschließend konnten die Proben mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt oder für einen längeren Zeitraum bei -20°C gelagert werden.

#### **5.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zell- oder Organlysaten wurde das *BCA Protein Assay Kit* von Pierce verwendet. Hierfür wurde zunächst eine Standardproteinkonzentrationsreihe nach Angaben des Herstellers vorbereitet. Anschließend wurde eine 1:10 Verdünnung (1:100 bei Organlysaten) der Proteinproben gemacht und jeweils 10µl der Proben als auch der Verdünnungsreihe als Doppelwerte auf eine durchsichtige 96-Well Platte pipettiert. Die Proben wurden mit jeweils 200µl der BCA Reagenz (Reagenz A:B 1:50) versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Währenddessen kam es je nach Proteinkonzentration zu einer Färbung der Proben. Die Intensität der Färbung wurde mit einem im 96-Well-Mikrotiterplattenleser (Biotek Instruments) bei 562 nm gemessen. Die Standardreihe wurde anschließend genutzt, um die Konzentration der Proben daraus abzuleiten.

#### **5.3.5 N-Glykosidase F und Endoglykosidase H Verdau von Proteinen**

Zur Lokalisation von glykosilierten Proteinen, kann man diese Proteine mit N-Glykosidase F (PNGaseF) und Endoglykosidase H (EndoH) verdauen. Nach der Translation werden Glykoproteine im ER zunächst N-glykosiliert, wobei ein Zucker an ein Asparagin angehängt wird. Diese Zuckerreste können alle durch EndoH abgeschnitten werden. Werden die Proteine in den Golgi-Apparat transportiert, können die Zucker der Proteine weiter modifiziert werden (Abb. 14). Hierbei werden die Zucker der Proteine EndoH resistent. Daraus ergibt sich, dass Proteine, die Zucker besitzen, die durch EndoH nicht verdaut werden können, das ER bereits verlassen haben. PNGaseF kann als Positivkontrolle dienen, da dieses Enzym alle Arten von Glykosylierungen verdauen kann.

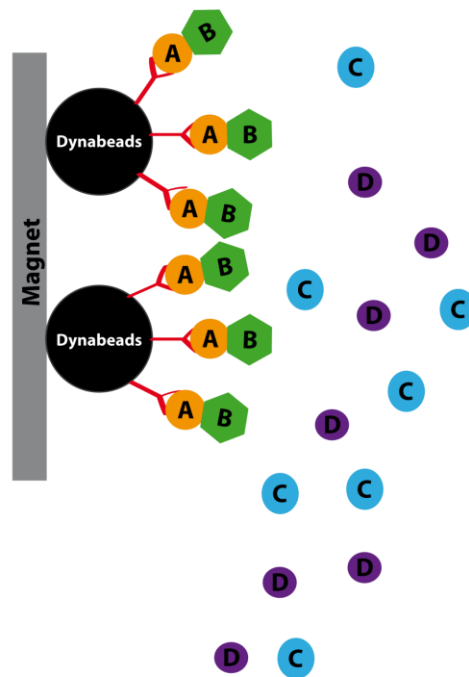


**Abb. 14 Schematische Darstellung des Glyosylierungsprozesses von Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparatus.** Nach: Molecular Biology of the Cell 4th Edition.

Für den Verdau wurden EndoH oder PNGaseF Enzyme mit den entsprechenden Puffern von New England BioLabs verwendet. Eine entsprechende Menge des Proteinlysats wurden mit 1µl 10X Glycoprotein Denaturing Buffer versetzt und auf 10µl Reaktionsvolumen mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Probe wurde für 10 Minuten auf 95°C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Nachdem die Probe abgekühlt war, wurden 2µl des enzymespezifischen Puffers (und 2µl NP40 bei PNGaseF Verdau) und 1µl Enzym sowie 7 (5) µl ddH<sub>2</sub>O zur Probe gegeben und für eine Stunde bei 37°C erhitzt. Anschließend wurde die Probe in Lämmli-Puffer aufgenommen, 15 Minuten bei 55°C erhitzt und mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert.

### 5.3.6 Koimmunpräzipitation

Eine Koimmunpräzipitation wurde durchgeführt, um nachzuweisen, dass zwei oder mehrere Proteine miteinander interagieren. Hierbei wurde ein bestimmtes Protein mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers präzipitiert. Banden auch andere Proteine an das ausgesuchte Protein, wurden diese Proteine ebenfalls isoliert. Zum Nachweis dieser Interaktionsproteine, konnte das Präzipitat mittels SDS-Gelelektrophorese nachgewiesen werden.



**Abb. 15 Schematische Darstellung einer Koimmunpräzipitation.** Das gewünschte Protein A interagiert mit dem spezifischen Antikörpern. Dieser Antikörper bindet an magnetische Dynabeads®. Nur an den Antikörper gebundene Proteine können mittels Magnets fixiert werden. Andere Proteine aus der Probe (C, D) werden nicht präzipitiert. Proteine, die mit dem gewünschten Protein A interagieren (B), können somit ebenfalls isoliert und identifiziert werden.

Zu Beginn wurden pro Ansatz zwei 10cm Schalen der entsprechenden Zellen oder Mausorgane verwendet und wie unter 5.3.1 bzw. 5.3.2 beschrieben die Proteinlysate gewonnen. Hierbei wurde statt PBS/complete®/1% Triton der EBC-Puffer/complete® verwendet. Circa 1500-3000µg Protein wurden anschließend mit 1,5µl des entsprechenden Antikörpers versetzt und über Nacht bei 4°C im Drehrad inkubiert. Gleichzeitig wurden 30µl/Probe der entsprechenden Dynabeads (Invitrogen) mit 1% BSA in PBS ebenfalls über Nacht blockiert. Am folgenden Tag wurde die Lösung von den Dynabeads abgenommen und die Probe auf die Beads gegeben. Beides wurde für 45 Minuten im Drehrad inkubiert. Die Beads wurden anschließend 4x mit 100µl EBC-Puffer/complete® gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen und 60µl 1x Lämmli-Puffer zu den Beads gegeben und für 15 Minuten bei 55°C erhitzt. Der Überstand konnte nun mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert werden.

### 5.3.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) diente der Trennung von Proteinen der Größe nach. Dabei wanderten die negativ geladenen Proteine durch ein elektrisches Feld zum Pluspol. Die kleinen Proteine wanderten hierbei schneller als die Größeren.

Um die Proteine in der SDS-PAGE zu trennen, wurden diese zuvor in Lämmli-Puffer denaturiert. Die entsprechende Menge wurde nun in die Kammern eines SDS-Gels geladen, wobei sich die Polyacrylamid-Konzentration des Gels nach der Größe der aufzutrennenden Proteine richtete. Es wurde eine Spannung zwischen 80 und 180V angelegt. Als Größenmarker lief der *Page Ruler Prestained Plus* (Fermentas) ebenfalls während der SDS-PAGE mit. Das Gel wurde anschließend im Western Bot Verfahren weiter verwendet.

### 5.3.8 Western Blotting

Um die Proteine, die mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden, nachweisen zu können, wurde das Western Blot Verfahren durchgeführt. Hierbei wurden die mittels SDS-PAGE getrennten Proteine auf eine Trägermembran übertragen und dann mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. In dieser Arbeit wurde lediglich das TANK-Blot Verfahren verwendet.

#### 5.3.8.1 TANK-Blot Verfahren

Um die Proteine von dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran zu übertragen, wurden die *Whatman*-Papiere, die Membran, das Gel und die Blotkammer wie in Abb. 16 gezeigt zusammengebaut. Um dies luftblasenfrei zu gewährleisten, wurden die Materialien in einer kleinen Wanne, die mit TANK-Blot-Puffer gefüllt wurde, zusammengefügt. Anschließend wurden die Proteine entweder für eine Stunde bei 100V oder über Nacht bei 20V und danach 30min bei 70V auf die Membran geblottet. Danach wurde die Membran in 2% Milchpulver in TBST für 30 min inkubiert, um die Membran für die anschließende Antikörperfärbung zu blockieren und unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern.

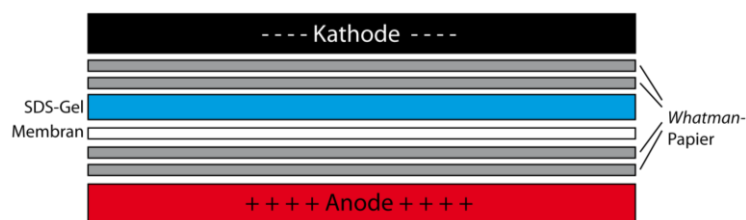


Abb. 16 Apparationsaufbau bei der TANK-Western-Blot Methode.

#### 5.3.8.2 Antikörperfärbung und Strippen von Western Blots

Bei der Antikörperfärbung beim Western Blotting wurde die Nitrocellulosemembran zunächst für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit dem in 2% Milchpulver in TBST gelöstem Antikörper inkubiert. Die Verdünnung lag hierbei je nach verwendetem Antikörper zwischen 1:100 – 1:3000. Anschließend wurde die Membran dreimal 10 Minuten in TBST gewaschen. Um eine Chemilumineszenzreaktion zu ermöglichen und ebenfalls die



Intensität des Signals zu steigern, wurde ein Sekundärantikörper benutzt, der an den Erstantikörper binden kann und außerdem mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt war. Dieser wurde wieder in 2% Milchpulver 1:10.000 gelöst und die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in diesem inkubiert. Nach weiteren drei Waschschrritten wurde das HRP-Signal mit einer HRP-katalysierenden Chemilumineszenzreaktion (*ECLadvanced Western Blotting Detection Systems*, Amersham) und einer Chemilumineszenzkamera aufgenommen.

Danach konnte die Membran für eine weitere Antikörperfärbung wiederverwendet werden. Um die zuvor gebundenen Antikörper von der Membran zu lösen, wurde diese für 30 min bei 70°C in Stripping-Puffer inkubiert. Danach wurde die Membran 5-10-mal in TBST gewaschen bis das  $\beta$ -Mercaptoethanol nicht mehr zu riechen war. Danach konnte die Membran wieder in 2% Milchpulver in TBST blockiert und wie oben beschrieben gefärbt werden.

### **5.3.8.3 Densitometrische Auswertungen von Western Blots**

Bei der densitometrischen Auswertung von Western Blots konnten die Intensitäten einzelner Proteinbanden ermittelt werden, wobei davon ausgegangen wurde, dass die Intensität mit der Menge des Proteins korreliert. Zur Ermittlung der Bandenintensität wurde die *Image J* Software verwendet. Mit dem Rechteckwerkzeug des Programms wurden die Proteinbanden eingegrenzt. Die Software konnte dann deren Intensität mit Hilfe eines Integrals berechnen. Um verschiedene Proben miteinander vergleichen zu können, wurden die Proteinbanden jeweils auf die Intensität der Proteinbande eines Kontrollproteins normiert.

### **5.3.9 Luziferase-Assay**

Bei der Methode des Luziferase-Assays wurde die Expressionsrate einer Luziferase für die indirekte Quantifizierung von speziellen Signalwegen verwendet. Dabei machte man es sich zur Nutze, dass die Luziferasen in der Lage war ihr Substrat so umzusetzen, dass ein Lichtsignal entstand, das dann mittels eines Luminometers gemessen werden konnte.

In dieser Arbeit wurde der Wnt-Signaling Luziferase-Assay verwendet. Beim Wnt-Signaling Luziferase-Assays verwendete man ein Plasmid, dass hinter dem Wnt-Signalsweg anhängigen Promotor (TCF/LEF) das Firefly Luziferase Gen besaß. Dieses Gen wurde dementsprechend nach der Aktivierung des Wnt-Signalswegs expremiert. Es wurde das *Dual-Luciferase<sup>TM</sup> Reporter (DLRTM) System von Promega* (Mannheim) verwendet.

Vektor	Name	Promotor	Gen
pGL4-TOPflash	TOP	TCF/LEF	Firefly Luziferase
pGL4-FOPflash	FOP	Mutierter TCF/LEF	Firefly Luziferase
pGL4-Renilla	Renilla	Konstitutiv aktiv	Renilla Luziferase

Tab. 7 Verwendete Plasmide im Wnt-Signaling Luziferase Assay.

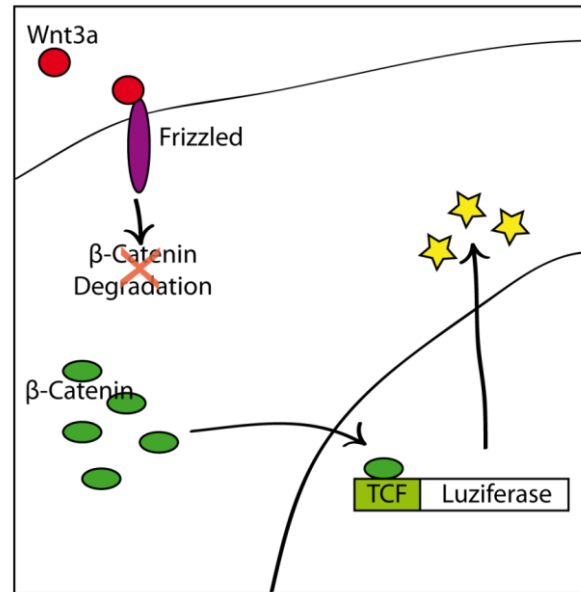


Abb. 17 Schematische Darstellung des Wnt-Signalweges. Nach Aktivierung des Signalweges mittels Wnt3a-Mediums wird der β-Catenin-Degradationskomplex inhibiert und β-Catenin kann als Transkriptionsfaktor in den Nucleus wandern und an den TCF/LEF Promotor binden. Dies führt zur Expression des Luziferase-Gens und der Translation des entsprechenden Proteins. Im Luziferase-Assay kann die Menge an exprimierter Luziferase mittels umgesetzten Substrats ermittelt werden.

### 5.3.9.1 Wnt-Signaling Luziferase Assay

Zunächst wurden die entsprechenden Zellen dünn in 24-Well Platten ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen wie in Tab. 8 aufgezeichnet transfiziert. Das FOP Konstrukt diente hierbei als Negativkontrolle, da der Wnt-spezifische Promotor mutiert wurde. Das Renilla Konstrukt wurde für die Transfektionskontrolle verwendet, um einzelne Proben miteinander vergleichen zu können. Circa 18h vor der Messung wurden die Zellen mit Wnt3a Medium (1:2 mit Zellkulturmedium gemischt) oder mit dem L-Medium (1:2 mit Zellkulturmedium gemischt) als Negativkontrolle versetzt und eventuelle Inhibitoren hinzugefügt und im Inkubator weiter wachsen gelassen. Danach konnten die Proben analysiert werden. Dafür wurden die Wells zweimal mit PBS gewaschen und die Messung nach Angaben des Herstellers des *Dual- Luciferase™ Reporter-Assay-Kits* (Promega) durchgeführt. Die Proben wurden letztendlich auf ihre Renilla bzw. Firefly Luziferase

Aktivität mit dem *Run Promega Protocoll-DLR-DLR-2-injections*-Programm der *Glomax* Software des Promega-Luminometers gemessen. Dieses Programm normalisierte nach der Messung die Firefly-Luziferase-Aktivität direkt auf die Renilla-Luziferase-Aktivität als Transfektionskontrolle. Diese Werte wurden exportiert, um sie mittels Excel Programm weiter zu analysieren. Hierbei wurde zunächst die TOP/Renilla Aktivität auf die FOP/ Renilla Aktivität für jede einzelne Probe normalisiert. So erhielt man für jede Probe einen normalisierten Wert für die mit Wnt3a-Medium bzw. L-Medium behandelten Zellen. Lag in den Zellen kein aktivierter Wnt-Signalweg vor, sollte der Kontrollwert eine Aktivität um den Wert 1 haben. Ein höherer Wert deutete auf eine Aktivierung des Signalweges ohne äußere Stimulation hin (z.B. durch Mutationen im Komplex, der für den Abbau von  $\beta$ -Catenin zuständig ist). Ließen sich Zellen mit Wnt3a-Medium stimulieren, sollte man eine erhöhte Aktivität der stimulierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen erhalten. Diese Erhöhung ließ sich jetzt zwischen einzelnen Zellen vergleichen und Rückschlüsse auf den Einfluss z.B. einzelner Proteine oder Inhibitoren zu.

Renilla/ng	TOP oder FOP/ng	Weiteres Konstrukt/ $\mu$ g	DMEM only/ $\mu$ l	Turbofekt
<b>HEKs</b>				
25	225	225	50	2 $\mu$ l/ $\mu$ g DNA
<b>MEFs</b>				
100	900	900	50	2 $\mu$ l/ $\mu$ g DNA

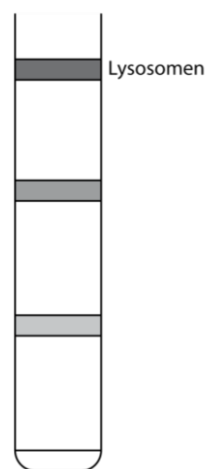
**Tab. 8** Pipettierschema für den Wnt-Signaling Luziferase Assay pro Well einer 24 Well-Platte.

### 5.3.10 Tritosomenpräparation

Bei der Präparation von Lysosomen durch einen Sucrosegradienten, kann die lysosomale Fraktion aufgrund gleicher Dichte nur ungenügend von der mitochondrialen Fraktion getrennt werden. Bei der Tritosomenpräparation behandelte man die verwendeten Mäuse vier Tage vor der Organentnahme zunächst mit Triton WR1339 (Tyloxapol). Dies führte dazu, dass die Lysosomen in der murinen Leber eine niedrigere Dichte erhalten und sich somit in einem Sucrosegradienten von den Mitochondrien trennen ließen.

Die Mäuse wurden zunächst mit 4  $\mu$ l/g Körpergewicht 17% Triton WR1339 (Tyloxapol) in 0.9% NaCl intraperitoneal injiziert. Nach vier Tagen wurden die Lebern den Mäusen entnommen und in 5ml eiskalter 0,25M Sucrose aufgenommen und mittels Teflonpotters homogenisiert. Danach wurde der Potter mit weiteren 5ml 0,25M Sucrose gespült und mit dem Leberhomogenat vereinigen. Das Homogenat wurde dann bei 1141g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,25M Sucrose resuspendiert und bei 56.500g für 7 min

zentrifugiert (Ti 70.1 rotor). Das entstehende Pellet wurde erneut in 0,25M Sucrose resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet 3ml in  $\rho$  1.21 Sucroslösung aufgenommen. Die Lösung wurde in Ultrazentrifugenröhrchen (10ml) gefüllt. Darüber wurde ein Sucrosegradient geschichtet aus jeweils 3ml  $\rho$  1.15,  $\rho$  1.14,  $\rho$  1.06 Sucrose und der Gradient für 2,5 Stunden bei 111.000g zentrifugiert (SW40 *swinging bucket rotor*). Die Lysosomen waren in der Interphase 1 zu detektieren (Abb. 18). Diese Phase wurde vorsichtig abgenommen. Nach der Proteinkonzentrationbestimmung wurden die Proteine in Lämmli-Puffer aufgenommen und 10 min bei 55°C erhitzt. Die Proben konnten anschließend mittels SDS-PAGE analysiert werden.



**Abb. 18** Verteilung der Fraktionen nach der Dichtegradientenzentrifugation. Lysosomen akkumulieren in Interphase 1.

### 5.3.11 *In vitro* Proteolyse-Assay

Für den *in vitro* Proteolyse-Assay wurde rekombinantes hLIMP-2 in der angegebenen Menge verwendet (0,25 $\mu$ g pro Lane bei Western Blot und 3 $\mu$ g pro Lane im Silbergel). Das Enzym wurde mit einer Endkonzentration von 20nM hinzugegeben und der Ansatz mit Proteolyseassay-Puffer (eventuell nach Zugabe entsprechender Inhibitoren) auf das entsprechende Endvolumen (20 $\mu$ l pro Lane) aufgefüllt. Die Proben wurden dann für den angegebenen Zeitraum (0-60min) bei 37°C in einem Thermomixer inkubiert. Die Reaktion wurde mittels Lämmli und dem Erhitzen der Proben auf 55°C für 15 min abgestoppt. Die Proben konnten anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blotting analysiert werden. Für die Untersuchung mittels Silbergefärbung wurde das *Silver Stain Kit* von Thermo Fisher Scientific nach Herstellerangaben benutzt.

## 5.4 Mikroskopische Methoden

### 5.4.1 Fixierung von Zellen und Immunfluoreszenzfärbung von Proteinen

Durch die Immunfluoreszenzfärbung konnten Proteine spezifisch sichtbar gemacht werden und ihre Lokalisation mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie ermittelt werden.

Die Zellen wurden zunächst auf Coverslips in 6-Well Platten ausplattiert und falls nötig wie unter 5.2.4 beschrieben transfiziert oder gegebenenfalls wie unter 5.2.5 beschrieben mit Inhibitoren/pH-beeinflussenden Substanzen behandelt. Dann wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 20 min bei Raumtemperatur mit 4% PFA/PBS fixiert. Die Zellen wurden dann erneut dreimal mit PBS gewaschen.

Um die Zellen zu permeabilisieren und somit für die Antikörper zugänglich zu machen, wurden die Zellen zunächst 5 min in 0,2 % Saponin/PBS und anschließend 10 min in 0,2 % Saponin/0,12% Glycin/PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Reduktion von unspezifischen Antikörperbindungen wurden die Zellen für 20 min mit 0,2 % Saponin/10%FCS/PBS blockiert. Der Erstantikörper – wie auch später der Zweitantikörper - wurde anschließend in der Blockierlösung angesetzt. Für jeden Coverslip wurden 30µl Erstantikörperlösung auf einem Parafilmstreifen in einer feuchten Kammer vorgelegt und das Coverslip mit den Zellen zur Antikörperlösung darauf platziert. Nach einer Stunde wurden die Coverslips viermal in 0,2 % Saponin/PBS gewaschen und direkt auf der Zweitantikörperlösung platziert. Da es sich um Fluorophor-gekoppelte Zweitantikörpern handelte, wurden die Zellen nun im Dunkeln in der feuchten Kammer für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Coverslips erneut viermal in 0,2 % Saponin/PBS und zweimal in Wasser gewaschen. Danach wurden sie in DAPI/DABCO/Mowiol oder nur DABCO/Mowiol auf einem Objektträger eingebettet. Die Proben mussten über Nacht aushärten, bevor sie mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie ausgewertet werden konnten.

### 5.4.2 Probenaufnahme mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop

Nachdem die Proben für die konfokale Laser Scanning Mikroskopie ausgehärtet waren, konnten sie am Mikroskop aufgenommen werden. In dieser Arbeit wurde das konfokale Laserscanning-Mikroskop *Fluoview 1000* (Olympus) verwendet. Je nach verwendeten Fluorophor-gekoppelten Zweitantikörpern wurden entsprechenden Laser verwendet. Die Aufnahmen erfolgten im *sequential*-Modus, was ein Überstrahlen einzelner Fluorophore in andere Kanäle verhinderte. Die Zellen wurden bei 60- oder 100-facher Vergrößerung und einem optischen Zoom zwischen 1-3 aufgenommen. Die Belichtungsdauer pro Pixel lag zwischen 20 und 100µs und die Aperturblende wurde automatisch von der Mikroskop

Software gewählt. Die Aufnahmen wurden mit der *FV1000-ASW 3.0 Viewer*-Software erstellt, exportiert und eventuell mittels Photoshop weiterbearbeitet.

### **5.5 Statistische Auswertungen**

Zur statistischen Auswertung von Western Blots wurde zunächst die Bandenintensität der entsprechenden Proteine mittels ImageJ Software ermittelt. Diese und weitere Daten aus anderen Experimenten wurden anschließend mittels GraphPad Prism Software ausgewertet. Statistische Analysen wurden erst ab einer Fallzahl von mindestens drei durchgeführt. Hierbei wurde ein ANOVA mit anschließendem Tukey's post hoc verwendet. Fehler wurden immer als  $\pm$ SEM (*standard error of mean*) angegeben. Als statistisch signifikant galten Werte von \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

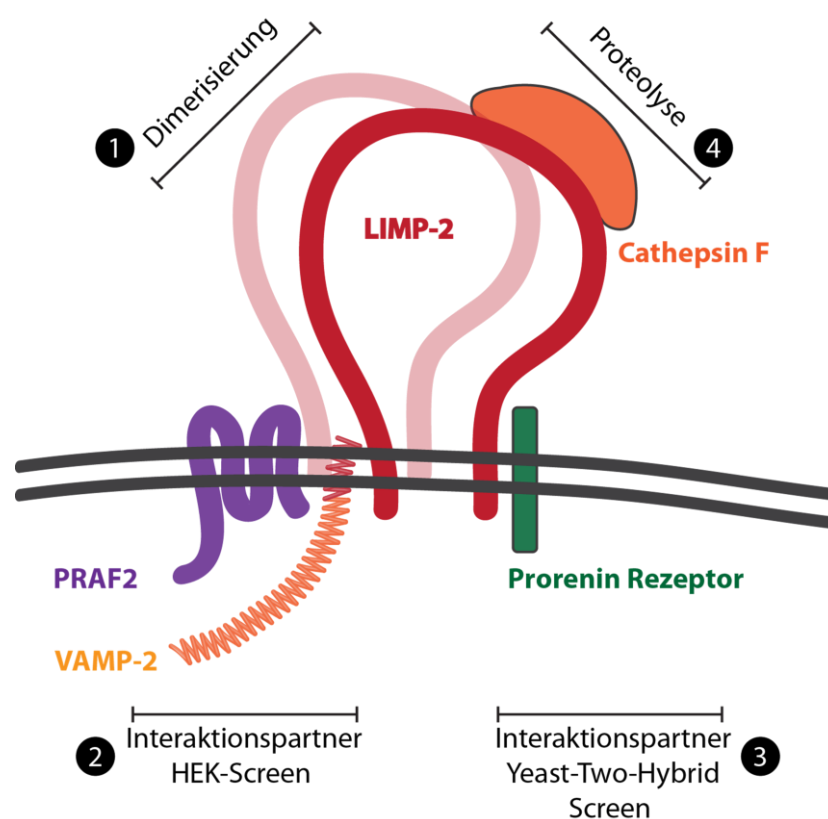
### **5.6 Arbeiten mit Mäusen**

Verwendete LIMP-2-defiziente Mäuse wurden bereits beschrieben (Gamp et al. 2003; Berkovic et al. 2008). Alle Arbeiten an Mäusen wurden nach den EU-Richtlinien zur Behandlung von Labortieren durchgeführt.

## 6 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollten potenzielle neue Funktionen von LIMP-2 untersucht werden. Da Funktionen unter anderen durch die Dimerisierung des Proteins oder durch die Interaktion oder Modifikation durch einen Interaktionspartner moduliert werden können, wurden diese verschiedenen Möglichkeiten in dieser Arbeit untersucht (Abb. 19).

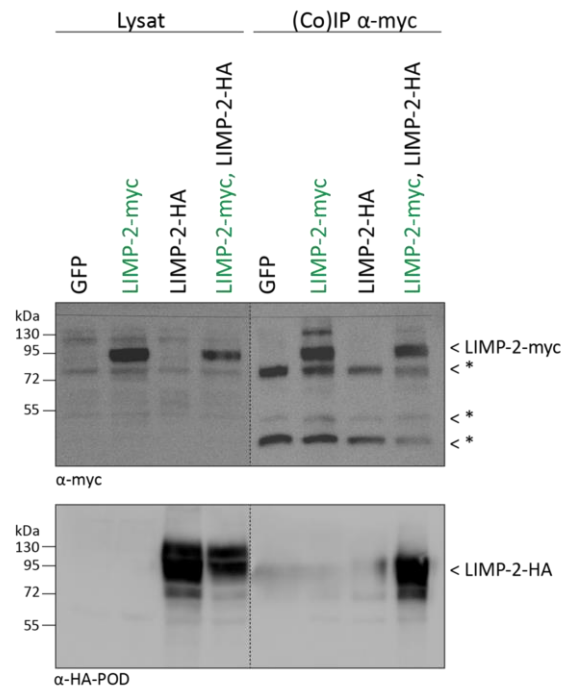
Hierbei wurde zunächst die Dimerisierung von LIMP-2 genauer betrachtet (6.1). Zusätzlich wurden in dieser Arbeit PRAF2 und VAMP-2 als potenzielle Interaktionspartner verifiziert (6.2), die zuvor in einem sogenannten HEK-Screen (Affinitätschromatographie) identifiziert werden konnten. Des Weiteren wurde der Prorenin Rezeptor, der bereits in früheren Studien in einem Yeast-Two-Hybrid Screen als Interaktionspartner identifiziert worden war, und seine Interaktion mit LIMP-2 charakterisiert (6.3). Letztendlich wurde noch die proteolytische Spaltung von LIMP-2 beschrieben und funktionell untersucht (6.4).



**Abb. 19 Zusammenfassung der untersuchten Interaktionspartner von LIMP-2.** In dieser Arbeit wurden potenzielle Interaktionspartner aus einem Yeast-Two-Hybrid bzw. HEK Screen untersucht. Des Weiteren wurde die Dimerisierung von LIMP-2 verifiziert und letztendlich auch die Proteolyse von LIMP-2 funktionell untersucht.

## 6.1 LIMP-2 geht eine stabile Dimerisierung ein

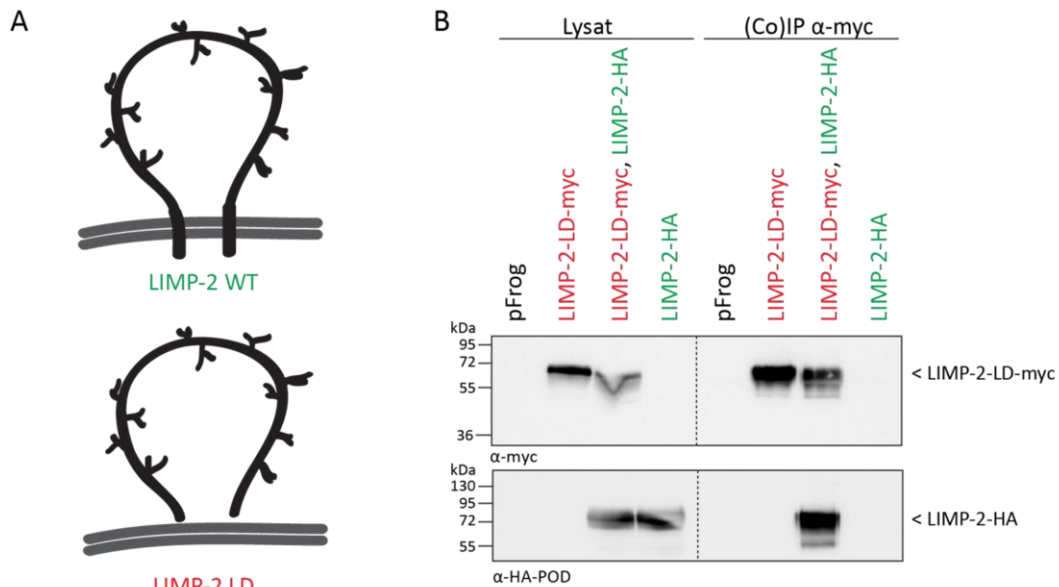
Wie bereits mittels photosensitivem Crosslinking von Proteinen gezeigt werden konnte, dimerisiert LIMP-2 (Groth 2012). Zur Verifizierung wurden Koimmunpräzipitationen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass HA-getaggtetes Wildtyp LIMP-2 mit myc-getaggtetem Wildtyp LIMP-2 nach Überexpression kopräzipitiert werden kann; die beiden Proteine dementsprechend miteinander interagieren (Abb. 20).



**Abb. 20 LIMP-2 WT/LIMP-2 WT Koimmunpräzipitation in Cos7-Zellen.** Cos7-Zellen wurden mit den entsprechenden LIMP-2 Konstrukten transfiziert. Die Zellen wurden nach 48h geerntet und eine Koimmunpräzipitation mittels myc-Antikörpers durchgeführt. Die gewonnenen Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blotting analysiert. \* markiert unspezifische Antikörper-Banden. HA-getaggtetes LIMP-2 kann mit myc-getaggtetem LIMP-2 kopräzipitiert werden.

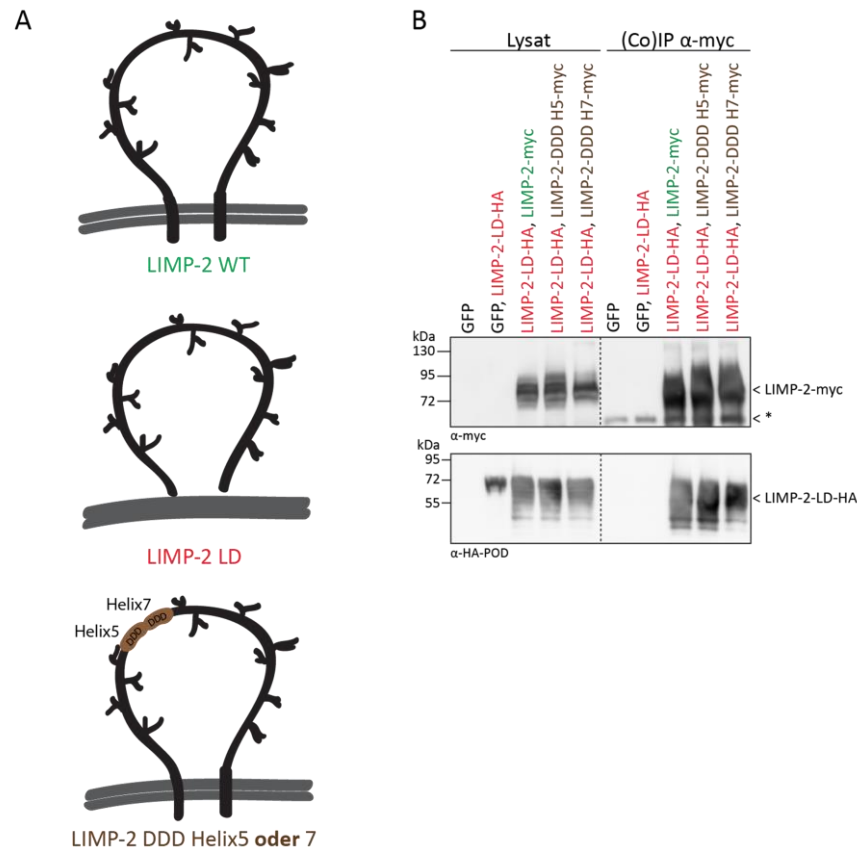


Zur weiteren Analyse der Dimerisierung, sollte mittels LIMP-2-Mutanten die Interaktionsstelle verifiziert werden. Hierzu wurde zunächst eine LIMP-2-Mutante verwendet, der beide Transmembrandomänen fehlen und somit nur noch die luminaire Domäne von LIMP-2 (LIMP-2-LD) besitzt. Auch diese Mutante konnte mit Wildtyp LIMP-2 präzipitiert werden, sodass die Transmembrandomänen nicht essentiell für die Interaktion zu sein schienen (Abb. 21).



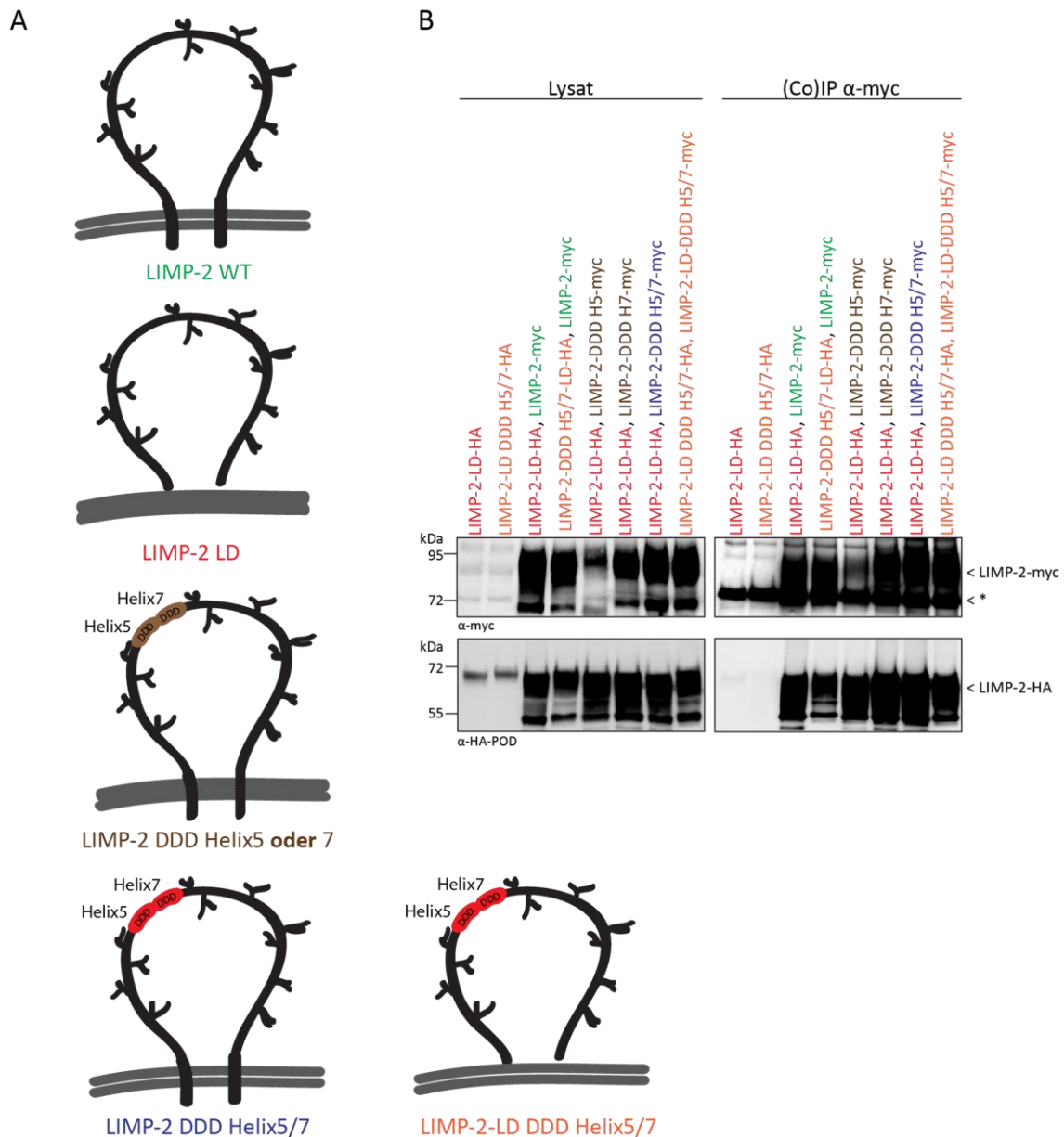
**Abb. 21 LIMP-2 WT/LIMP-2 luminaire Domäne Koimmunpräzipitation in Cos7-Zellen.** A) Schematische Zeichnung von LIMP-2 Wildtyp (WT) und der LIMP-2-LD Mutante. LIMP-2-LD bezeichnet die luminaire Domäne von LIMP-2. B) 48h vor der Ernte wurden je zwei Schalen Cos7-Zellen mit den angegebenen LIMP-2 Konstrukten transfiziert. Die Koimmunpräzipitation wurde mittels myc-Antikörpers durchgeführt und die Lysate mittels SDS-PAGE und Western Blotting analysiert. myc-getaggetes Wildtyp LIMP-2 kann mit der HA-getaggeten luminaire Domäne von LIMP-2 präzipitiert werden.

Anschließend wurde die Interaktion der LIMP-2-LD-Mutante mit LIMP-2-Mutanten, in denen die Ligandenbinderegion (Helix 5/7) mutiert ist und die somit kein  $\beta$ -GC mehr binden können, untersucht. Da diese Region nicht von Glykosylierungen abgeschirmt wird, stellt sie eine favorisierte Interaktionsstelle dar (Blanz et al. 2010; Neculai et al. 2013). Koimmunpräzipitationen zeigten allerdings, dass diese Mutanten immer noch in der Lage sind, die luminaire Domäne von LIMP-2 zu binden (Abb. 22).



**Abb. 22 LIMP-2 Ligandenbinderegion Mutanten/LIMP-2 luminaire Domäne Koimmunpräzipitation in Cos7-Zellen.** A) Schematische Darstellung von LIMP-2 Wildtyp (WT) und der LIMP-2-DDD Helix 5 oder Helix 7 Mutante, bei denen je drei Aminosäuren in Helix 5 oder Helix 7 gegen Asparaginsäuren ausgetauscht wurden. B) 48h vor der Ernte wurden je zwei Schalen Cos7-Zellen mit den angegebenen LIMP-2 Konstrukten transfiziert. Die Koimmunpräzipitation wurde mittels myc-Antikörpers durchgeführt und die Lysate mittels SDS-PAGE und Western Blotting analysiert. \* markiert unspezifische Antikörper-Banden. Die HA-getaggte luminaire Domäne von LIMP-2 kann mit myc-getaggetem LIMP-2 mit Mutationen in Helix 5 oder 7 kopräzipitiert werden.

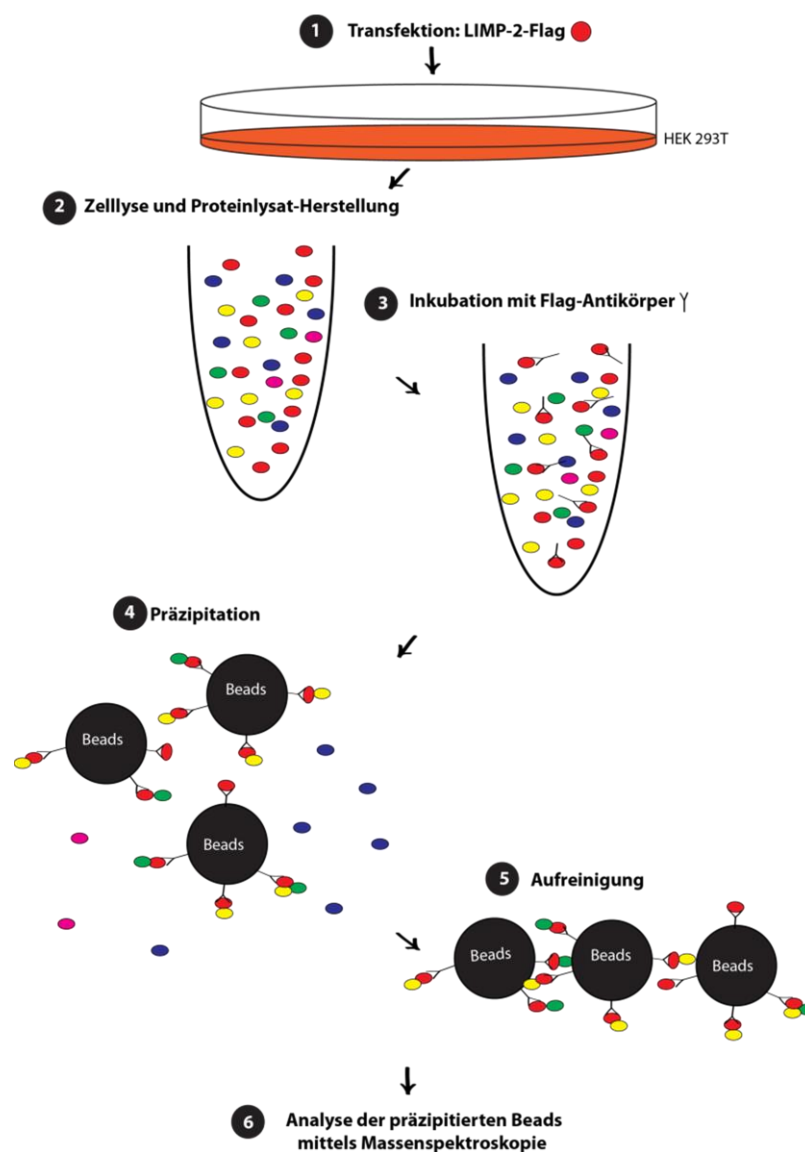
Eine Koimmunpräzipitation war ebenfalls möglich, wenn in beiden HA-oder myc-getaggten LIMP-2-Konstrukten sowohl Helix 5 und Helix 7 mutiert sind und dem Protein zusätzlich die Transmembrandomänen fehlten (Abb. 23).



Diese Experimente zeigten, dass alle Mutanten eine Dimerisierung ermöglichten und somit LIMP-2 ein sehr stabiles und dementsprechend möglicherweise funktionell relevantes Homodimer bildet und es vermutlich mehrere Interaktionsstellen gibt. Da keine Mutante generiert werden konnte, die keine Dimerisierung mehr einging, wurden keine weiteren Analysen zur Funktion der Dimerisierung angeschlossen.

## 6.2 Identifizierung neuer Interaktionspartner mittels HEK-Screens

Zur Identifizierung neuer Interaktionspartner von LIMP-2 wurde von Stefanie Jäger (University of California-San Francisco) ein sogenannter HEK Screen durchgeführt (Jäger et al. 2011; Jäger et al. 2012; Jäger et al. 2012). Hierbei wurde das LIMP-2-Protein in HEK-Zellen überexprimiert und die in einer Koimmunpräzipitation interagierenden Proteine mittels massenspektrometrischer Analyse verifiziert (Abb. 24). Durch den Vergleich mit anderen Screenings konnte eine Einteilung nach der Wahrscheinlichkeit berechnet werden, inwieweit es sich um eine spezifische Interaktion handelte (comPASS (Coon OMSSA Proteomic Analysis Software Suite) und MiST (Mass Spectrometry Interaction Statistics) Score).



**Abb. 24** Schematische Darstellung der Affinitätschromatografie des HEK-Screens. HEK-Zellen werden mit Flag-getaggetem LIMP-2 transfiziert. Anschließend werden die Zellen lysiert und Proteinlysate gewonnen. Diese werden dann mit einem anti-Flag Antikörper inkubiert. LIMP-2-Flag und die entsprechenden interagierenden Protein binden an die Antikörper. Anschließend werden Beads zu der Probe gegeben, an die der Antikörper spezifisch bindet. Danach werden die Beads gewaschen, wodurch nicht gebundene Proteine entfernt werden. Die Beads mit den gebundenen Proteinen werden dann mittels Massenspektroskopie analysiert.

Tabelle 9 zeigt die mit LIMP-2 interagierenden Proteine in drei unabhängig voneinander durchgeführten Koimmunpräzipitationen sortiert nach dem comPASS und MiST Score. Um zu entscheiden, welche möglichen Interaktionspartner näher untersucht werden sollten, wurden die Lokalisation und die biologische Funktion der einzelnen potenziellen Interaktionspartner mittels [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org) zusammengestellt.

$\beta$ -GC wurde als bereits gut untersuchter Ligand von LIMP-2 mit der höchsten Wahrscheinlichkeit als Interaktionspartner identifiziert. Bei der Analyse der weiteren potenziellen Interaktionspartner zeigte sich, dass unter den ersten 63 Proteinen der Großteil im Nukleus oder im Zytoplasma lokalisiert war. Potentielle Interaktionspartner für LIMP-2 wären allerdings besonders interessant, wenn diese ebenfalls in Lysosomen oder vesikulären Strukturen zu finden sind. Lediglich PRAF2, das die zweithöchste Wahrscheinlichkeit einer Interaktion aufweist, wurde in Endosomen beschrieben und wurde dementsprechend als potenzieller Interaktionspartner weiter untersucht (6.2.1). Zusätzlich wurde noch VAMP-2 als putativer Interaktionspartner von LIMP-2 überprüft. Auch wenn dieses Protein mit einer eher geringen Wahrscheinlichkeit als Interaktionspartner gelistet ist, war seine Bedeutung als Protein in der neuronalen Reizweiterleitung ausschlaggebend für weitere Untersuchungen, da LIMP-2 defiziente-Mäuse und AMRF-Patienten neurologische Symptome aufweisen, deren zugrundeliegender Mechanismus in Abhängigkeit von LIMP-2 noch weitestgehend unklar ist (Berkovic et al. 2008, Rothaug et al., 2014).

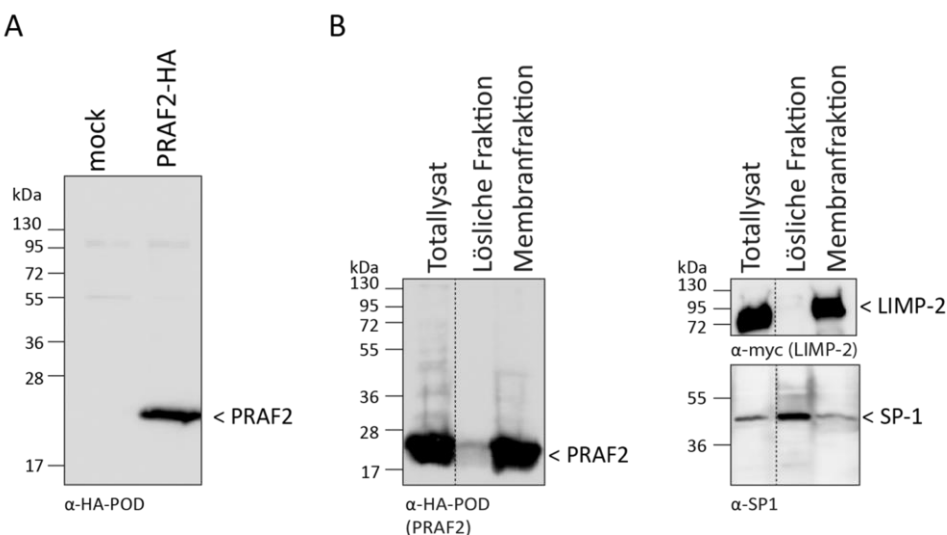
Häufigkeit der Interaktion (n=3)	comPA SS	MiST Score	Protein Name (human)	Abkürzung	Lokalisation nach UniProt	Involviert in folgenden Zellprozessen nach UniProt
3	4,5432	0,7399	β-Glucosylceramidase	β-GC	Lysosom	Lipid und Sphingolipid Metabolismus
3	0,4873	0,3395	PRA1 family protein 2	PRAF2	Endosomen	Protein und Molekül Transport
3	0,1461	0,2866	HEAT repeat-containing protein 2	HEATR2	Zytoplasma	unbekannt
3	0,1230	0,2926	Glucosidase 2 subunit beta	PRKCSH	ER	N-Glycan Spaltung, Signaltransduktion, Proteinfaltung und weitere
2	0,1223	0,2450	Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1	Protein Orf	Zytoplasma	Transkription
2	0,1161	0,2597	Peptide-N(4)-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase	PNGase	Zytoplasma	Glykoprotein Abbau
3	0,0846	0,2931	Transportin-1	Transportin-1	Zytoplasma, Nukleus	Genexpression, Proteintranslokation in den Nukleus und weitere
3	0,0812	0,2161	Transportin-2	Transportin-2	Zytoplasma, Nukleus	Proteintransport
3	0,0674	0,3080	Neutral alpha-glucosidase AB	GANAB	ER, Golgi	Proteinmetabolismus, Proteinfaltung und weitere
2	0,0663	0,3073	Symplekin	Symplekin	Zytoplasma, Nukleus, Zellverbindungen	Zelladhäsion, RNA Polyadenylierung
2	0,0639	0,1519	Apoptosis regulator BAX	BAX	Zytoplasma, Mitochondrien	Apoptosis
3	0,0514	0,2978	Exportin-5	Exp5	Zytoplasma, Nukleus	RNA Bindung, Protein Bindung
3	0,0486	0,2977	Exportin-2	Exp2	Zytoplasma, Nukleus	Apoptose, Proteinexport aus dem Nukleus, Zellproliferation
2	0,0467	0,2204	Sister chromatid cohesion protein PD55 homolog A	SCC-112	Nukleus	Mitose
1	0,0383	0,6855	Transgelin	Transgelin	Zytoplasma	Epitheliale Zelldifferenzierung
3	0,0346	0,3110	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	VDAC-2	Mitochondrien	Ionentransport
3	0,0345	0,3166	Exportin-1	Exp1	Zytoplasma, Nukleus	Genexpression, Proteinexport aus dem Nukleus, Zellproliferation und weitere
1	0,0331	0,6855	5'-AMP-activated protein kinase subunit beta-2	AMPK subunit β-2	Zytoplasma, Nukleus	Fettsäurenmetabolismus, Lipidmetabolismus
3	0,0320	0,2766	Importin-4	Imp4	Zytoplasma, Nukleus	Proteintransport, Nucleosome Assemblierung
3	0,0315	0,2713	Cullin-associated NEBD8-dissociated protein 1	CAND1	Zytoplasma, Nukleus	Protein Ubiquitinierung, Zelldifferenzierung und weitere
3	0,0287	0,2912	Uncharacterized protein C11orf84	-	unbekannt	unbekannt
2	0,0272	0,2040	Cytochrome b5 type B	CYB5B	Mitochondrien	Oxidation/Reduktion
3	0,0256	0,3063	Calnexin	Calnexin	ER	Proteinfaltung, Endocytose, Synaptische Vesikel Endozytose und weitere
3	0,0254	0,3036	Spindlin-1	SPIN1	Nukleus	Zellzyklus, Meiose, Wnt-Signalweg
1	0,0247	0,6855	Ush domain-containing protein FOPNL	FOPNL	Zytoplasma	Cilien Biogenese
2	0,0247	0,1929	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	VDAC-3	Mitochondrien	Adenin Transport
2	0,0241	0,2009	Condensin complex subunit 2	hCAP-H	Nukleus	Zellzyklus
1	0,0239	0,6855	Kruppel-like factor 12	KLF12	Nukleus	Transkription
3	0,0238	0,3003	Cytochrome c oxidase subunit 2	COX2	Mitochondrien	Elektronentransport in der Atmungskette
2	0,0223	0,1961	Protein CIP2A	CIP2A	Zytoplasma	Inhibition der Serine/threonine-protein phosphatase PP2A
3	0,0222	0,3095	Prohibitin	PHB	Mitochondrien	DNA Synthese
3	0,0217	0,2964	C-Myc-binding protein	MYCBP	Zytoplasma, Mitochondrien, Nukleus	Transkription
3	0,0211	0,3032	TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 1	TAB1	Zytoplasma, Endosomen, Nukleus	Embryogenese
3	0,0210	0,2649	Serine/threonine-protein kinase 38-like	STK38L	Zytoplasma	ATP Bindung, Neuronale Entwicklung und weitere
3	0,0205	0,2871	BolA-like protein 2	BOLA2	unbekannt	unbekannt
3	0,0204	0,2913	Ankyrin repeat and FYVE domain-containing protein 1	ANKFY1	Zytoplasma, Endosomen	Bindung von Metallionen
3	0,0201	0,2977	Cooperator of PRMT5	COPRS	Zytoplasma, Nukleus	Myogenese, Transkription
1	0,0189	0,6855	Protein FAM63B	FAM63B	unbekannt	unbekannt
2	0,0186	0,1968	Protein phosphatase 1A	PPM1A	Zytoplasma, Nukleus	Zellzyklus, Wnt-Signalweg und weitere
3	0,0183	0,2632	Mitochondrial inner membrane protein	IMMT	Mitochondrien	Kalziumionen Homeotase
3	0,0176	0,3068	Prohibitin-2	PHB2	Zytoplasma, Mitochondrien, Nukleus	Transkription
3	0,0172	0,3035	Protein phosphatase 1B	PPM1B	Zytoplasma	NF-kappaB-Signalweg und weitere
3	0,0168	0,2903	Importin-8	IMP8	Zytoplasma, Nukleus	Nuklear Proteinimport
3	0,0161	0,2467	Protein arginine N-methyltransferase 1	PRMT1	Zytoplasma, Nukleus	Histon und Protein Methylierung
3	0,0159	0,3103	Ceroid-lipofuscinosis neuronal protein 6	CLN6	ER	Zelltod, Cholesterollowerholungsprozess
2	0,0159	0,1969	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	COX5A	Mitochondrien	Elektronentransport
3	0,0157	0,3097	Serine/threonine-protein kinase RIO1	RIOK1	unbekannt	unbekannt
3	0,0152	0,2833	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp31	PRPF31	Nukleus	mRNA Prozessierung
3	0,0150	0,3018	Serine/threonine-protein kinase 38	STK38	Zytoplasma, Nukleus	Proteinphosphorylierung, Signaltransduktion und weitere
2	0,0150	0,1113	GTP-binding nuclear protein Ran	RAN	Zytoplasma, Nukleus	Mitose, nukleärer Proteinexport und weitere
3	0,0145	0,3080	Methylome subunit p1Cln	Clc1	Zytoplasma, Nukleus	Genexpression
3	0,0143	0,2546	Elongation factor 1-delta	EF-1-delta	Nukleus	Proteinsynthese, Transkription
1	0,0143	0,1576	Kinesin-like protein KIF2C	KIF2C	Zytoplasma, Nukleus	Mitose
1	0,0142	0,3784	Zona pellucida sperm-binding protein 2	Zp-2	Zellmembran, ECM	Fertilisierung
3	0,0139	0,3065	Pre-mRNA branch site protein p14	SF3B14a	Nukleus	mRNA Prozessierung
3	0,0139	0,2663	Elongation factor 1-beta	EF-1-beta	Zytoplasma	Translation
3	0,0137	0,3023	Eukaryotic translation initiation factor 4B	eIF-4B	Zytoplasma	Translation
1	0,0135	0,0164	Probable cytosolic iron-sulfur protein assembly protein CIAO1	CIAO1	Zytoplasma	Zellteilung
2	0,0125	0,0726	Importin-5	Imp5	Zytoplasma, Nukleus	Nukleärer Proteinimport und weitere
3	0,0124	0,3072	Methylome protein 50	MEP-50	Zytoplasma, Nukleus	Genexpression, Zellproliferation
1	0,0124	0,2939	Glycoprotein endo-alpha-1,2-mannosidase	hENDO	Golgi	Proteinmodifikationen
1	0,0124	0,0168	Vesicle-associated membrane protein 2	VAMP-2	Zytoplasmatische Vesikel, Zellverbindungen	Transport, Sekretion synaptischer Vesikel

**Tab. 9 Auswertung des LIMP-2 HEK-Screens von Stefanie Jäger (University of California-San Francisco).** Potentielle Interaktionspartner sind mittels comPASS und MiST Score sortiert. Proteine, die in allen drei unabhängigen Analysen detektiert wurden, sind in der ersten Spalte rot unterlegt. Proteine, die im Endoplasmatischen Retikulum (ER) oder in Endosomen, endosomalen Vesikeln oder Lysosomen lokalisiert sind, sind rötlich hervorgehoben in Spalte 6. Untersuchte Proteine sind grün markiert.

## 6.2.1 PRAF2 und LIMP-2: Mögliche Interaktionspartner in neuronalen Zellen

### 6.2.1.1 PRAF2 ist ein 19 kDa großes Membranprotein

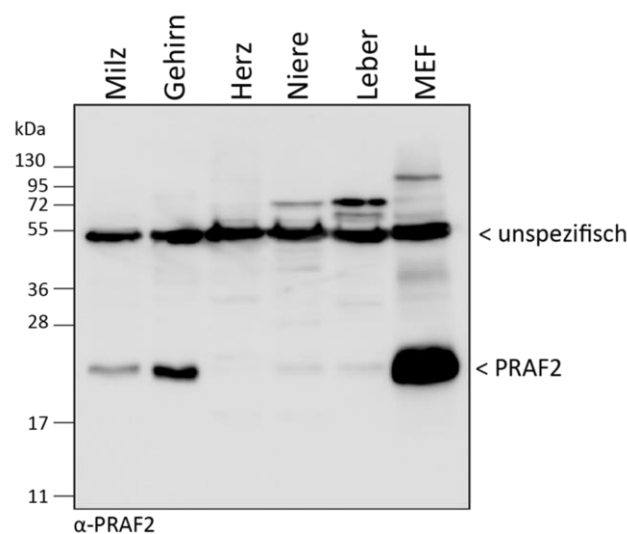
Das *PRA 1 domain family member 2* (PRAF2)-Protein konnte im HEK-Screen mit hoher Wahrscheinlichkeit als Interaktionspartner von LIMP-2 identifiziert werden (6.2). Über das Protein selbst und auch seine Funktion gibt es lediglich initiale Untersuchungen (Schweneker et al. 2005; Fo et al. 2006; Geerts et al. 2007; Borsics et al. 2010), dabei wurde gezeigt, dass es sich bei PRAF2 um ein 19 kDa großes Membranprotein handelt, das dimerisiert. Die Überexpression eines HA-getaggten PRAF2 Proteins in dieser Arbeit führte zu einer spezifischen Bande bei ungefähr 20-22 kDa (Abb.25A). Des Weiteren konnte mittels Membranpräparation bestätigt werden, dass es sich bei PRAF2 um ein Membranprotein handelt, da es in der Membranfraktion zusammen mit LIMP-2 anreichte und nicht in der löslichen Fraktion zu finden war (Abb.25B).



**Abb. 25 PRAF2 Überexpression und Membranlokalisation.** A) HEK-Zellen wurden mit dem PRAF2-HA Konstrukt 48h vor der Zellernte transfiziert. Die Zellysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert und gegen HA gefärbt. PRAF2-HA kann als einzelne Bande von circa 20-22 kDa detektiert werden. B) HEK Zellen wurden mit PRAF2-HA und LIMP-2-myc transfiziert. Nach der Zellernte wurde eine Membranpräparation durchgeführt und das Totallysat und die lösliche sowie die Membranfraktion mittels SDS-PAGE und Western Blotting analysiert. PRAF2 und LIMP-2 wurde mittels HA bzw. myc-Antikörpers sichtbar gemacht. SP1 (*specificity protein 1*), als zytosolischer Transkriptionsfaktor, diente als Markerprotein der löslichen Fraktion. PRAF2 kann wie LIMP-2 lediglich in der Membranfraktion detektiert werden.



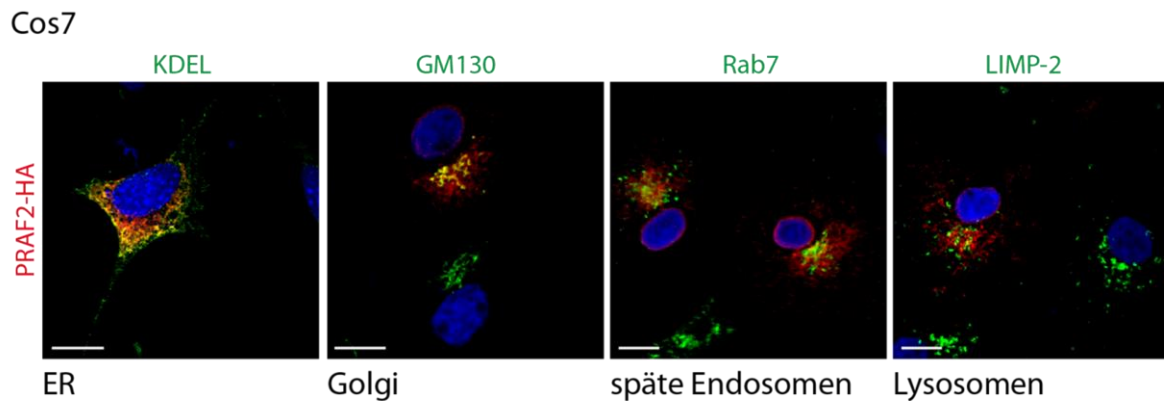
Zur Untersuchung des endogenen PRAF2 wurde der Antikörper von Abcam (Anti-JM4 antibody (ab53113)) benutzt. Dieser zeigte in verschiedenen murinen Organlysaten und in murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) eine spezifische Bande bei circa 22kDa und eine vermutlich unspezifische Bande bei circa 55kDa, da diese Form nicht nach Überexpression zu detektieren war und sich auch unabhängig von der Menge des Monomers verhielt (Abb. 26). Bei der Analyse zeigte sich, dass PRAF2 eine hohe Expression in MEFs und in Hirnlysaten aufweist. Eine geringe Menge konnte in der Milz detektiert werden, wobei in Nieren und der Leber nur ein sehr geringer PRAF2 Proteinanteil gezeigt werden konnte. Im Herzen ist PRAF2 nicht zu detektieren.



**Abb. 26 Endogene PRAF2 Expression in MEF-Zellen und murinen Organlysaten.** Gleiche Mengen muriner Organlysate von Milz, Gehirn, Herz, Niere und Leber wurden zusammen mit murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) mittels SDS-PAGE und Western Blotting analysiert. PRAF2 wurde mittels endogenen Antikörpers sichtbar gemacht. PRAF2 kann als einzelne Bande detektiert werden. Die Bande bei 55kDa wurde als unspezifisch eingestuft.

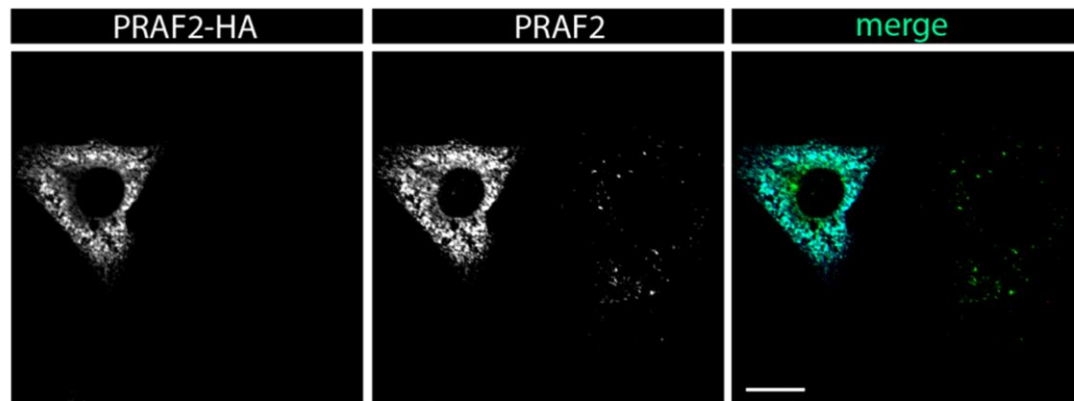
### 6.2.1.3 PRAF2 ist im endoplasmatischen Retikulum und in nicht näher zu definierenden vesikulären Strukturen lokalisiert

Des Weiteren wurde die subzelluläre Lokalisation von PRAF2 untersucht. Zunächst wurde das HA-getaggte PRAF2-Protein in Cos7-Zellen überexprimiert und die Lokalisation durch Markerproteine verifiziert. Hierbei zeigte sich, dass überexprimiertes PRAF2 hauptsächlich im Endoplasmatischen Retikulum (ER) mit dem Markerprotein KDEL (Munro und Pelham 1987) kolokalisiert. Zusätzlich kann ein Teil des Proteins in Golgi-Apparatus lokalisiert werden (Markerprotein GM130 (Nakamura et al. 1995)). Das Protein war nicht in späten Endosomen (Markerprotein Rab7 (Soldati et al. 1995)) oder Lysosomen (Markerprotein LIMP-2) zu detektieren (Abb. 27).



**Abb. 27 Subzelluläre Lokalisation von PRAF2-HA in Cos7-Zellen.** Cos7-Zellen wurden mit PRAF2-HA transfiziert. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurde mittels HA-Antikörpers gegen PRAF2 gefärbt und entsprechende Markerproteine kogefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 10µm. PRAF2 kolokalisiert mit dem ER und teilweise mit dem Golgi Marker GM130.

Bei der Detektion von endogenem PRAF2 zeigte sich eine komplette Kolo­kalisierung der Antikörperfärbung mit überexprimiertem PRAF2, was die Spezifität des Antikörpers unterstützt. Bei endogenem PRAF2 konnten hingegen hauptsächlich punktuelle Strukturen innerhalb des Zytoplasmas detektiert werden (Abb. 28). Dies war allerdings bereits in anderen Publikationen beschrieben worden (Geerts et al. 2007; Borsics et al. 2010) und deutete ebenfalls auf eine Spezifität des Antikörpers hin.

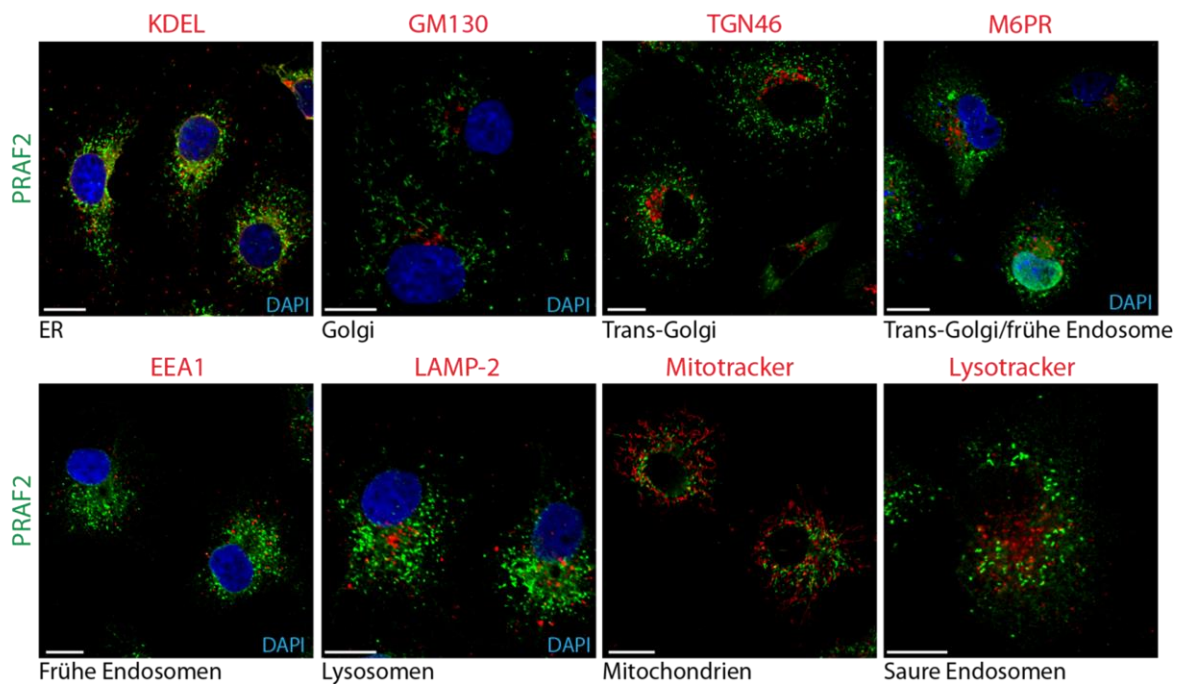


Cos7

**Abb. 28 Kontrolle des PRAF2 Antikörpers in der Immunfluoreszenz.** Cos7-Zellen wurden mit PRAF2-HA transfiziert und nach 48h wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Transfiziertes PRAF2 wurde mittels HA-Antikörpers detektiert. Zusätzlich wurde gegen endogenes PRAF2 gefärbt. Der endogene Antikörper detektiert überexprimiertes PRAF2 als auch punktuelle Strukturen in untransfizierten Zellen. Der Maßstabsbalken entspricht 10µm.

Zur weiteren Charakterisierung dieser Strukturen wurden verschiedene Markerproteine kofärbt (Abb. 29). Dabei zeigte sich eine partielle Kolo­kalisierung mit dem ER Marker KDEL. Alle weiteren getesteten Markerproteine zeigten keine Kolo­kalisierung mit den vesikulären PRAF2 Strukturen, sodass es sich nicht um Strukturen des Golgi-Apparatus (GM130), des Trans-Golgi-Netzwerk (TGN46 (Prescott et al. 1997)), des Mannose-6-Phosphat-abhängigen Transportweges (Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (Ghosh et al. 2003)), früher Endosomen (EEA1 (Mu et al. 1995)) oder Lysosomen (LAMP-2) handelte. Auch war keine Kolo­kalisierung mit chemischen Substanzen, die gezielt Mitochondrien (Mitotracker (Poot et al. 1997)) oder saure Kompartimente (Lysotracker (Price et al. 2003)) anfärben zu sehen. Aufgrund dessen konnten bisher die PRAF2 positiven vesikulären Strukturen nicht näher definiert werden.

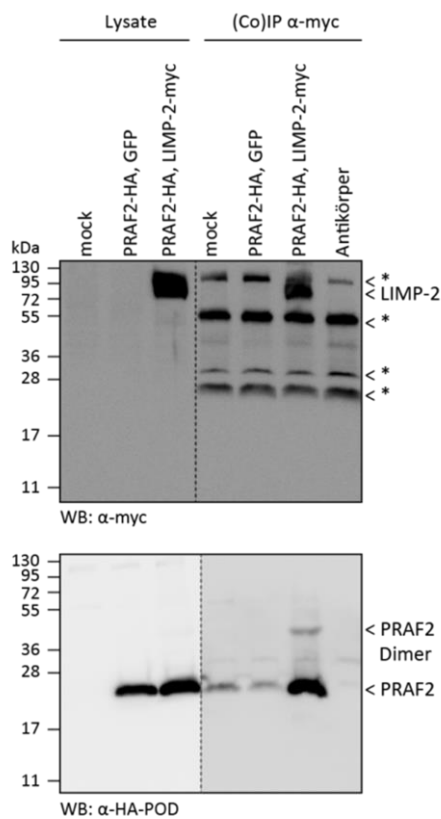
Cos7



**Abb. 29 Kolo­kalisierungstudie von endogenem PRAF2 in Cos7-Zellen.** Cos7-Zellen wurden gegen endogenes PRAF2 und entsprechende Markerproteine/Markerorganellen gefärbt und mikroskopisch untersucht. Der Maßstabsbalken entspricht 10µm. Endogenes PRAF2 kolo­kalisiert lediglich teilweise mit dem Markerprotein für das ER.

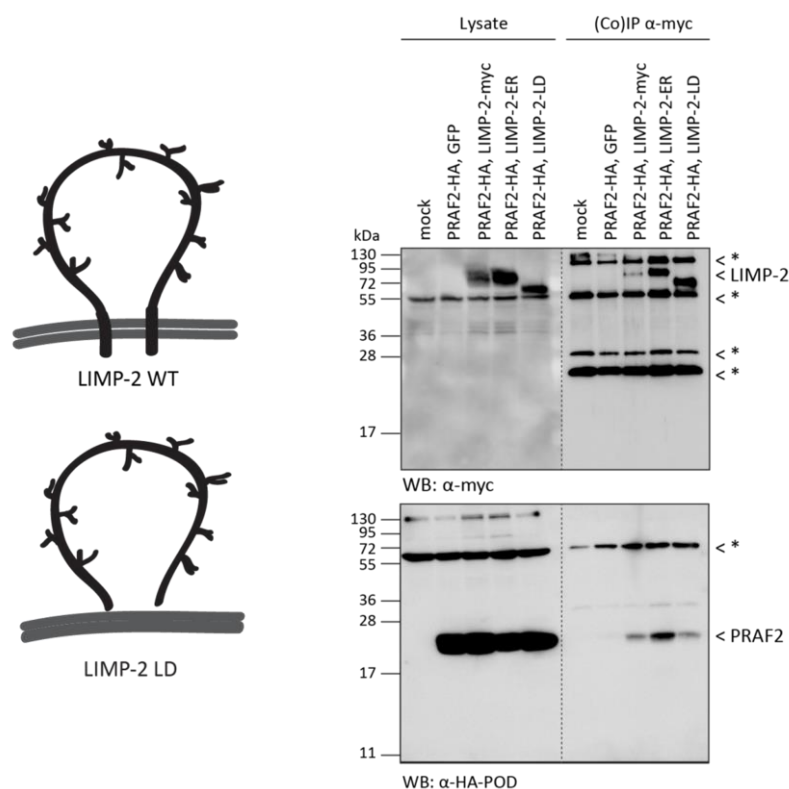
### 6.2.1.4 LIMP-2 und PRAF2 können in neuronalen Zellen miteinander präzipitiert werden

Die potenzielle Interaktion von PRAF2 und LIMP-2 wurde nun näher untersucht und Koimmunpräzitationsexperimente durchgeführt. Dabei konnten die beiden Proteine in murinen neuronalen Zellen (N2a) miteinander präzipitiert werden (Abb. 30).



**Abb. 30 Koimmunpräzitation von LIMP-2 und PRAF2 in N2a-Zellen.** N2a-Zellen wurden mit PRAF2-HA und LIMP-2-myc transfiziert. Die Koimmunpräzitation wurde mittels myc-Antikörpers durchgeführt. PRAF2-HA konnte mit LIMP-2-myc kopräzipitiert werden.

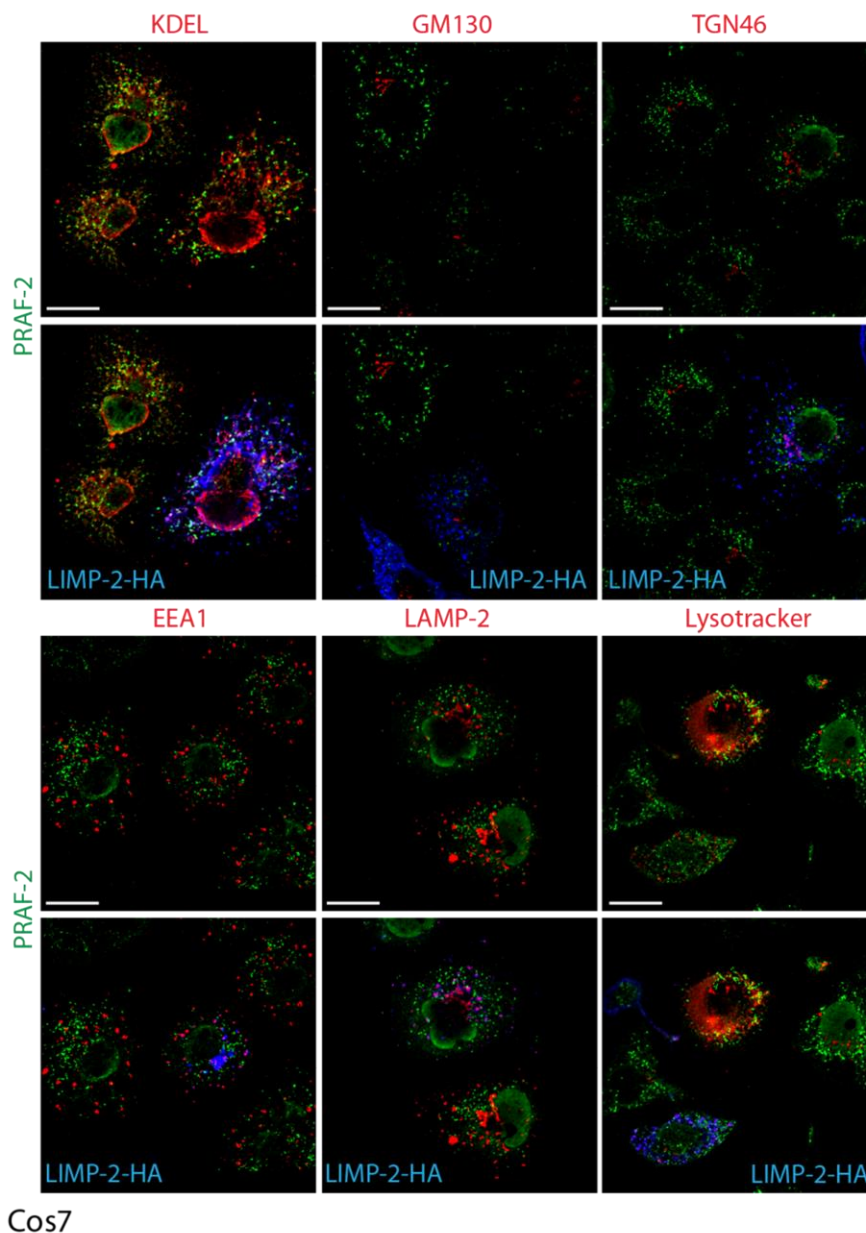
Zusätzlich wurde untersucht, ob die beiden Proteine über die Transmembrandomänen von LIMP-2 interagieren. Hierzu wurden eine LIMP-2-Mutante, der die Transmembrandomänen fehlten, exprimiert und eine Koimmunpräzipitation durchgeführt. Es war möglich PRAF2-HA mit der Mutante zu kopräzipitieren, sodass gezeigt werden konnte, dass die beiden Proteine nicht über die Transmembrandomänen von LIMP-2 interagieren (Abb. 31). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass PRAF2 auch mit einer LIMP-2-Mutante (LIMP-2 ER) interagiert, die im ER lokalisiert ist (Abb. 31). Dies zeigt, dass eine mögliche Interaktion der beiden Proteine bereits im ER stattfindet.



**Abb. 31 Koimmunpräzipitation von LIMP-2 Mutanten und PRAF2 in N2a-Zellen.** Schematische Zeichnung von LIMP-2 Wildtyp (WT) und der LIMP-2-LD Mutante. LIMP-2-LD bezeichnet die luminal Domäne von LIMP-2. N2a-Zellen wurden mit den entsprechenden LIMP-2-Mutanten und PRAF2-HA transfiziert. LIMP-2-ER stellt eine ER-Retentionsmutante von LIMP-2 dar. Die Koimmunpräzipitation wurde mittels myc-Antikörpers durchgeführt. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blotting analysiert und die Proteine mit myc bzw. HA-POD Antikörper sichtbar gemacht. \* markiert Antikörper-Banden. PRAF2 kann mit den getesteten LIMP-2 Mutanten kopräzipitiert werden.

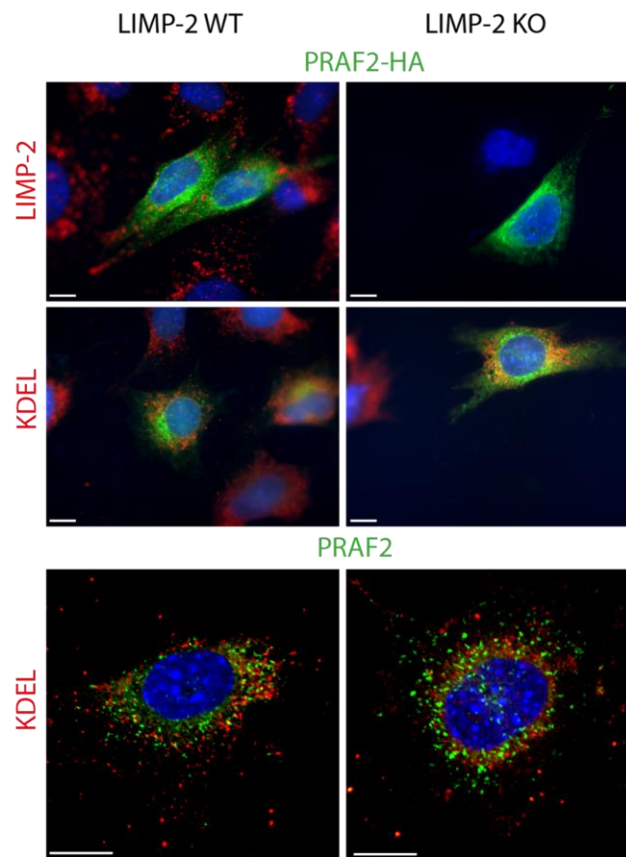
### 6.2.1.5 LIMP-2 zeigt keinen offensichtlichen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von PRAF2

Nachdem eine Interaktion von LIMP-2 und PRAF2 nach der Überexpression beider Proteine nachgewiesen werden konnte, wurde untersucht, ob LIMP-2 einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von PRAF2 besitzt. Hierbei wurde die Lokalisation von endogenem PRAF2 nach Überexpression von LIMP-2 untersucht und die Zellen gegen die bereits oben erwähnten Markerproteine kogefärbt. Hierbei zeigte sich, dass PRAF2 unabhängig von einer LIMP-2 Überexpression eine vergleichbare Lokalisation aufweist (Abb. 32).



**Abb. 32 Subzelluläre Lokalisation von PRAF2 in Abhängigkeit von LIMP-2-Überexpression in Cos7-Zellen.** Cos7-Zellen wurden mit LIMP-2-HA transfiziert und gegen HA, endogenes PRAF2 und entsprechende Markerproteine gefärbt und mikroskopisch analysiert. Der Maßstabsbalken entspricht 10µm. LIMP-2-Überexpression verändert die subzelluläre Lokalisation von PRAF2 nicht.

Des Weiteren wurde in LIMP-2-defizienten MEF Zellen die Lokalisation von überexprimiertem PRAF2-HA und endogenem PRAF2 untersucht. Hierbei zeigte sich, dass auch der Verlust von LIMP-2 keinen offensichtlichen Effekt auf die Lokalisation von PRAF2 besitzt (Abb. 33).

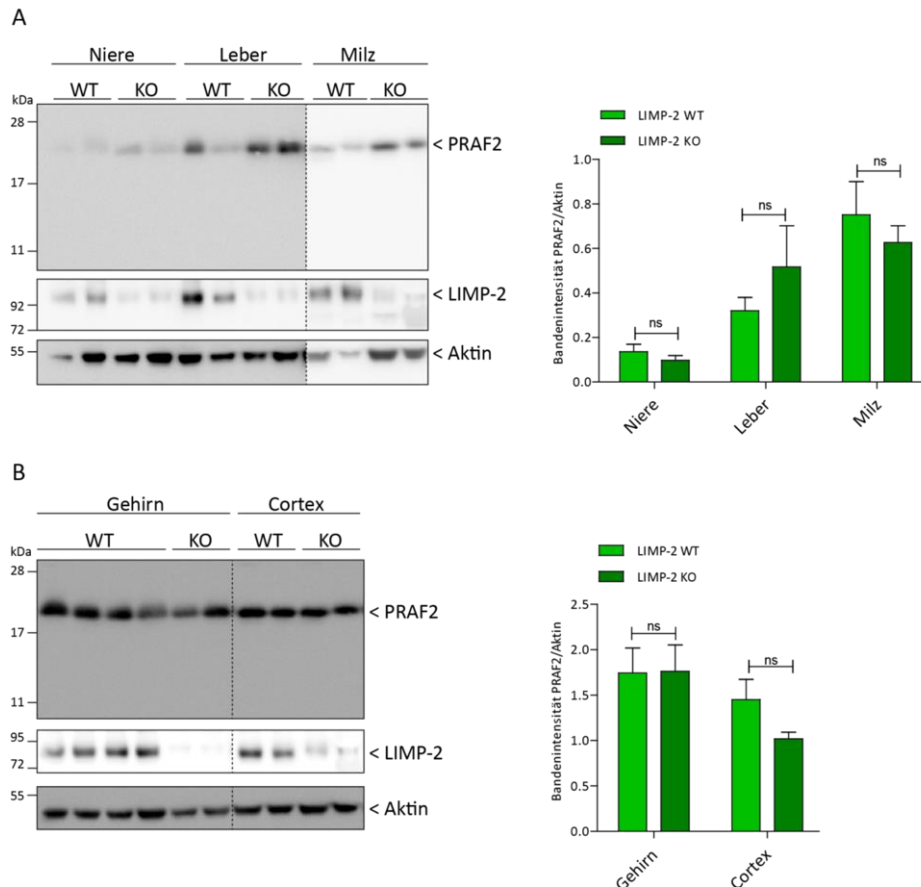


**Abb. 33 Subzelluläre Lokalisation von PRAF2 in LIMP-2 WT- und KO-MEFs.** LIMP-2 Wildtyp (WT) und defiziente (KO) murine embryonale Fibroblasten (MEF) wurden mit PRAF2-HA transfiziert. Die Zellen wurden gegen HA bzw. endogenes PRAF2, LIMP-2 und den ER Marker KDEL gefärbt und mikroskopisch analysiert. Der Maßstabsbalken entspricht 10 $\mu$ m. Sowohl überexprimiertes als auch endogenes PRAF2 zeigt eine vergleichbare Lokalisation in LIMP-2 WT und KO MEFs.



### 6.2.1.6 LIMP-2 hat keinen Einfluss auf die Proteinmenge von PRAF2 *in vivo*

Des Weiteren wurde das Proteinlevel von PRAF2 in verschiedenen Geweben (Milz, Leber, Niere, Gehirn, Cortex) von Wildtyp (WT) und LIMP-2-defizienten (KO) Mäusen mittels Western Blot untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Expression von PRAF2 zwischen den Geweben zwar variiert, die Defizienz von LIMP-2 aber keinen signifikanten Einfluss auf die Proteinmenge von PRAF2 hat, da in WT und KO Geweben gleiche Mengen an PRAF2 identifiziert werden konnten (Abb. 34).

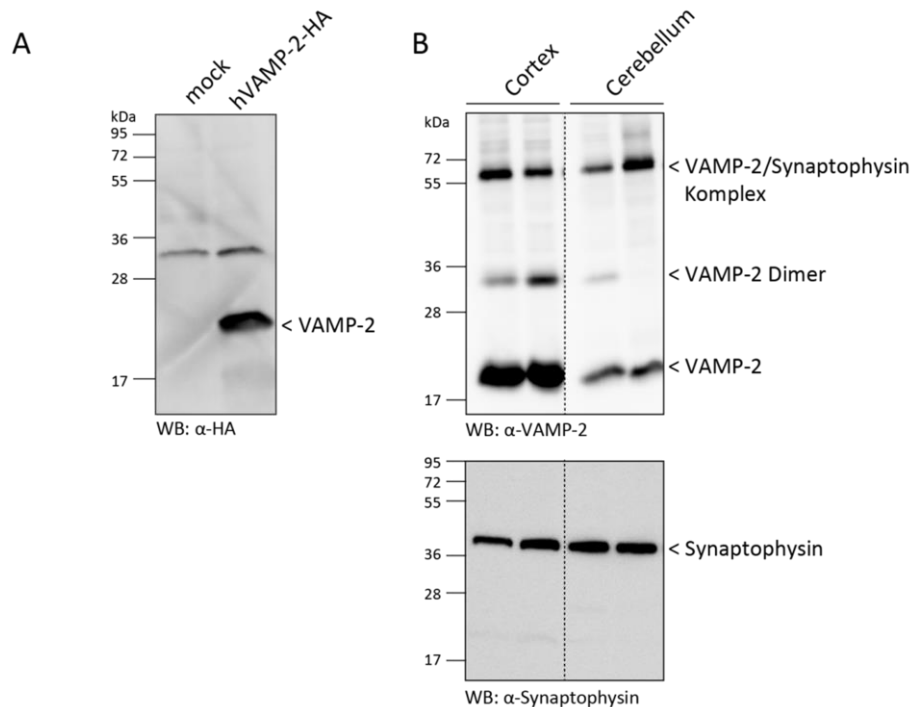


**Abb. 34 Proteinmenge von PRAF2 in murinen LIMP-2 WT und KO Geweben.** Murine Gewebelysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blotting analysiert und spezifisch gegen LIMP-2 bzw. PRAF2 gefärbt. Der LIMP-2 Antikörper zeigte eine leichte unspezifische Färbung in den LIMP-2-defizienten Geweben. Aktin diente als Ladekontrolle. Die Menge an PRAF2 wurde auf Aktin normiert. Anschließend wurden die Werte dieser und weiterer Immunoblots mittels GraphPad Prism Software und ANOVA mit anschließendem Tukey's post hoc ausgewertet. N= 3-5. Fehlerbalken werden als  $\pm$ SEM angegeben, ns = nicht signifikant. Es zeigte sich keine signifikante Veränderung des PRAF2 Proteinlevels zwischen LIMP-2 Wildtyp (WT) und defizienten (KO) Geweben.

## 6.2.2 Validierung von VAMP-2 als potenzieller Interaktionspartner von LIMP-2

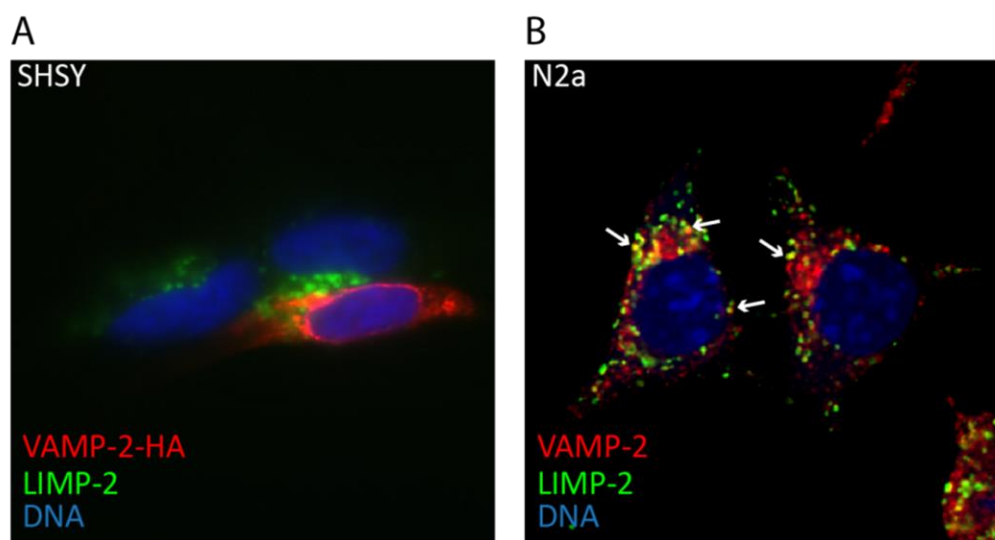
### 6.2.2.1 LIMP-2 und VAMP-2 interagieren über die Transmembrandomänen von LIMP-2

Zur Detektion von VAMP-2 wurde zunächst ein humanes VAMP-2-HA Konstrukt hergestellt. Hierbei zeigte sich VAMP-2 als einzelne Bande bei circa 20-22kDa (Abb. 35A). Endogen war VAMP-2 in murinen Gehirnllysaten bei circa 20kDa zu detektieren (Abb. 35B). Zusätzlich zeigte sich teilweise eine weitere Bande bei circa 35 kDa, die dem Dimer von VAMP-2 zugeordnet wurde. Des Weiteren war eine dritte Bande bei 56kDa zu erkennen. Diese wurde bereits als Synaptophysin/VAMP-2 Komplex beschrieben (Becher et al. 1999), wobei Färbungen gegen Synaptophysin zwar das Monomer detektieren konnten, aber keine vergleichbare Bande bei 56kDa zeigten.



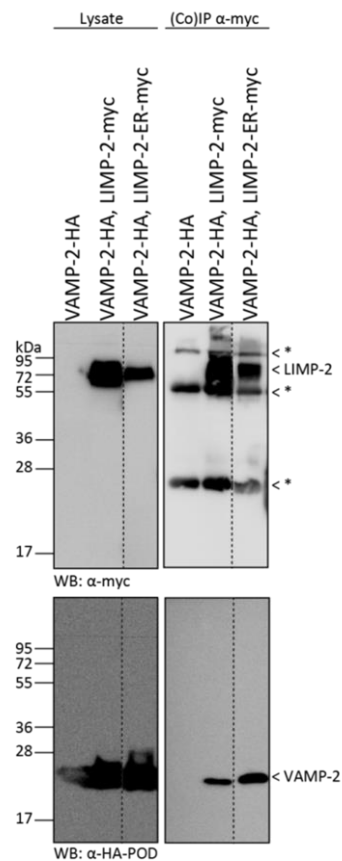
**Abb. 35 Analyse von VAMP-2 mittels Western Blots.** A) HEK-Zellen wurden mit dem humanen VAMP-2-HA Konstrukt transfiziert und die Expression mittels Immunoblot analysiert. Das Protein ist als einzelne Bande bei circa 20-22kDa zu detektieren. B) Murine Cortex- und Cerebellumlysate wurde mittels SDS-PAGE und Western Blotting auf die Expression von endogenem VAMP-2 untersucht. Das VAMP-2-Monomer wird bei circa 19 kDa und das Dimer bei circa 35 kDa detektiert. Ein bereits beschriebener VAMP-2/Synaptophysin Komplex ist bei 56 kDa zu detektieren, wobei eine Färbung gegen Synaptophysin diese Bande nicht zeigte.

Zur Untersuchungen der subzellulären Lokalisation von VAMP-2 wurden humane neuronale Zellen (SHSY) mit dem VAMP-2-HA-Konstrukt transfiziert und mikroskopisch analysiert. Die Überexpression von VAMP-2 zeigte eine perinukleäre Färbung, wobei keine Kolokalisation mit LIMP-2 zu detektieren war (Abb. 36A). Endogenes VAMP-2 lediglich in N2a-Zellen zu detektieren, wobei sich auch hier nur in vereinzelt Zellen eine Kolokalisation mit LIMP-2 zeigte (Abb. 36B). Da der VAMP-2-Antikörper kein spezifisches Signal in murinen Geweben oder embryonalen Fibroblasten aufwies, war es nicht möglich die Lokalisation in Gewebeschnitten zu verifizieren oder LIMP-2 WT und KO Gewebe/ Zellen zu vergleichen.



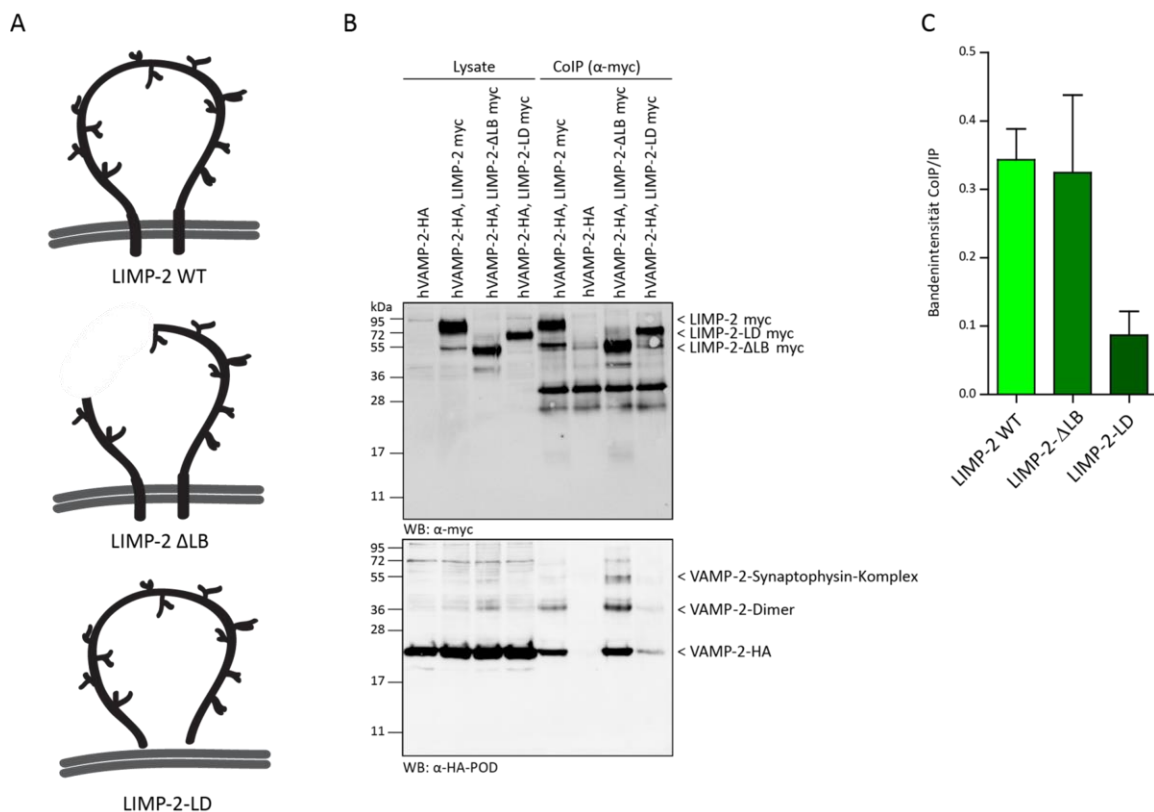
**Abb. 36 Subzelluläre Kolokalisation von VAMP-2 und LIMP-2 in neuronalen Zelllinien.** A) VAMP-2 HA wurde in humanen SHSY Zellen exprimiert und mittels Fluoreszenzfärbung sichtbar gemacht und mikroskopisch analysiert. Eine Kolokalisation mit LIMP-2 war nicht zu detektieren. B) Endogenes VAMP-2 konnte mit einem Antikörper gegen murines VAMP-2 in N2a Zellen mittels immunologischer Färbung sichtbar gemacht werden. Endogenes VAMP-2 kolokalisierte nur vereinzelt in punktuellen Vesikeln (Pfeile) mit LIMP-2.

Um die Interaktion von VAMP-2 und LIMP-2 zu verifizieren, wurde eine Koimmunpräzipitation der beiden Protein nach Überexpression durchgeführt. Hierbei konnte VAMP-2 mit LIMP-2 kopräzipitiert und die Interaktion bestätigt werden (Abb. 37). Zusätzlich wurde untersucht, ob diese Interaktion bereits im ER stattfindet. Eine LIMP-2-Mutante, die das ER nicht verlässt (LIMP-2 ER), war ebenfalls in der Lage VAMP-2 zu präzipitieren, was eine Interaktion der Proteine bereits im ER nahelegte (Abb. 37).



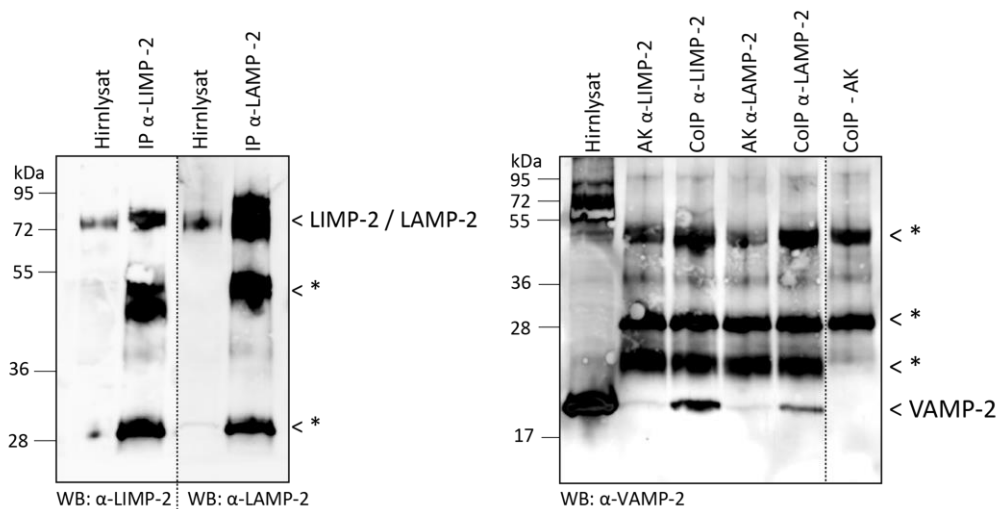
**Abb. 37 Koimmunpräzipitation von LIMP-2 und VAMP-2 in Cos7-Zellen.** VAMP-2-HA und myc-getaggtetes Wildtyp LIMP-2 oder eine ER-Retentionsmutante wurden in Cos7-Zellen exprimiert und eine Koimmunpräzipitation mittels myc-Antikörpers durchgeführt und durch SDS-PAGE und Western Blotting analysiert. \* markiert unspezifische Antikörper-Banden. VAMP-2 konnte mit Wildtyp LIMP-2 und der ER-Retentionsmutante kopräzipitiert werden.

Des Weiteren wurde untersucht, an welcher Stelle im Protein LIMP-2 mit VAMP-2 interagiert. Hierfür wurden zwei Mutanten für die Koimmunpräzipitation überexprimiert, denen entweder die Transmembrandomänen (LIMP-2-LD) oder die Ligandenbinderegion (LIMP-2 $\Delta$ LB) fehlten. Hierbei zeigte sich, dass die Ligandenbinderegion nicht verantwortlich für die Bindung an VAMP-2 ist, da VAMP-2 erfolgreich präzipitiert werden konnte (Abb. 38). Die Deletion der Transmembrandomänen von LIMP-2 führte allerdings zu einer starken Reduktion der Interaktion von LIMP-2 und VAMP-2, was darauf schließen lässt, dass die Proteine wahrscheinlich über die Transmembrandomänen von LIMP-2 interagieren.



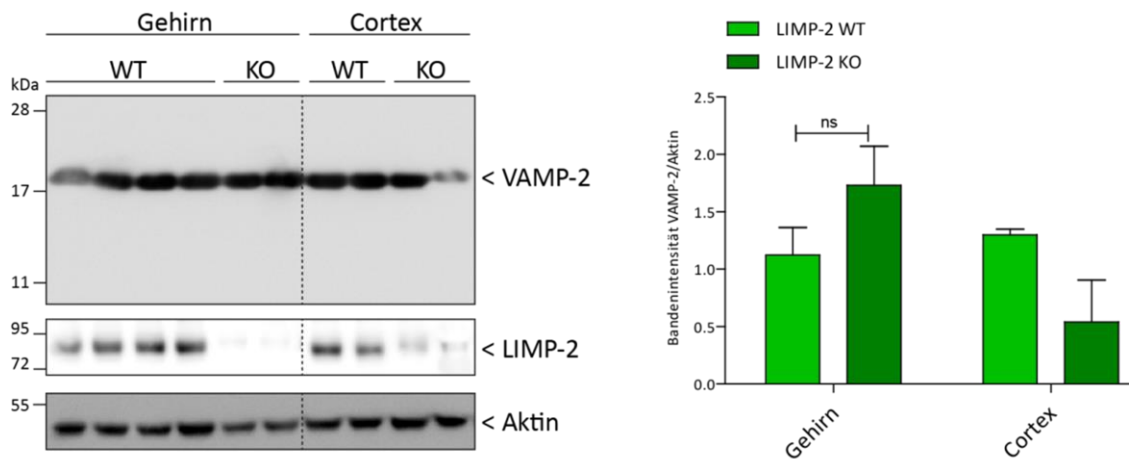
**Abb. 38 Koimmunpräzipitation von LIMP-2-Mutanten und VAMP-2 in Cos7-Zellen.** A) Schematische Zeichnung von LIMP-2 Wildtyp (WT), der LIMP-2-Ligandenbindedomäne ( $\Delta$ LB) Deletionsmutante und der LIMP-2-LD-Mutante. Der LIMP-2- $\Delta$ LB-Mutante fehlt ein großer Bereich der luminalen Domäne, die die Ligandenbinderegion einschließt. LIMP-2-LD bezeichnet die luminalen Domäne von LIMP-2. B) Cos7-Zellen wurden mit VAMP-2-HA und Wildtyp LIMP-2, der LIMP-2  $\Delta$ LB Mutante oder der luminalen Domäne von LIMP-2 (LIMP-2-LD) transfiziert. Die Koimmunpräzipitation wurde mittels myc-Antikörpers durchgeführt. C) Zwei unabhängige Koimmunpräzipitationen wurden wie in B) beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde die Bandenintensität des Koimmunpräzipitats (VAMP-2) auf die Intensität des Präzipitats (LIMP-2) normiert und grafisch dargestellt. Fehlerbalken werden als  $\pm$ SEM angegeben. VAMP-2 kann mit der LIMP-2-Mutante, der die Ligandenbinderegion fehlt, aber kaum mit der luminalen Domäne von LIMP-2 kopräzipitiert werden.

Zusätzlich wurde untersucht, ob die beiden Proteine auch endogen interagieren. Hierfür wurde murines Gehirnlisat verwendet und LIMP-2 oder LAMP-2, als weiteres lysosomales Membranprotein, präzipitiert. Zusätzlich wurde eine Lysat verwendet, dem kein Antikörper aber Dynabeads® hinzugegeben wurden, um unspezifische VAMP-2-Bindungen zu verifizieren. Hierbei zeigte sich zunächst, dass VAMP-2 nicht unspezifisch an die Dynabeads® bindet. Des Weiteren war es möglich VAMP-2 mit LIMP-2 auf endogenem Niveau zu kopräzipitieren (Abb. 39). Allerdings konnte dies auch zu einem geringeren Maße für LAMP-2 gezeigt werden.



**Abb. 39 Endogene Koimmunpräzipitation von LIMP-2/LAMP-2 und VAMP-2 aus Gehirnlisaten.** Gehirnlisate wurden mit dem LIMP-2 bzw. dem LAMP-2 Antikörper versetzt und eine Koimmunpräzipitation durchgeführt und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. \* markiert unspezifische Antikörper- oder Dynabeads®-Banden. VAMP-2 kann endogen mit LIMP-2 und in einem geringeren Maße auch mit LAMP-2 kopräzipitiert werden. VAMP-2 zeigt keine unspezifische Bindung an die Beads.

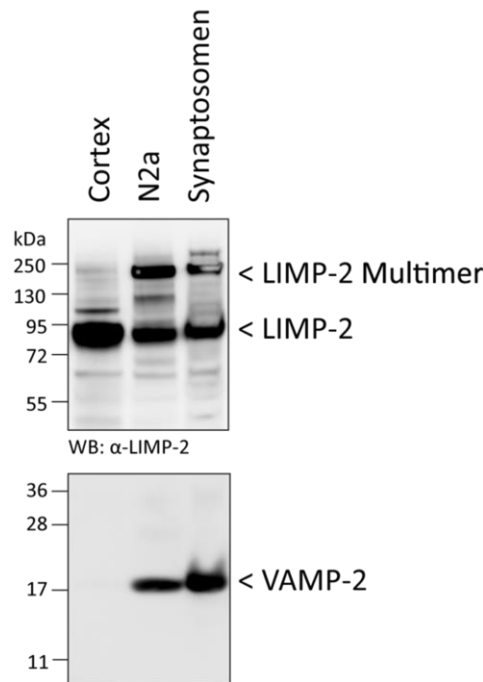
Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass LIMP-2 und VAMP-2 miteinander interagieren, sollte untersucht werden, ob LIMP-2 einen Einfluss auf die Proteinmenge von VAMP-2 besitzt. Hierfür wurden Gehirn- und Cortexlysate von Wildtyp (WT) und LIMP-2 defizienten (KO) Mäusen mittels Western Blot untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Expression des VAMP-2-Monomers unabhängig von LIMP-2 ist, da kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und LIMP-2-defizienten Geweben nachgewiesen werden konnte (Abb. 40).



**Abb. 40 VAMP2-Expression in murinen LIMP-2 WT und KO Gehirngeweben.** Organlysate aus Gesamtgehirn oder nur Cortex von Wildtyp (WT) oder LIMP-2 defizienten (KO) Mäusen wurden mittels SDS-PAGE und Western Blotting aufgetrennt und spezifisch gegen LIMP-2 oder VAMP-2 gefärbt. Der LIMP-2 Antikörper zeigte eine leichte unspezifische Bande in den KO Geweben. Die Bandenintensität von VAMP-2 wurde auf Aktin normiert und mittels GraphPad Prism Software und ANOVA mit anschließendem Tukey's post hoc ausgewertet. N=2-5. Fehlerbalken werden als  $\pm$ SEM angegeben. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Proteinmenge von VAMP-2 in LIMP-2 WT oder KO Gehirnen.

### 6.2.2.2 LIMP-2 ist an der Synapse zu detektieren und hat einen möglichen Einfluss auf die Dichte der synaptischen Vesikel

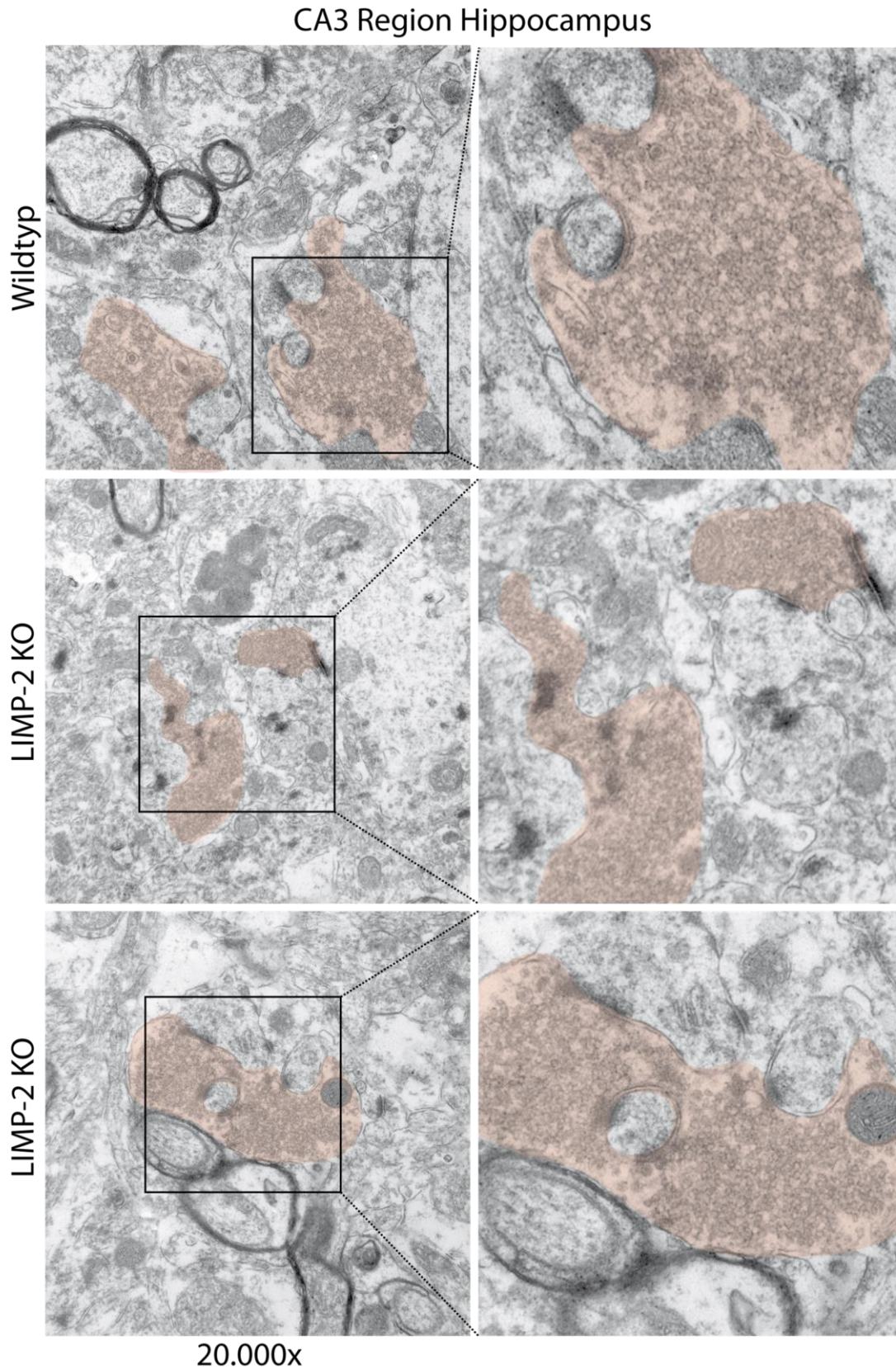
Da es sich bei VAMP-2 um ein SNARE-Protein an der neuronalen Synapse handelt, sollte untersucht werden, ob sich auch LIMP-2 in dieser Region detektieren lässt. Hierfür wurden Synaptosomen (angereicherte neuronale Synapsen) mittels Western Blot untersucht (Synaptosomen wurden von Matthias Kneussel, *ZMNH Hamburg* zur Verfügung gestellt). Hierbei zeigte sich, dass LIMP-2 in Synaptosomen zu detektieren ist.



**Abb. 41 LIMP-2 Detektion in Synaptosomen.** Synaptosomen wurden von Matthias Kneussel, *ZMNH Hamburg* zur Verfügung gestellt. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE und Western Blotting analysiert. Die Membran wurde spezifisch gegen LIMP-2 und VAMP-2 gefärbt.

Des Weiteren wurden die Synapsen des Cerebellums, die sogenannten Moosfasern, mittels Elektronenmikroskopie untersucht (Aufnahmen wurden durchgeführt von Michaela Schweizer, *ZMNH Hamburg*). Initiale Untersuchungen konnten zeigen, dass die synaptischen Vesikel in den Synapsen des Cerebellums in den LIMP-2-defizienten Mäusen dichter gepackt zu sein scheinen im Vergleich zu Wildtyp-Synapsen (Abb. 42).





**Abb. 42 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Moosfaser-Synapsen von Wildtyp und LIMP-2-defizienten Mäusegehirnen.** Die Aufnahmen wurden in der CA3 Region des Hippocampus gemacht. Moosfaser-Synapsen sind rot runterlegt. Synaptische Vesikel sind innerhalb der Synapsen als runde Strukturen zu detektieren. Aufnahmen wurden von Michaela Schweizer (ZMNH, Hamburg) angefertigt.

### 6.3 LIMP-2 und der Prorenin Rezeptor: Putative Interaktionspartner im Wnt-Signalweg

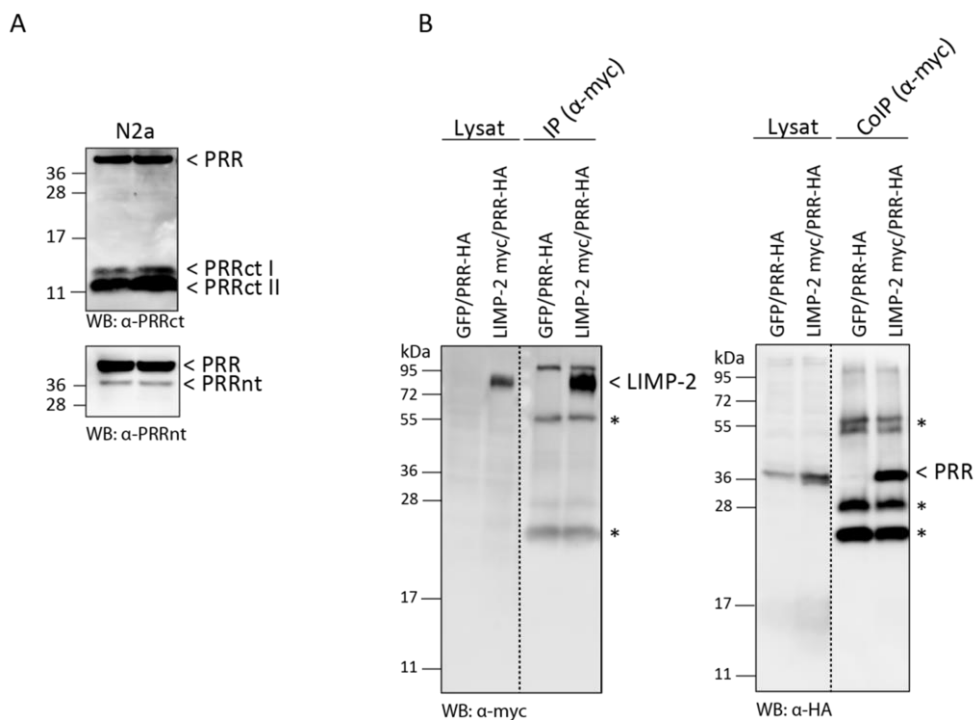
Zur Identifizierung neuer Interaktionspartner von LIMP-2 wurde bereits in einer früheren Studie ein Yeast-Two-Hybrid-Split-Ubiquitin Screen mit LIMP-2 als *bait* Protein durchgeführt (Oelbe 2012). Hierbei konnte der Prorenin Rezeptor (PRR, auch ATP6AP2) als möglicher Interaktionspartner identifiziert werden.

In dieser Arbeit wurden weiterführende Studien zur Interaktion von LIMP-2 und dem PRR insbesondere in Bezug auf den Wnt-Signalweg, in dem der PRR als Teil der H<sup>+</sup>-ATPase eine bedeutende Rolle spielt, durchgeführt (Cruciat et al. 2010).

#### 6.3.1 Untersuchungen zum Einfluss von LIMP-2 auf den PRR

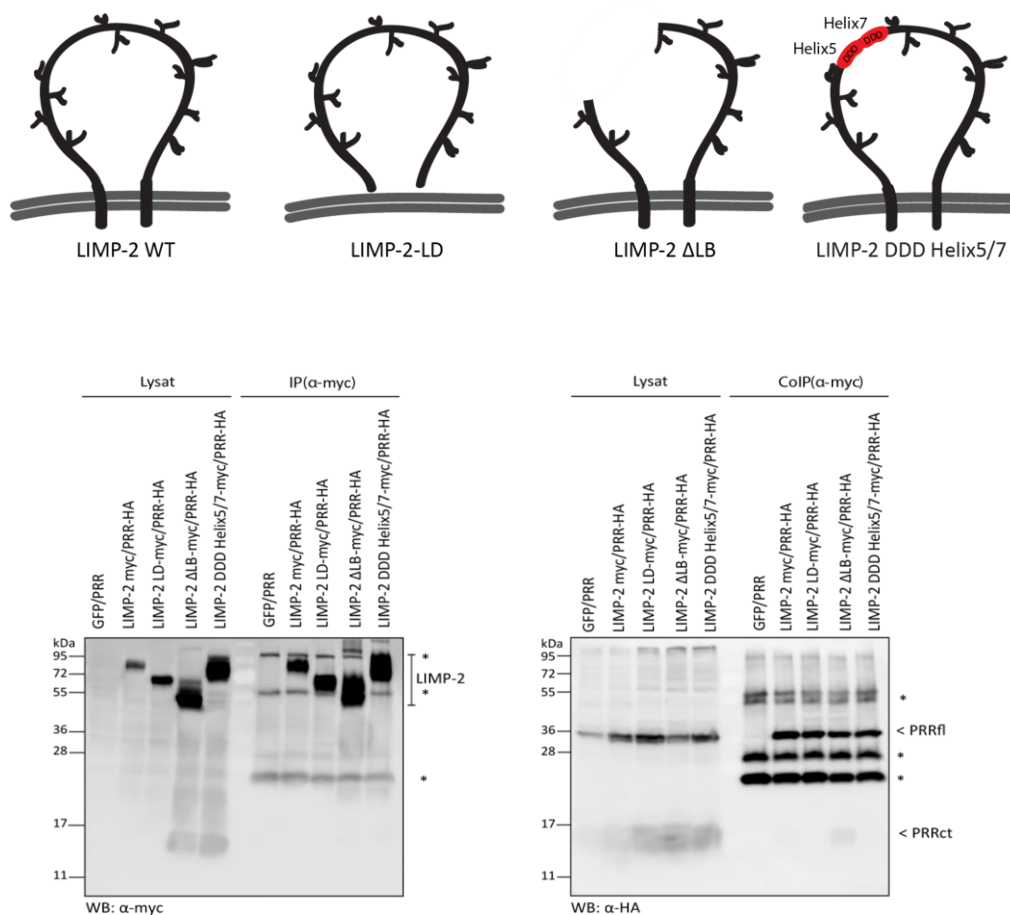
##### 6.3.1.1 Der Prorenin Rezeptor kann in Überexpression mit LIMP-2 präzipitiert werden

Der PRR kann endogen mittels Western Blot in neuronalen Zellen (N2a) detektiert werden. Dabei zeigt sich der Rezeptor bei circa 38kDa. Ein N-terminales Fragment ist bei circa 36kDa zu detektieren. Zusätzlich zeigen sich zwei C-terminale Fragmente bei circa 12kDa (Abb. 43A). In dieser Arbeit war es außerdem möglich LIMP-2 und den PRR in Überexpression zu kopräzipitieren (Abb. 43B).



**Abb. 43 Koimmunpräzipitation von LIMP-2 und dem PRR.** A) Lysate von murinen Neuroblastoma Zellen (N2a) wurden mittels SDS-PAGE und Western Blotting analysiert. LIMP-2 wurde mittels endogenem Antikörper und der PRR mit dem C- bzw. N-terminalem Antikörper detektiert B) Cos7-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und eine Koimmunpräzipitation durchgeführt. Die Lysate wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blotting analysiert und gegen myc oder HA gefärbt. \* kennzeichnet unspezifische Antikörperbanden.

Des Weiteren sollte die mögliche Interaktionsstelle in LIMP-2, die in Überexpression mit dem PRR interagiert, verifiziert werden. Wie bereits erwähnt, stellen die Helix 5 und die Helix 7 in LIMP-2 wichtige Positionen für die Interaktion mit Liganden dar (Neculai et al. 2013). Aufgrunddessen wurden zwei Mutanten von LIMP-2, denen entweder ein größerer Teil inklusive beider Helices fehlt (LIMP-2  $\Delta$ LB) oder in denen Austauschmutationen in beide helikalen Strukturen eingebracht wurden (LIMP-2 DDD H5/7), hinsichtlich ihrer Bindung zum PRR untersucht. In einer Koimmunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass beide LIMP-2-Mutanten den PRR binden können, diese Mutanten also keinen Einfluss auf die Interaktion mit dem PRR haben (Abb. 44).



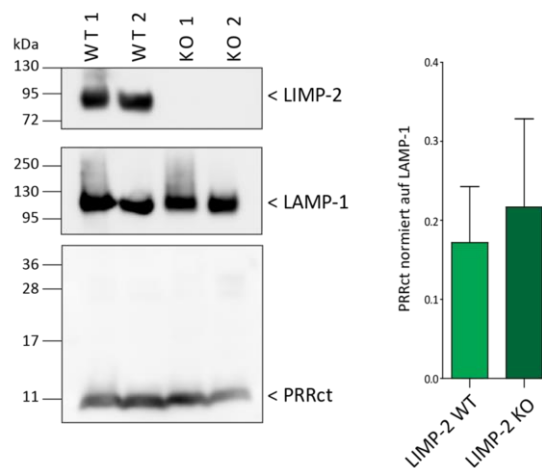
**Abb. 44 Verifizierung der Interaktionsstelle zwischen LIMP-2 und dem PRR.** A) Schematische Zeichnung von LIMP-2 Wildtyp (WT), der LIMP-2-LD Mutante, der LIMP-2 Ligandenbindedomäne ( $\Delta$ LB) Deletionsmutante und der LIMP-2 DDD Helix5/7 Mutante. LIMP-2-LD bezeichnet die luminaire Domäne von LIMP-2. Der LIMP-2  $\Delta$ LB Mutante fehlt ein großer Bereich der luminalen Domäne, die die Ligandenbinderegion einschließt. In LIMP-2-DDD Helix 5 und Helix 7 Mutante wurden gleichzeitig drei Aminosäuren gegen Asparaginsäure in beiden Helices ausgetauscht. B) Cos7-Zellen wurden mit der angegebenen cDNA transfiziert. Die Zellen wurden anschließend geerntet und eine Koimmunpräzipitation mittels myc-Antikörpers durchgeführt. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Hierbei wurden in der Lysatkontrolle und in der Koimmunpräzipitation die LIMP-2 Konstrukte mit dem myc-Antikörper und das PRR-Konstrukt mit dem HA-Antikörper sichtbar gemacht. Als Negativkontrolle diente eine Probe, die statt mit LIMP-2 mit GFP transfiziert worden ist. \* markieren die Antikörper-Banden. Der PRR kann sowohl mit Wildtyp LIMP-2 als auch mit Mutanten, denen die Ligandenbinderegion ( $\Delta$ LB) fehlt oder mutiert ist (DDD Helix 5/7) als auch mit der luminalen Domäne von LIMP-2 koprizipitiert werden.

Da es sich bei dem PRR um ein Transmembranprotein handelt, war es ebenfalls denkbar, dass die beiden Proteine über die LIMP-2-Transmembrandomänen interagieren. Ein LIMP-2 Mutante, der beide Transmembrandomänen fehlen (LIMP-2 LD) konnte allerdings in der Koimmunpräzipitation ebenfalls den PRR kopräzipitieren (Abb. 44)

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Mutationen der Transmembrandomänen oder des Bereichs, der wichtig für die Ligandenbindung ist, alleine nicht ausreichen, um eine Interaktion von LIMP-2 und dem PRR in Überexpression zu unterbinden.

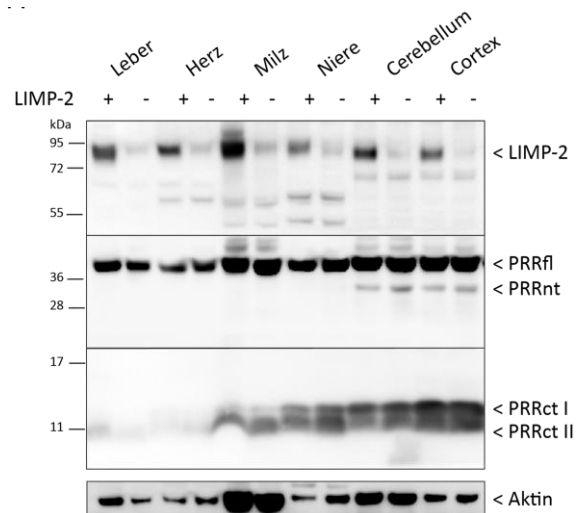
### 6.3.1.2 LIMP-2 zeigt keinen Einfluss auf die lysosomale Lokalisation oder Proteinmenge des PRRs *in vivo*

Da bereits in vorherigen Studien gezeigt werden konnte, dass LIMP-2 in Zellkulturexperimenten einen leichten Einfluss auf die Lokalisation des PRRs besitzt, wobei weniger PRR in späten Endosomen und Lysosomen zu detektieren war (Oelbe 2012), wurde in dieser Arbeit untersucht, ob LIMP-2 wichtig für die lysosomale Lokalisation des PRRs *in vivo* ist. Hierzu wurden Tritosomen (angereicherte Lysosomen der murinen Leber) aus Wildtyp und LIMP-2-defizienten Mäusen gewonnen und mittels Western Blot auf die Menge des PRRs untersucht. Es zeigte sich, dass sich in Lysosomen lediglich das C-terminale Fragment des PRRs und nicht der komplette PRR detektieren lässt. Allerdings ist das C-terminale Fragment des PRRs in Wildtyp und LIMP-2-defizienten Tritosomen mit der gleichen Proteinmenge im Vergleich zu LAMP-1 zu detektieren (Abb. 45). *In vivo* scheint die lysosomale Lokalisation des PRRs dementsprechend LIMP-2 unabhängig zu sein.



**Abb. 45 Detektion der Menge an PRR in LIMP-2 Wildtyp (WT) und LIMP-2-defizienten (KO) Tritosomen.** A) Tritosomenlysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach anschließendem Western Blot wurde die Menge an PRR, LIMP-2 und als Ladekontrolle LAMP-1 mittels Antikörperfärbung detektiert. B) Die Menge an C-terminalem Fragment des PRR wurde mittels ImageJ ermittelt und auf LAMP-1 als Ladekontrolle normiert. Die Daten aus den Wildtyp und LIMP-2-defizienten Tritosomen wurden mittels GraphPad Prism Software ausgewertet. N=2. Fehlerbalken werden als  $\pm$ SEM angegeben. Die Auswertung zeigt, dass die Menge an PRR in Tritosomen unabhängig von LIMP-2 ist.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit untersucht, ob LIMP-2 *in vivo* einen Einfluss auf Spaltung oder die Proteinmenge des PRRs hat. Hierfür wurden Lysate verschiedener Organe (Leber, Herz, Milz, Niere, Cerebellum, Cortex) aus Wildtyp oder LIMP-2 defizienten Mäusen mittels Western Blot analysiert (Abb. 46). Hier konnte zunächst gezeigt werden, dass der PRR in allen Organen zu detektieren ist. Die C-terminalen Fragmente des PRRs sind hauptsächlich in Milz, Niere, Cerebellum und Cortex nachzuweisen, wobei sich das erste (größere) C-terminale Fragment vor allem in den Hirnregionen und der Niere detektieren lässt. Im Herzen oder der Leber ist das C-terminale Fragment nur sehr schwach oder gar nicht zu detektieren. Das N-terminale Fragment ist hingegen lediglich in den Hirnregionen nachzuweisen. Letztendlich konnte mit dem Western Blot aber nicht gezeigt werden, dass LIMP-2 einen Einfluss auf die Proteinmenge oder die Spaltung des PRRs besitzt, da beides in Wildtyp und LIMP-2-defizienten Organen vergleichbar war.



**Abb. 46 Detektion der Proteinmenge des PRRs in murinen LIMP-2 Wildtyp (WT) und defizienten (KO) Organen.** Die entsprechenden LIMP-2 Wildtyp bzw. LIMP-2-defizienten Organe wurden mittels SDS-PAGE und Western Blotting analysiert. Es wurde eine Antikörperfärbung gegen endogenes LIMP-2 und endogenen PRR und seine Fragmente durchgeführt. Aktin diente hierbei als Ladekontrolle. Es ist kein Unterschied der PRR-Proteinmenge in Abhängigkeit von LIMP-2 zu detektieren.

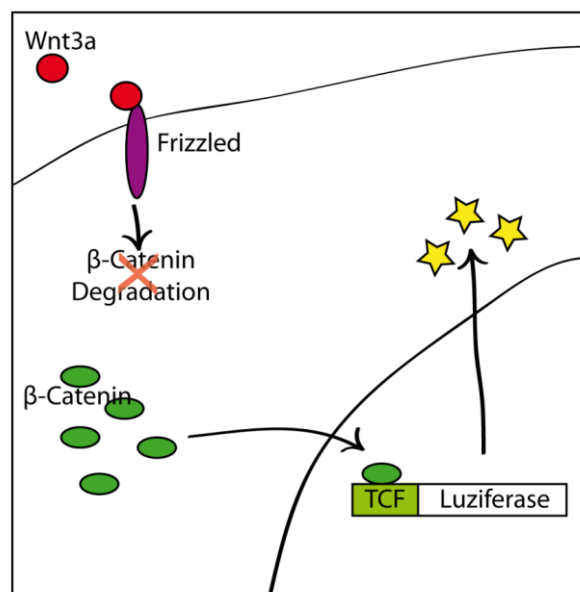


## 6.3.2 Untersuchungen zum Einfluss des LIMP-2 Proteins und des PRRs auf den Wnt-Signalweg

### 6.3.2.1 LIMP-2 zeigt einen negativen Einfluss auf den Wnt-Signalweg

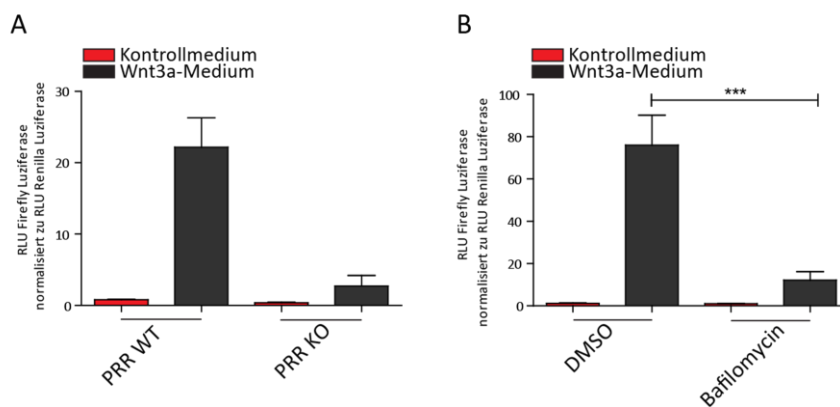
Da bereits gezeigt worden ist, dass der PRR als Teil der v-ATPase eine essentielle Rolle im Wnt-Signalweg spielt (Cruciat et al. 2010), sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob und in welcher Weise LIMP-2 als Interaktionspartner des PRRs einen Einfluss auf den Wnt-Signalweg hat. Initiale Versuche konnten bereits zeigen, dass in LIMP-2-defizienten MEFs nach Wnt3a-Stimulation mehr zytosolisches  $\beta$ -Catenin zu detektieren war, was ein Hinweis auf einen aktivierten Wnt-Signalweg darstellt (Zachos 2012).

Der Einfluss auf den Wnt-Signalweg wurde mittels eines Luziferase-Gen-Reporter-Assays gemessen. Hierbei wird unter der Kontrolle des Wnt-abhängigen Promotors (TCF/LEF) ein Luziferase-Gen exprimiert. Die Menge an gebildeter Luziferase kann dann mittels umgesetzten Substrates gemessen werden und lässt somit Rückschlüsse auf die Aktivierbarkeit des Wnt-Signalweges zu (Abb. 47).



**Abb. 47 Schematische Darstellung des Wnt-Signalweges.** Nach Aktivierung des Signalweges mittels Wnt3a-Medium wird der  $\beta$ -Catenin-Degradationskomplex inhibiert und  $\beta$ -Catenin kann als Transkriptionsfaktor in den Nucleus wandern und an den TCF/LEF-Promotor binden. Dies führt zur Expression des Luziferase-Gens und der Translation des entsprechenden Proteins. Im Luziferase-Assay kann die Menge an exprimierter Luziferase mittels umgesetzten Substrats ermittelt werden.

Zur Verifizierung der Funktionalität des Assays, wurde dieser zunächst in Wildtyp und PRR-defizienten MEFs durchgeführt. Da bereits gezeigt wurde, dass ein *knock-down* des PRRs einen negativen Einfluss auf die Aktivierbarkeit des Wnt-Signalwegs hat (Cruciat et al. 2010), bestätigen die erhaltenen Ergebnisse (Abb. 48A) die Funktionalität des Assays: Die PRR-defizienten MEFs zeigen hier eine deutlich reduzierte Aktivierbarkeit nach Wnt3a-Stimulation im Vergleich zu Wildtyp MEFs. Zur weiteren Assay-Kontrolle wurden HEK-Zellen mit Bafilomycin behandelt. Dies führt zum Anstieg des lysosomalen pH-Wertes und auch hier wurde bereits gezeigt, dass dies den Wnt-Signalweg negativ beeinflusst (Cruciat et al. 2010). Wie in Abb. 48B zu sehen, war nach Bafilomycin Behandlung eine starke Reduktion der Luziferase-Aktivität zu detektieren.

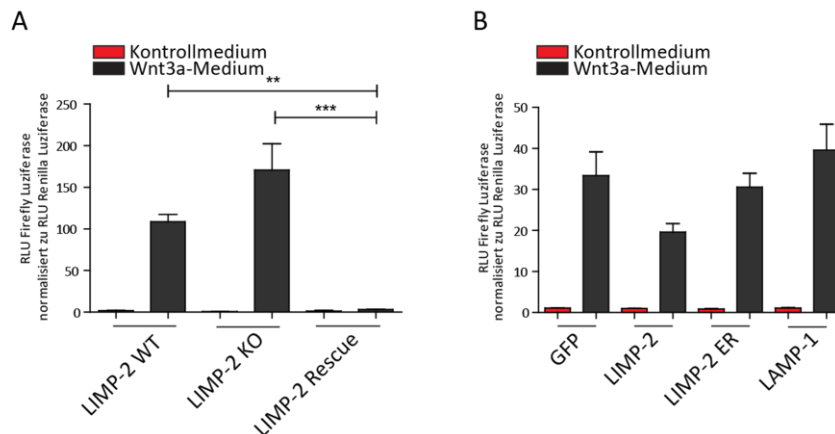


**Abb. 48 Wnt-abhängiger Luziferase-Assay in PRR defizienten MEFs und nach Bafilomycin A1 Behandlung.** Die getesteten Zellen wurden für den Wnt-abhängigen Luziferase-Assay ausplattiert und transfiziert. Die Zellen wurden 12h vor der Messung mit Wnt3a Medium bzw. mit L-Medium als Kontrolle behandelt (n=2). In B) wurden die HEK Zellen gleichzeitig mit Bafilomycin A1 inkubiert. Nach der Zellyse wurde die Menge an produzierter Luziferase mittels umgesetztem Substrats und gemessenen Lichtsignal (RLU = relative light units) ermittelt. Die Werte wurden auf die Renilla Aktivität als Transfektionskontrolle normiert. Anschließend wurden die Werte mittels GraphPad Prism Software und ANOVA mit anschließendem Tukey's post hoc ausgewertet.  $N \geq 3$ . Fehlerbalken werden als  $\pm$ SEM angegeben, \*\*\*p < 0,001. PRR-defiziente MEFs zeigen reduzierte Aktivierbarkeit des Wnt-Signalweges. Auch die Behandlung von HEK Zellen mit Bafilomycin reduziert die Aktivierbarkeit des Wnt-Signalweges.

Mit der gleichen Methode wurden Kontroll- und LIMP-2-defiziente MEFs untersucht. Zusätzlich wurden LIMP-2-defiziente MEFs analysiert, die stabil LIMP-2-myc überexprimierten (*Rescue* MEFs). Im Luziferase-Assay zeigte sich, dass die LIMP-2 Defizienz dazu führt, dass sich die Zellen tendenziell besser mittels Wnt3a stimulieren lassen (Abb. 49A). Eine Überexpression von LIMP-2-myc hat den gegenteiligen Effekt, da hier kaum noch eine Wnt-Signalweg-Stimulation zu messen war.

Da eine Überexpression von LIMP-2 den stärksten Effekt auf den Wnt-Signalweg zeigte, wurden anschließend HEK Zellen stabil mit LIMP-2-myc transfiziert, um den Einfluss von LIMP-2 zu verifizieren (Abb. 49B). Die Überexpression in HEK-Zellen zeigte ebenfalls eine verminderte Stimulierbarkeit des Wnt-Signalweges. Die Überexpression einer LIMP-2-Mutante, die das Endoplasmatische Reticulum nicht verlassen kann (LIMP-2 ER) und somit

das Lysosom nicht erreicht, zeigte diese Tendenz nicht. LAMP-1 als weiteres lysosomales Protein besaß keinen negativen Einfluss auf den Wnt-Signalweg nach Überexpression. Die Ergebnisse deuteten auf einen negativen Effekt von lysosomal lokalisiertem LIMP-2 auf die Aktivierbarkeit des Wnt-Signalweges hin.



**Abb. 49 Wnt-abhängiger Luciferase-Assay in LIMP-2-defizienten und Rescue Zellen und stabil transfizierten HEK-Zellen.** A) Die getesteten Zellen wurden für den Wnt-abhängigen Luciferase-Assay ausplattiert und transfiziert. Die Zellen wurden 12h vor der Messung mit Wnt3a-Medium bzw. mit L-Medium als Kontrolle behandelt. In B) wurden die HEK Zellen vor dem Luciferase-Assay wie angegeben stabil transfiziert und die entsprechende Proteinexpression mittels Western Blot kontrolliert. Nach der Zellyse wurde die Menge an produzierter Luciferase mittels umgesetzten Substrats und gemessenen Lichtsignal (RLU = relative light units) ermittelt. Die Werte wurden auf die Renilla Aktivität als Transfektionskontrolle normiert. Anschließend wurden die Werte mittels GraphPad Prism Software und ANOVA mit anschließendem Tukey's post hoc ausgewertet.  $N \geq 3$ . Fehlerbalken werden als  $\pm$ SEM angegeben; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . Die Überexpression von LIMP-2 führt zur starken Verminderung der Aktivierbarkeit des Wnt-Signalweges, wobei eine LIMP-2 ER-Retentionsmutante oder LAMP-1 keinen Einfluss auf den Signalweg zu haben scheinen.

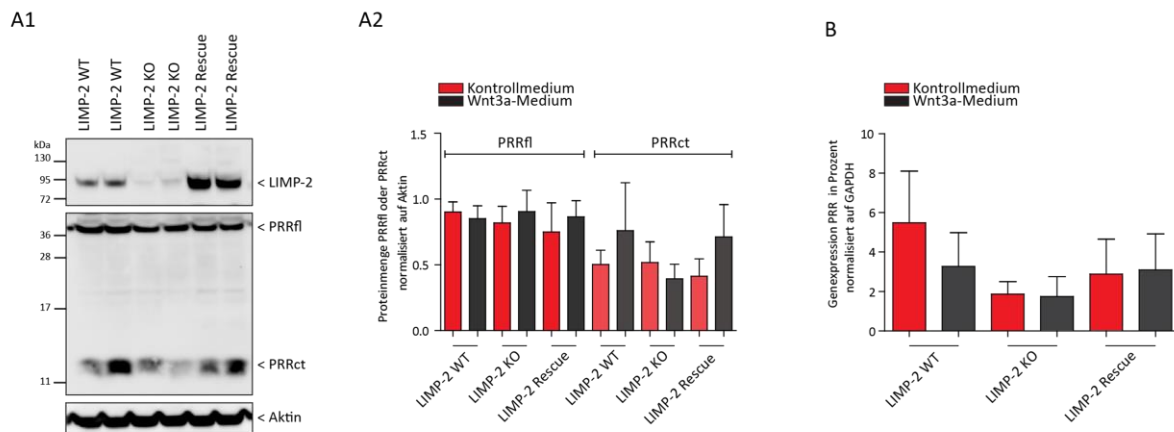
### 6.3.2.2 LIMP-2 zeigt keinen Einfluss auf den Prorenin Rezeptor nach Wnt-Signalweg Stimulation

Des Weiteren sollte überprüft werden, ob der Einfluss von LIMP-2 auf den Wnt-Signalweg durch eine veränderte Expression oder Spaltung des PRRs nach Wnt3a-Stimulation in Abhängigkeit von LIMP-2 zustande kommen könnte. Hierbei wurde mittels Western Blot die Menge des PRRs und der C-terminalen Fragmente, die als wichtiger Teil im Wnt-Signalweg fungieren (Cruciat et al. 2010), in Wildtyp, LIMP-2-defizienten und Rescue MEFs verifiziert (Abb. 50A1). Im Gegensatz zum maturen Prorenin Rezeptor war die Menge des C-terminalen Fragments insgesamt sehr variabel. Nach der Untersuchung drei unabhängiger Experimente, war allerdings kein Unterschied in der Menge oder Spaltung des PRRs in Abhängigkeit von LIMP-2 nach Wnt3a-Stimulation nachzuweisen (Abb. 50A2).

Zusätzlich wurde die Genexpression des PRRs ebenfalls in den oben genannten MEFs untersucht. Hierbei zeigte sich zwar eine generell etwas niedrigere aber nicht signifikant unterschiedliche Expression des PRRs in den LIMP-2-defizienten MEFs. Diese ist allerdings un-



abhängig von einer Wnt3a-Stimulation. Die Expression des PRRs in den Rescue MEFs ist vergleichbar mit den Wildtyp MEFs und auch hier zeigte sich - wie auch in den Wildtyp MEFs - kein Einfluss der Wnt3a-Stimulation auf die Genexpression des PRRs (Abb. 50B). Somit kann der Einfluss von LIMP-2 auf den Wnt-Signalweg zumindest unter Momentanbedingungen nicht auf eine veränderte Expression, Proteinmenge oder Spaltung des PRRs nach Wnt-Stimulation zurückgeführt werden.



**Abb. 50 Kontrolle der LIMP-2 abhängigen PRR-Expression und Proteinmenge nach Wnt3a-Stimulation.** A1/2) LIMP-2 Wildtyp, LIMP-2 defiziente und LIMP-2 *Rescue* Zellen wurden 12h vor der Ernte mit Wnt3a- bzw. L-Medium behandelt. Nach der Zellernte wurden die Lysate mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. LIMP-2 bzw. der PRR wurden anschließend durch eine spezifische Antikörperfärbung detektiert. Die Menge des PRRs und der C-terminalen PRR Fragmente wurde anschließend mittels Image J, GraphPad Prism Software und ANOVA mit anschließendem Tukey's post hoc ausgewertet. N=3. Fehlerbalken werden als  $\pm$ SEM angegeben. B) Die unter A analysierten MEFs wurden außerdem hinsichtlich ihrer PRR Genexpression untersucht. Hierfür wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Die Werte wurden mittels GraphPad Prism Software und ANOVA mit anschließendem Tukey's post hoc ausgewertet. N=3. Fehlerbalken werden als  $\pm$ SEM angegeben. Der PRR zeigte keine veränderte Protein- oder Genexpression sowie Proteinspaltung in Abhängigkeit von LIMP-2 nach Wnt-Stimulation.

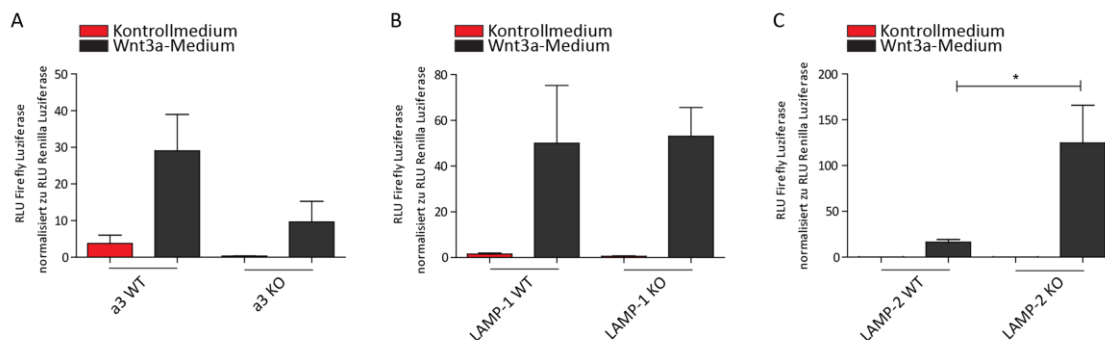
### 6.3.2.3 Lysosomale Inhibitions- und *Knock-out*-Experimente zeigen ebenfalls einen Einfluss auf das Wnt-Signaling in einem Luziferase-Gen-Reporter Assay

Da sich kein direkter Bezug von LIMP-2 auf den Wnt-Signalweg durch den PRR nachweisen ließ, wurde untersucht, ob der oben gezeigte Einfluss von LIMP-2 auf den Wnt-Signalweg auch von anderen lysosomalen Membranproteinen gezeigt wird.

Wie bereits erwähnt, kann der PRR als Teil der v-ATPase fungieren, deren Funktionalität wichtig für den Wnt-Signalweg ist (Cruciat et al. 2010). Zur Unterstützung dieser These, wurden MEFs untersucht, die eine Defizienz der  $\alpha$ 3-Untereinheit der v-ATPase aufweisen (Scimeca et al. 2000). Der Luziferase-Assay in diesen Zellen zeigte ebenfalls, dass die Defizienz der  $\alpha$ 3-Untereinheit einen negativen Effekt auf die Aktivierbarkeit des Wnt-Signalweges hat, was die wichtige Bedeutung einer funktionalen v-ATPase für den Wnt-Signalweg unterstreicht (Abb. 51A).

Der Verlust von LAMP-1 hatte wie auch die Überexpression dieses Proteins (Abb. 49) keinen Einfluss im Luziferase-Assay auf den Wnt-Signalweg (Abb. 51B). Andererseits hat die Defi-

izienz des lysosomalen Transmembranproteins LAMP-2 – wie LIMP-2 – einen positiven Effekt auf die Aktivierbarkeit des Wnt-Signalweges im Luziferase-Assay (Abb. 51C).



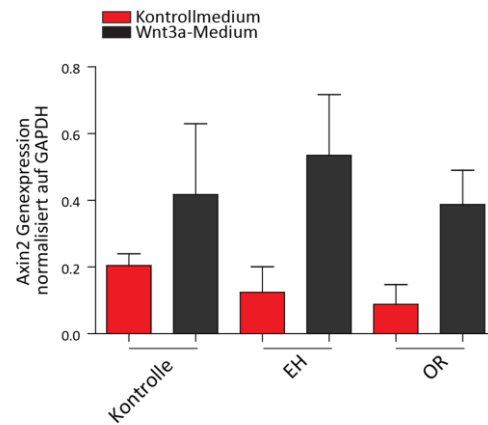
**Abb. 51 Wnt-Signalweg abhängiger Luziferase-Assay in verschiedenen MEF-Zellen.** Die angegebenen Zellen wurden transfiziert und 12h vor der Messung mit Wnt3a- bzw. L-Medium behandelt. Die Aktivität der Luziferase wurde anschließend gemessen und die Werte auf die Transfektionseffizienz der Renilla Luziferase normiert. Die Daten wurden mittels GraphPad Prism Software und ANOVA mit anschließendem Tukey's post hoc ausgewertet.  $N \geq 2$ . Fehlerbalken werden als  $\pm$ SEM angegeben. \* $p < 0,05$ . Die Defizienz der  $\alpha 3$  Untereinheit der v-ATPase führt zur verminderten Wnt-Signalwegstimulation, wobei die Defizienz von LAMP-1 keinen Einfluss auf die Aktivierbarkeit zeigt. Die Defizienz von LAMP-2 hat hingegen einen positiven Effekt auf den Wnt-Signalweg nach Wnt-Stimulation.

#### 6.3.2.4 Detektion der Axin2-Expression mittels qRT-PCR nach Wnt-Stimulation zeigte keinen Unterschied in AMRF-Patienten-Zellen

Neben dem Luziferase Assay ist die quantitative *real-time* PCR eine weitere Methode, um die Aktivierbarkeit des Wnt-Signalweges zu testen. Hierbei wird die Expression Wnt-abhängiger Gene nach der Stimulation mit Wnt3a-Medium gemessen. Der Vorteil der qRT-PCR ist, dass hiermit auch Zellen getestet werden können, die sich nicht transfizieren lassen (wie es beim Luziferase-Assay notwendig ist).

Um geeignete Gene zu finden, die sich zur Überprüfung des Wnt-Signalweges eignen, wurde zunächst die Expression von c-myc und CyclinD als Wnt-abhängige Zielgene (Herbst et al. 2014) ohne und mit Wnt3a-Stimulation getestet. Hierbei konnte kein reproduzierbarer Anstieg der Genexpression nach Wnt3a-Stimulation nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Da Axin2 als verlässliches Gen zur Überprüfung des Wnt-Signalweges bekannt war (Herbst et al. 2014), wurde die Genexpression dieses Wnt-Zielgens überprüft. Dabei konnte ein reproduzierbarer Anstieg an Axin2 mRNA nach Wnt3a-Stimulation gemessen werden. Somit war es mit der qRT-PCR möglich die AMRF-Patienten Fibroblasten, die sich nicht mit den Luziferase-Vektoren transfizieren ließen, auf ihre Aktivierbarkeit mittels Wnt3a-Medium zu testen. Hier zeigte sich, dass die AMRF-Patienten-Zellen (EH, OR), die kein detektierbares LIMP-2 Protein aufweisen (Berkovic et al. 2008), die gleiche Axin2-Genexpression nach Wnt3a-Stimulation wie die Kontroll Fibroblasten zeigen (Abb. 52). Des lässt darauf

schließen, dass die LIMP-2-Überexpression einen deutlicheren Effekt auf den Wnt-Signalweg hat als die LIMP-2-Defizienz.



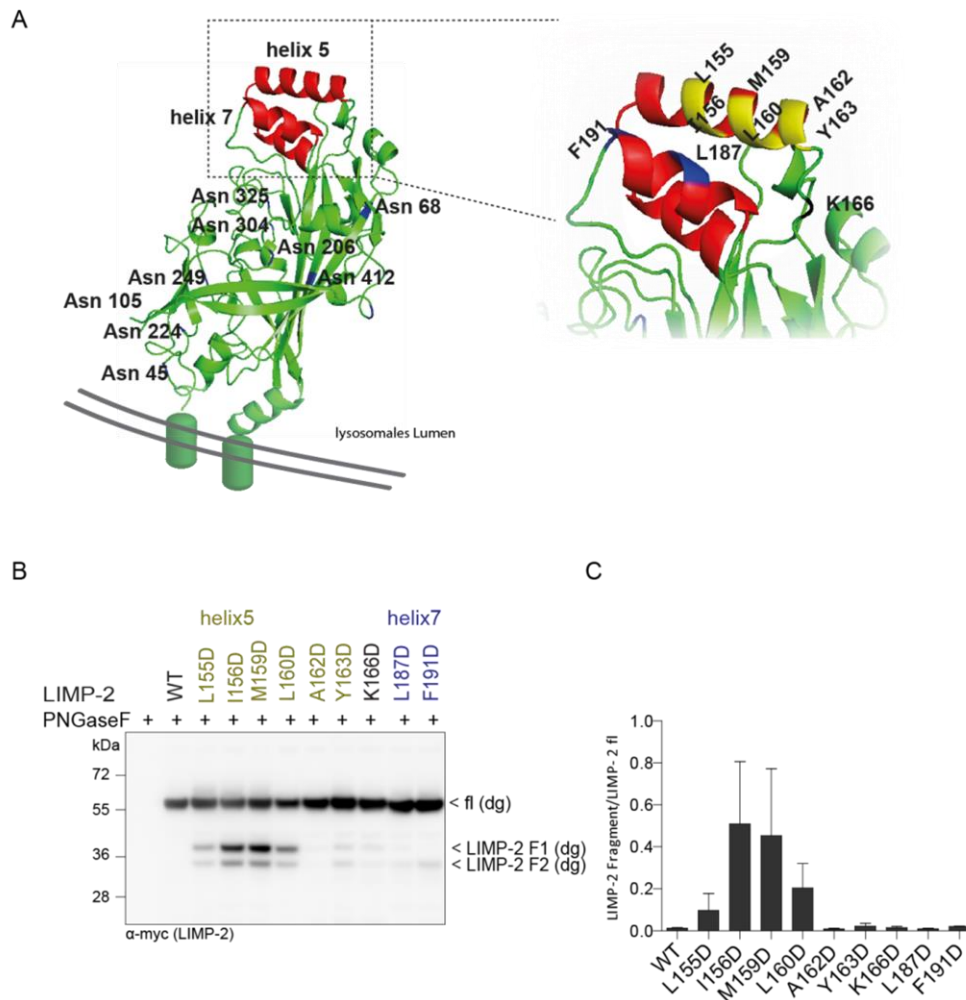
**Abb. 52 Untersuchung der Axin2-Expression mittels qRT-PCR nach Wnt3a Stimulation in Abhängigkeit von LIMP-2.** AMRF Patienten Fibroblasten wurden 12h vor der Zellernte mit Wnt3a- bzw. L-Medium stimuliert. Anschließend folgte die RNA Isolierung und qRT-PCR. Die Daten wurden mittels GraphPad Prism Software ausgewertet.  $N \geq 2$ . Fehlerbalken werden als  $\pm$ SEM angegeben.

## **6.4 Identifizierung und Charakterisierung von LIMP-2 als Substrat von Cathepsin F**

### **6.4.1 Identifizierung von Cathepsin F als Protease von LIMP-2**

#### **6.4.1.1 Mutationen in der Ligandenbinderegion von LIMP-2 induzieren die Spaltung des Proteins**

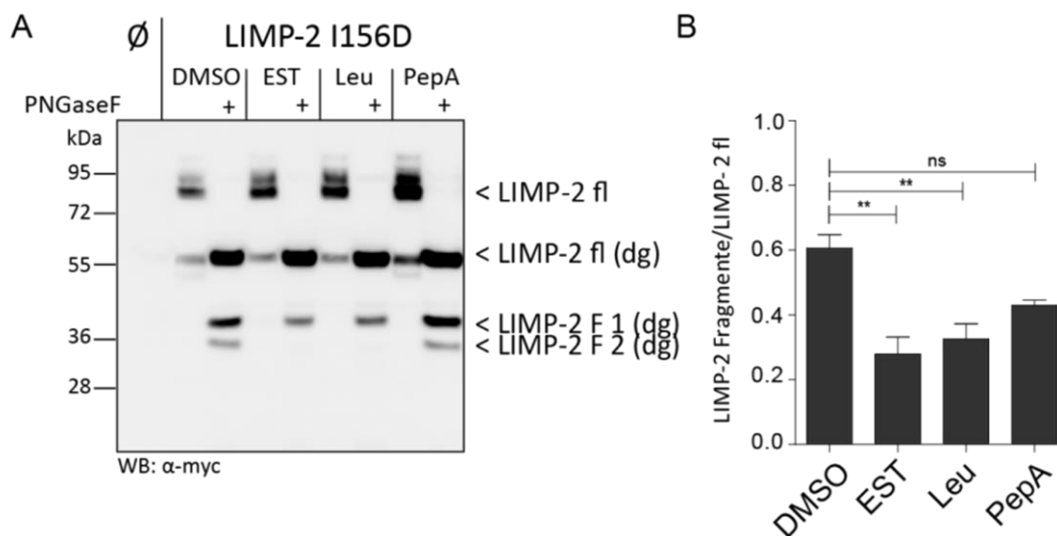
Bei der Untersuchung der Bindung von LIMP-2 und seinem Liganden  $\beta$ -GC wurden in vorherigen Studien Austauschmutationen in die Ligandenbinderegion (Helix 5 – 7) von LIMP-2 eingefügt (Neculai et al. 2013) (Abb. 53A). Bei der Untersuchung der Mutanten in dieser Arbeit, konnte beobachtet werden, dass einige Mutanten in Helix 5 (L155D, I156D, M159D, L160D) zwei Spaltprodukte von LIMP-2 zeigten (Abb. 53B/C). Die beiden Spaltprodukte konnten durch einen PNGaseF Verdau gut voneinandergetrennt werden und wurden als F1 und F2 bezeichnet. Mutationen in der interhelikalen Region (K166D) und in Helix 7 (L187D, F191D) zeigten diese Spaltprodukte nicht. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass LIMP-2 in Zellen proteolytisch gespalten werden kann. Die Mutationen in Helix 5 führen dazu, dass diese Spaltung vermehrt vorkommt und aufgrund dessen die Spaltprodukte mittels Western Blot identifiziert werden können. Da proteolytische Spaltungen das Protein und somit auch seine Funktionen beeinflussen können, wurde die Proteolyse von LIMP-2 im Weiteren näher untersucht.



**Abb. 53 Detektion der Proteolyse von LIMP-2.** A) Schematische Darstellung der humanen LIMP-2-Ligandenbinderegion. Verwendete Mutanten sind in gelb (Helix 5) oder blau (Helix 7) verdeutlicht. Schema wurde von Friederike Zunke (Universität Kiel) erstellt. B) HEK Zellen wurden mit den angegebenen murinen LIMP-2-myc Konstrukten transfiziert. Die Lysate wurden nach dem PNGaseF Verdau mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die Proteine wurden mittels myc-Antikörpers sichtbar gemacht. Es ist LIMP-2 full length (fl) und die beiden Fragmente zu detektieren. Dg = deglykosiliert. C) Die Bandenintensität von LIMP-2 und den Fragmenten aus B und C wurden mittels ImageJ ermittelt und anschließend mit der GraphPad Prism ausgewertet. N=2. Fehlerbalken werden als  $\pm$ SEM angegeben. Mutationen in Helix 5 induzieren die Spaltung von LIMP-2.

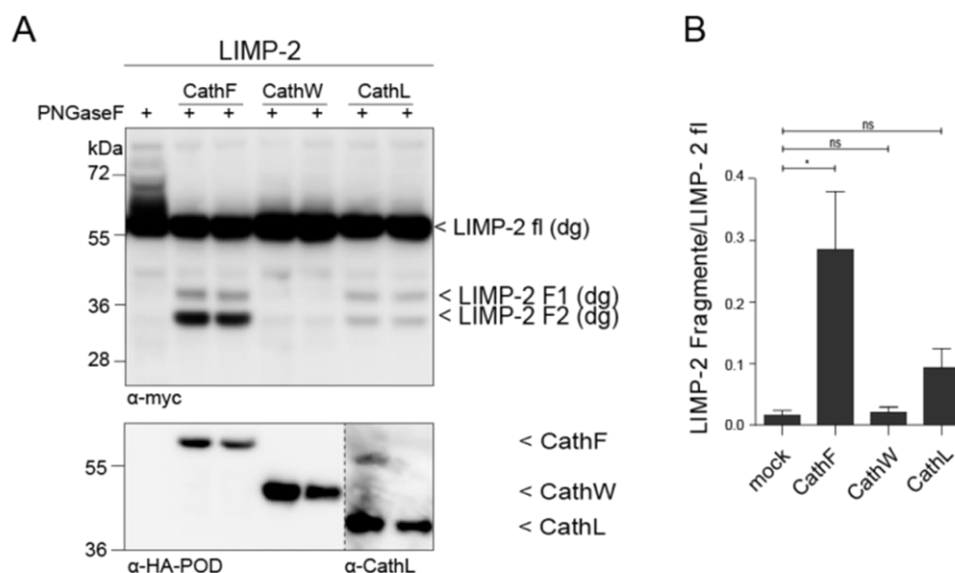
### 6.4.1.2 LIMP-2 wird durch Cystein-Proteasen – insbesondere Cathepsin F – geschnitten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass LIMP-2 Spaltfragmente aufweist, stellte sich die Frage, durch welche Proteasen diese entstehen. Zur Analyse wurde die LIMP-2 I156D Mutante verwendet, da diese Mutante die größte Menge der Spaltprodukte aufwies. Zur Identifikation der verantwortlichen Proteasen wurden Inhibitoren gegen spezifische Proteasen verwendet. Hierbei wurden HEK-Zellen transient mit der LIMP-2 I156D Mutante transfiziert und 12h vor der Ernte mit den entsprechenden Inhibitoren behandelt. EST (E-64-D) und Leupeptin inhibieren Cystein-Proteasen, wohingegen Pepstatin A ein Inhibitor für Asparatylproteasen ist (Umezawa 1976; Tamai et al. 1987). Zellen, die mit Cystein-Protease-Inhibitoren behandelt wurden, zeigen eine verminderte Menge an F1 und F2 Fragment, was nach der Behandlung mit dem Asparatylproteaseinhibitor nicht signifikant war (Abb. 54). Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die Spaltung der LIMP-2 I156D Mutante durch Cystein-Proteasen induziert wird.



**Abb. 54 Inhibitionstests der Spaltung der LIMP-2 I156D-Mutante.** HEK-Zellen wurden mit dem LIMP-2 I156D-myc Konstrukt transfiziert und 12h vor der Ernte mit den entsprechenden Inhibitoren behandelt. Die Lysate wurden nach dem PNGaseF-Verdau mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Es wurde mit einem myc-Antikörper spezifisch gegen LIMP-2 I156D gefärbt. LIMP-2 dg = LIMP-2 deglykosiliert. LIMP-2 fl=LIMP-2 *full length*. Beide Fragmente von LIMP-2 treten nach der EST und der Leupeptin Behandlung vermindert auf. Zur statistischen Auswertung wurden drei Western Blots densitometrisch mittels ImageJ ausgewertet. Die Daten wurden mittels GraphPad Prism Software und ANOVA mit anschließendem Tukey's post hoc ausgewertet. Fehlerbalken werden als  $\pm$ SEM angegeben. \*\*p < 0,01; ns = nicht signifikant.

Bekannte Cystein-Proteasen in Lysosomen sind verschiedene Cathepsine (Turk et al. 2012). Zur Verifizierung, ob bzw. welche Cathepsine die Spaltung von LIMP-2 induzieren könnten, wurde Wildtyp LIMP-2-myc zusammen mit Cathepsin F-HA, Cathepsin W-HA oder Cathepsin L transient in HEK Zellen exprimiert. Um deutlich erkennen zu können, welche Spaltfragmente durch welches Cathepsin induziert werden, wurden die Lysate nach der Ernte mit PNGaseF verdaut. Abb. 55 zeigt, dass die Überexpression von Cathepsin F den größten Einfluss auf die Menge an detektierbaren Spaltfragmenten hatte. Cathepsin L war ebenfalls in der Lage kleine Mengen der Fragmente zu induzieren. Cathepsin W hingegen spaltete LIMP-2-myc in HEK Zellen nicht, obwohl es strukturell am nächsten mit Cathepsin F verwandt ist (Wex et al. 2000).

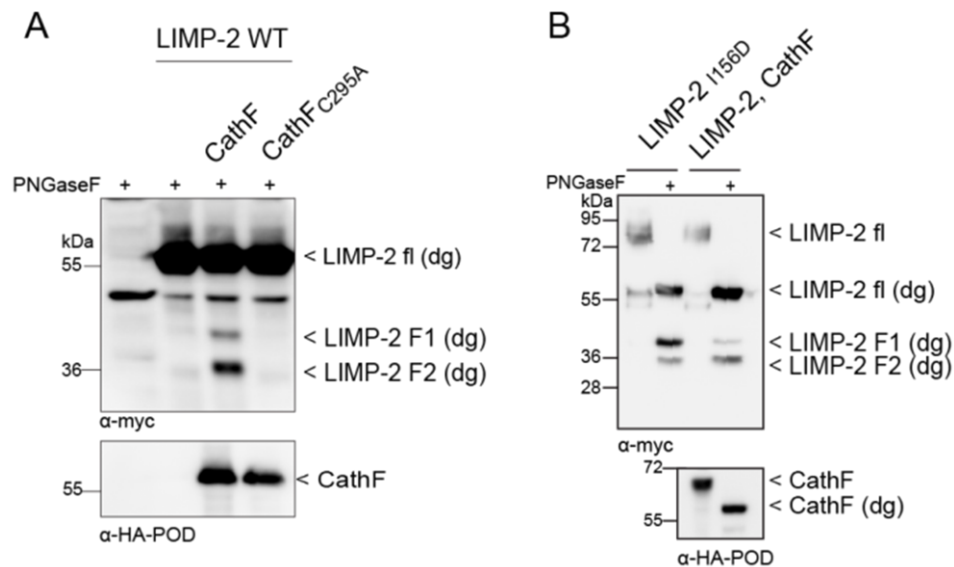


**Abb. 55 Identifizierung der LIMP-2 spaltenden Cathepsine.** A) HEK Zellen wurden wie angegeben mit LIMP-2-myc und den entsprechenden Cathepsin-Konstrukten transfiziert. Die Lysate wurden mit PNGaseF verdaut und anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert und die Proteine mit HA-POD, myc oder Cathepsin L Antikörper nachgewiesen. LIMP-2 fl (dg) zeigt deglykosiliertes LIMP-2 *full length* nach PNGaseF Verdau. B) Die Menge an LIMP-2 fl und LIMP-2 Fragmenten wurde mittels ImageJ ermittelt und die Menge an Fragment durch die Menge an LIMP-2 fl dividiert. N=3. Die Daten wurden mittels GraphPad Prism Software und ANOVA mit anschließendem Tukey's post hoc ausgewertet. Fehlerbalken werden als ±SEM angegeben, \*p < 0,05.

Zur weiteren Verifizierung der LIMP-2-Spaltung durch Cathepsin F, wurde untersucht, ob eine Cathepsin F-Mutante, in der das Cystein des aktiven Zentrums gegen ein Alanin ausgetauscht wurde (Cathepsin F inaktiv, C295A), noch in der Lage ist LIMP-2-myc zu spalten. Abb. 56A zeigt mittels Western Blots der entsprechenden HEK-Lysate, dass die inaktive Mutante von Cathepsin F tatsächlich keine LIMP-2-Fragmentierung induzierte.

Zusätzlich sollte noch gezeigt werden, ob die Fragmente, die durch Cathepsin F Überexpression entstehen, mit den Fragmenten der LIMP-2 I156D Mutante zu vergleichen sind. Hierfür wurden HEK-Lysate, in denen die LIMP-2 I156D Mutante bzw. Wildtyp LIMP-2 mit Cathepsin F-Koexpression auf einem gemeinsamen SDS-Gel analysiert. Es zeigte sich,

dass die F1 und F2 Fragmente auf der gleichen Höhe laufen und dementsprechend vergleichbar sind (Abb. 56B).



**Abb. 56 Identifizierung der LIMP-2 Spaltung durch Cathepsin F.** A) HEK Zellen wurden mit LIMP-2-myc und Wildtyp oder der inaktiven Cathepsin F Mutante transfiziert. Die Lysate wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch einen Western Blot und spezifischer Antikörperfärbung mit HA-POD und myc-Antikörpern analysiert. B) HEK Zellen wurden transient mit LIMP-2 I156D oder LIMP-2-myc und Cathepsin F-HA transfiziert und nach eventuellem PNGaseF Verdau (P) mittels SDS-PAGE und Western Blotting analysiert. Die Fragmente 1 und 2 sind in der Mutante und in Wildtyp LIMP-2 nach Cathepsin F Überexpression vergleichbar

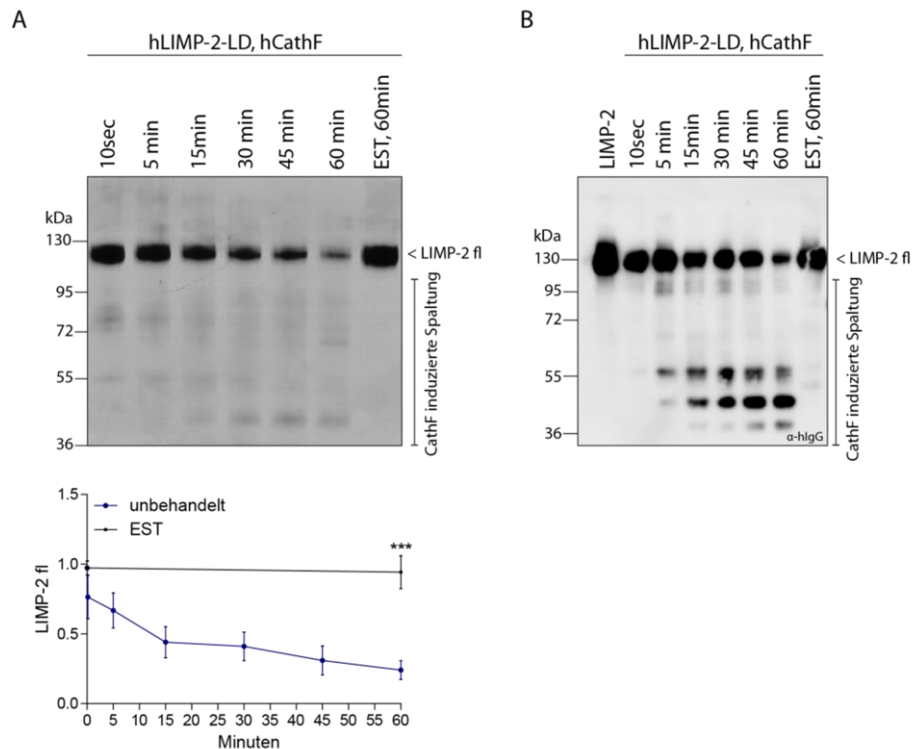
#### 6.4.1.3 LIMP-2 wird direkt von Cathepsin F *in vitro* geschnitten

Die vorherigen Experimente zeigten zwar, dass die Expression von Cathepsin F die LIMP-2-Spaltung induziert, allerdings war dies kein direkter Beweis dafür, dass Cathepsin F selbst die Spaltung von LIMP-2 durchführt und nicht nur eventuell andere Cathepsine aktiviert. Um dies zu verifizieren, wurde rekombinantes Cathepsin F und die rekombinante luminale Domäne von LIMP-2 in einem *in vitro* Assay untersucht. Hierbei zeigte sich, sowohl im Immunoblot als auch im Silbergel, dass rekombinantes Cathepsin F die Spaltung von LIMP-2 direkt induzieren kann (Abb. 57).

Die rekombinante luminale Domäne von LIMP-2 läuft aufgrund eines fusionierten Antikörperteils bei circa 120 kDa. Während der Inkubation mit Cathepsin F nahm die Menge des muren LIMP-2 über die Zeit ab. Dementsprechend wurden verschiedene kleinere Fragmente sichtbar. Inhibitiert man Cathepsin F durch die Inkubation mit dem Cysteininhibitor EST, ist auch nach 60 Minuten Inkubation kein Spaltfragment zu detektieren. Dies zeigt, dass es sich bei den detektierten Fragmenten nicht um einfachen Zerfall der luminalen LIMP-2-Domäne handelt, sondern um gezielten Abbau durch Cathepsin F. Dies



lässt darauf schließen, dass auch in Zellen die Spaltung von LIMP-2 direkt durch Cathepsin F induziert wird, LIMP-2 also ein natürliches Substrat von Cathepsin F darstellt.



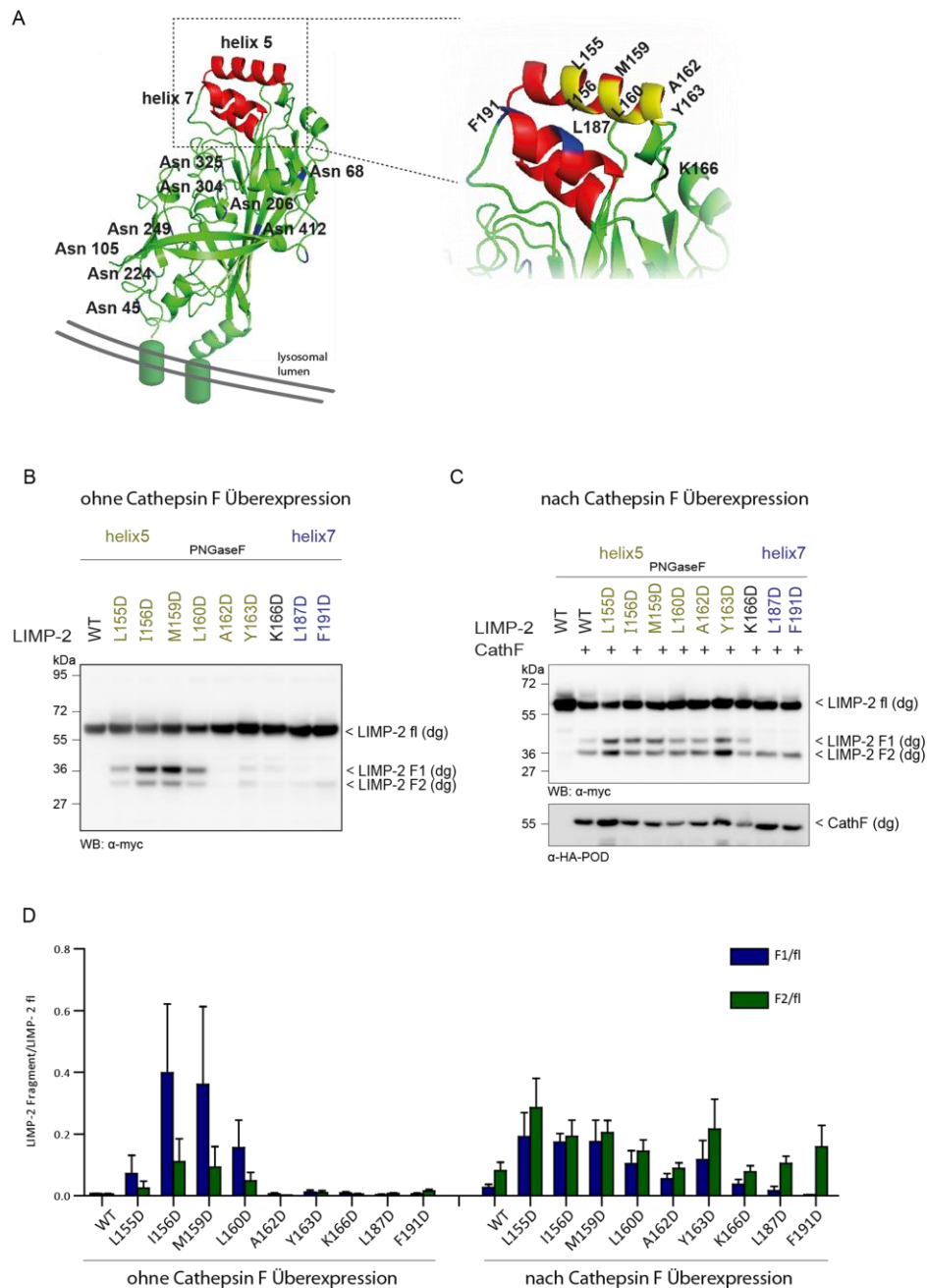
**Abb. 57 Spaltung der rekombinanten luminalen Domäne von LIMP-2 durch rekombinantes Cathepsin F.** Rekombinante luminalen Domäne von LIMP-2 (hLIMP-2-LD) wurde mit Cathepsin F zusammen für den angegebenen Zeitraum bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und entweder mittels Silberfärbung (A) oder Immunoblotting (B) sichtbar gemacht. Die Menge an LIMP-2 fl wurde von drei Silbergel-Versuchen densitometrisch ausgewertet und grafisch dargestellt. Die Daten wurden mittels GraphPad Prism Software und ANOVA mit anschließendem Tukey's post hoc ausgewertet. Fehlerbalken werden als  $\pm$ SEM angegeben, \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 6.4.1.4 Die Ligandenbinderegion in LIMP-2 ist bedeutend für die Spaltung des Proteins

Wie bereits beobachtet werden konnte, zeigen Mutationen in Helix 5 von LIMP-2 vermehrt Spaltprodukte. Dies deutete darauf hin, dass die Region um Helix 5, die Ligandenbinderegion (Neculai et al. 2013), wichtig für die Induktion der Proteolyse ist. Unterstützt wird dies durch die Kristallstruktur von LIMP-2, die zeigt, dass in dieser Region keine abschirmenden Glykosylierungen zu finden sind (Abb. 58A).

*In silico* Analysen konnten zeigen, dass eine Spaltung in Helix 5 zu einem circa 36kDa großen Fragment führen würde ([http://www.bioinformatics.org/sms/prot\\_mw.html](http://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html)). Dies wäre mit dem kleineren F2 Fragment von LIMP-2 zu vergleichen (Abb. 58B/C).

Aufgrund dessen, wurden die LIMP-2 Mutanten in dieser Region näher auf ihre Spaltung hin untersucht. Wie bereits gezeigt werden konnte, führen Mutationen in Helix 5 zur vermehrten Spaltung (Abb. 58B). Nach der Überexpression von Cathepsin F zeigte sich, dass die Mutanten in Helix 5 und auch die interhelikale Mutante nach Cathepsin F Überexpression beide Fragmente aufweisen (Abb. 58C). Bei den Helix 7-Mutanten konnte ebenfalls eine LIMP-2-Spaltung induziert werden, allerdings war lediglich das kleinere F2 Fragment zu detektieren. Die Generierung des größeren F1 LIMP-2-Spaltfragments wurde durch die Mutationen in Helix 7 unterbunden.



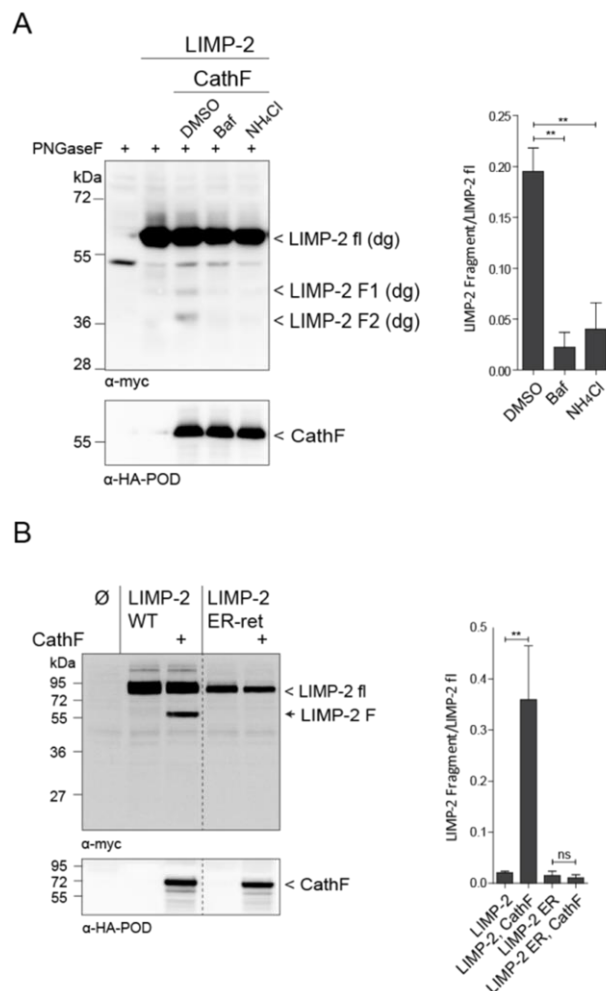
**Abb. 58 Detektion der potenziellen Spaltstelle in LIMP-2.** A) Schematische Darstellung der murinen LIMP-2 Ligandenbinderegion. Verwendete Mutanten sind in gelb (Helix 5) oder blau (Helix 7) verdeutlicht. Schema wurde von Friederike Zunke erstellt. B/C) HEK Zellen wurden mit den angegebenen LIMP-2-myc Konstrukten und in C zusätzlich mit Cathepsin F-HA transfiziert. Die Lysate wurden nach dem PNGaseF Verdau mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die Proteine wurden mittels myc-bzw. HA-POD-Antikörper sichtbar gemacht. Es ist LIMP-2 *full length* (fl) und die beiden Fragmente zu detektieren. Dg = deglykosiliert. D) Die Bandenintensität von LIMP-2 und den Fragmenten aus B und C wurden mittels ImageJ ermittelt und anschließend mit der GraphPad Prism ausgewertet. N=2-3. Fehlerbalken werden als  $\pm$ SEM angegeben. Mutanten in Helix 5 induzieren die Bildung der Spaltfragmente unabhängig von einer Cathepsin F Überexpression. Nach Cathepsin F Überexpression zeigten die Mutanten in Helix 7 kein F1 Fragment.

Die Ergebnisse zeigten, dass Mutationen in der Ligandenbinderegion von LIMP-2 die Spaltung des Proteins sowohl positiv als auch negativ beeinflussen. Zusätzlich wurde deutlich, dass Mutanten in Helix 5, aber nicht Helix 7, zur vermehrten Spaltung neigen. Zusammenfassend deutet dies darauf hin, dass die Ligandenbinderegion bedeutend für die Spaltung von LIMP-2 durch Cathepsin F ist.

### 6.4.1.5 Die Spaltung von LIMP-2 findet in späten Endosomen/Lysosomen statt

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Cathepsin F die Spaltung von LIMP-2 durchführt, sollte untersucht werden, in welchem zellulären Kompartiment diese Spaltung stattfindet. Da LIMP-2 und Cathepsin F lysosomal lokalisiert sind (Wang et al. 1998; Reczek et al. 2007), wurde eine Spaltung in lysosomalen Kompartimenten untersucht. Dabei wurden die HEK-Zellen mit Bafilomycin A1 oder Ammoniumchlorid für 12h behandelt. Beide Substanzen führen dazu, dass der pH-Wert des Lysosoms neutralisiert wird und somit lysosomale Proteasen gehemmt werden (Yoshimori et al. 1991).

Die Entstehung der LIMP-2 Fragmente, die nach Koexpression von LIMP-2 und Cathepsin F entstehen, konnten signifikant durch lysosomale Inhibitoren reduziert werden (Abb. 59A).



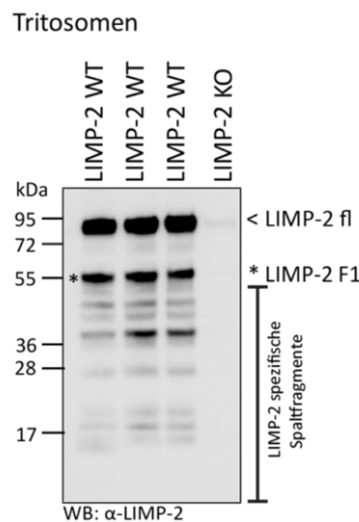
**Abb. 59 LIMP-2 wird in späten Endosomen/Lysosomen geschnitten.** A) HEK Zellen wurden transient mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und 12h vor der Ernte mit den Inhibitoren behandelt. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert und gegen myc bzw. HA-POD gefärbt. Die Menge an LIMP-2fl (full length) und LIMP2 Fragmenten aus Versuch A und B wurde mittels ImageJ ermittelt und die Menge des Fragments durch die Menge an LIMP-2fl dividiert. Die Daten wurden mittels GraphPad Prism Software und ANOVA mit anschließendem Tukey's post hoc ausgewertet. N=3. Fehlerbalken werden als  $\pm$ SEM angegeben  $**p < 0,01$ . Blots zur statistischen Auswertung wurden teilweise von R. Weisner/A. Rittger angefertigt. B) HEK Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und die Lysate anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden dann mittels Western Blot und spezifischer HA-POD und myc-Antikörperfärbung sichtbar gemacht. Es ist LIMP-2 full length (fl) und ein Fragment zu detektieren. Dg = deglykosiliert. Die Experimente zeigen, dass die Spaltung von LIMP-2 WT durch Cathepsin F in späten Endosomen oder Lysosomen stattfindet.

Zusätzlich zu den Inhibitorversuchen, wurde ebenfalls die Spaltung einer LIMP-2 Mutante, die das Endoplasmatische Retikulum nicht verlassen kann (LIMP-2 ER), durch Cathepsin F untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Expression dieser Mutante zusammen mit Cathepsin F in HEK Zellen im Gegensatz zum Wildtyp LIMP-2 nicht zur Spaltung führte (Abb. 59B).

Diese Versuche lassen den Schluss zu, dass LIMP-2 in späten Endosomen/Lysosomen gespalten wird.

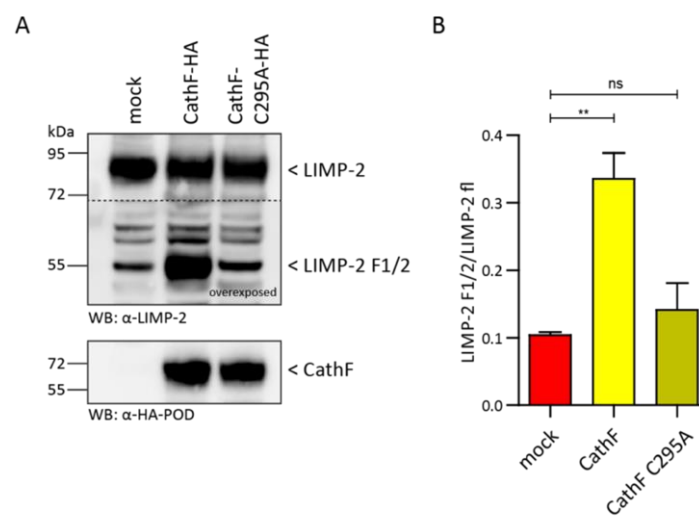
#### 6.4.1.6 LIMP-2 wird auch endogen durch Cathepsin F gespalten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Spaltung von LIMP-2 durch Cathepsin F im Lysosomen stattfindet, wurde untersucht, ob auch endogenes LIMP-2 im Lysosomen gespalten vorliegt. Hierfür wurden sogenannte Tritosomen (angereicherte Lysosomen der murinen Leber) aus Wildtyp und LIMP-2-defizienten Mäusen gewonnen. Diese Lysate wurden mittels Western Blot analysiert und gegen den C-Terminus von LIMP-2 gefärbt. Hierbei war nicht nur das mature LIMP-2-Protein (LIMP-2 fl) bei circa 80kDa zu detektieren, sondern es zeigten sich weitere C-terminale LIMP-2 spezifische Banden (Abb. 60). Diese Ergebnisse zeigen, dass LIMP-2 auch endogen in Lysosomen gespalten vorliegt.



**Abb. 60 Detektion LIMP-2 spezifischer Spaltprodukte in Tritosomen.** Von drei Wildtyp und LIMP-2 defizienten Mäusen wurden Tritosomen gewonnen. Die Lysate wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Zur spezifischen Detektion von LIMP-2 wurde ein Antikörper gegen den LIMP-2 C-Terminus verwendet. Es ist das mature LIMP-2 Protein und mehrerer weitere spezifische LIMP-2 Banden zu detektieren.

Zusätzlich wurde überprüft, ob die Spaltung von endogenem LIMP-2 durch Cathepsin F nachgewiesen werden kann. Hierfür wurden Neuroblastoma Zellen (N2a) verwendet, da diese eine große Menge an endogenem LIMP-2 aufweisen. Nach der Überexpression von Cathepsin F wurde mittels Western Blots endogenes LIMP-2 detektiert. Hierbei war es möglich ein 55 kDa großes Fragment zu detektieren, dessen Menge sich nach Cathepsin F Überexpression erhöhte (Abb. 61). Als Negativkontrolle diente die Überexpression von inaktivem Cathepsin F, wobei kein Anstieg der Intensität der 55kDa Bande zu detektieren war. Somit konnte gezeigt werden, dass auch endogenes LIMP-2 durch Cathepsin F gespalten werden kann.



**Abb. 61 Detektion der endogenen Spaltung von LIMP-2 durch Cathepsin F in N2a-Zellen.** A) Neuroblastoma Zellen (N2a) wurden wie angegeben mit den Cathepsin F Konstrukten transfiziert. Die Lysate wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert und gegen HA-POD und endogenes LIMP-2 gefärbt. Es ist das mature LIMP-2 (LIMP-2 fl) und ein Fragment bei 55kDa (LIMP-2 F1/2) zu erkennen, dessen Intensität nach Koexpression von Cathepsin F zunimmt. B) Die Menge an LIMP-2fl (*full length*) und LIMP-2 F1/2 wurde mittels ImageJ ermittelt und die Menge an Fragment durch die Menge an LIMP-2fl dividiert. Die Daten wurden mittels GraphPad Prism Software und ANOVA mit anschließendem Tukey's post hoc ausgewertet. N=3. Fehlerbalken werden als  $\pm$ SEM angegeben; \*\*p < 0,01; ns= nicht signifikant. Blots zur statistischen Auswertung wurden teilweise von A. Rittger durchgeführt. Cathepsin F, aber nicht die inaktive Mutante, induziert die Spaltung von endogenem LIMP-2.

## 6.4.2 Untersuchungen zur Funktion der LIMP-2 Spaltung durch Cathepsin F

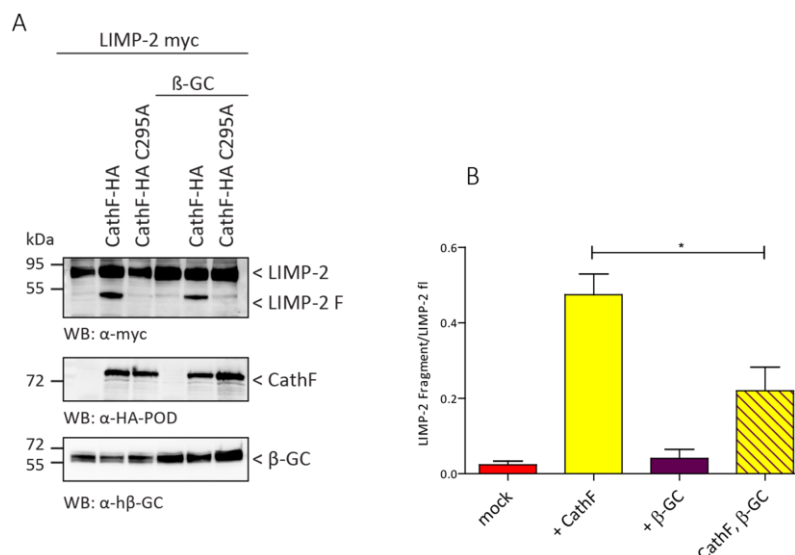
### 6.4.2.1 Cathepsin F und $\beta$ -Glukocerebrosidase ( $\beta$ -GC) beeinflussen sich gegenseitig in ihrer Funktion

Die bestuntersuchte Funktion von LIMP-2 ist der Transport von  $\beta$ -GC vom ER ins Lysosom. Deswegen sollte untersucht werden, inwiefern Cathepsin F als weiterer Interaktionspartner Einfluss auf  $\beta$ -GC und umgekehrt hat.

#### 6.4.2.1.1 $\beta$ -GC Überexpression reduziert die Cathepsin F abhängige Spaltung von LIMP-2

Bei der Untersuchung der Spaltstelle in LIMP-2, konnte bereits gezeigt werden, dass LIMP-2 Mutanten in Helix 5, die kein  $\beta$ -GC mehr binden können, vermehrte Spaltung auch ohne Cathepsin F-Überexpression zeigten. Dies deutet darauf hin, dass die Ligandenbinderegion, an die auch  $\beta$ -GC bindet, wichtig für die Proteolyse von LIMP-2 ist.

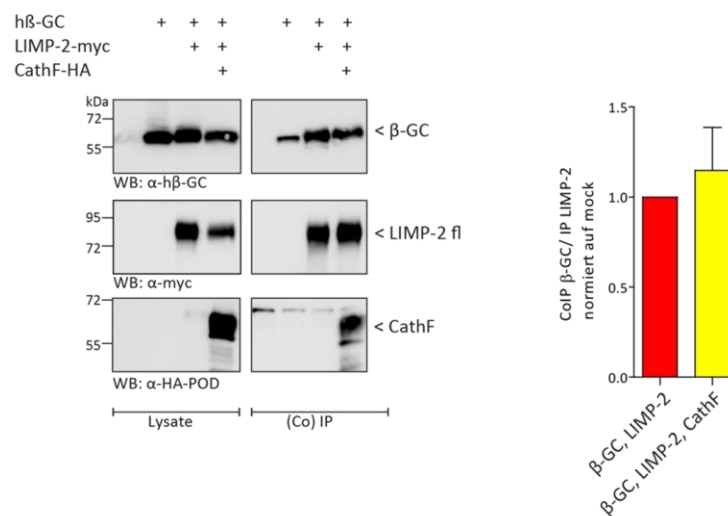
Um dies zu verifizieren, wurden HEK Zellen sowohl mit LIMP-2-myc als auch mit Wildtyp Cathepsin F bzw. der inaktiven Mutante (C295A) transfiziert. Zusätzlich wurde in einem Teil der Zellen auch  $\beta$ -GC überexprimiert. Anschließend wurde die Menge an LIMP-2-spezifischen Spaltprodukten mittels Western Blot analysiert. In Abb. 62 ist zu sehen, dass in drei unabhängigen Versuchen, die Überexpression von  $\beta$ -GC zu einer verminderten Fragmentierung von LIMP-2 durch Cathepsin F führte. Dies zeigt, dass  $\beta$ -GC einen negativen Einfluss auf die Spaltung von LIMP-2 durch Cathepsin F besitzt.



**Abb. 62 Detektion der Cathepsin F-abhängigen LIMP-Spaltung nach  $\beta$ -GC Überexpression.** A) HEK Zellen wurden mit den entsprechenden LIMP-2, Cathepsin F oder h $\beta$ -GC Konstrukten transfiziert. Die Lysate wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die Proteine wurden durch eine spezifische Antikörperfärbung gegen myc, HA oder humanes  $\beta$ -GC sichtbar gemacht. B) In den resultierenden Blots wurde dann die Menge an LIMP-2fl (*full length*) und LIMP-2 Fragment mittels ImageJ ermittelt und die Menge der Fragmente durch die Menge an LIMP-2fl dividiert. Die Daten wurden mittels GraphPad Prism Software ANOVA mit anschließendem Tukey's post hoc ausgewertet. N=3. Fehlerbalken werden als  $\pm$ SEM angegeben; \*p < 0,05. Die Überexpression von  $\beta$ -GC führt zur verminderten Spaltung von LIMP-2 durch Cathepsin F.

#### 6.4.2.1.1.1 *Cathepsin F beeinflusst nicht die Lokalisation von $\beta$ -GC*

Da gezeigt werden konnte, dass  $\beta$ -GC-Überexpression die Spaltung von LIMP-2 vermindert, wurde auch untersucht, ob Cathepsin F und  $\beta$ -GC um die Bindung an dieser Region konkurrieren und somit abhängig von der Überexpression des anderen Liganden fehllokalisiert werden. Hierbei wurde zunächst mittels Koimmunpräzipitation analysiert, ob Cathepsin F Überexpression die Bindung von  $\beta$ -GC an LIMP-2 beeinflusst. Es wurden N2a Zellen mit  $\beta$ -GC und LIMP-2-myc überexprimiert. In einer Probe wurde zusätzlich Cathepsin F-HA koexprimiert und anschließend LIMP-2-myc präzipitiert. Auch wenn leichte unspezifische Bindungen von  $\beta$ -GC an die Beads zu detektieren waren, zeigte sich, dass  $\beta$ -GC mit LIMP-2 unabhängig von der Cathepsin F-HA Überexpression im gleichen Maße kopräzipitiert werden kann (Abb. 63). Die Überexpression von Cathepsin F besitzt dementsprechend keinen Einfluss auf die Bindungseigenschaften von  $\beta$ -GC an LIMP-2 in Koimmunpräzipitationen.

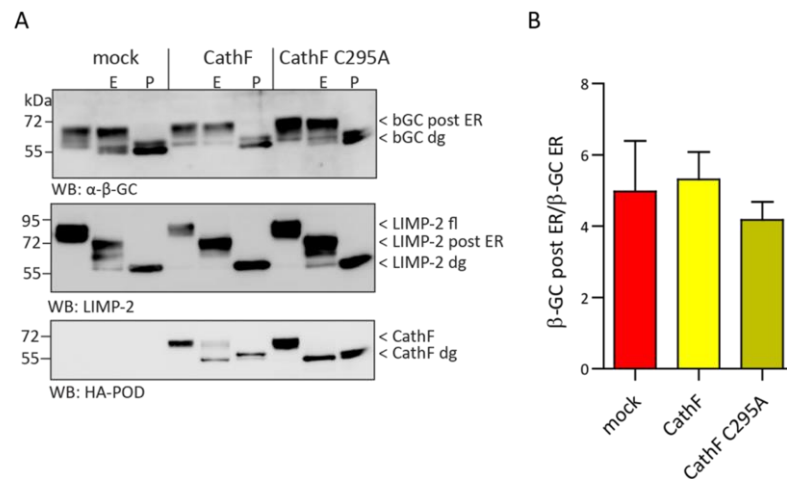


**Abb. 63 Koimmunpräzipitation von LIMP-2 mit  $\beta$ -GC in Abhängigkeit der CathF-Überexpression.** N2a-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und nach 48h geerntet. Die Lysate wurden gegen myc (LIMP-2) präzipitiert und die Lysatkontrollen und Präzipitate mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die Proteine wurden mit  $\alpha$ - $\beta$ -GC (8E4),  $\alpha$ -myc bzw.  $\alpha$ -HA-POD Antikörpern sichtbar gemacht. Zur Auswertung wurde die Bandenintensität der IP (LIMP-2) mit der Bandenintensität der CoIP ( $\beta$ -GC) in Abhängigkeit der Überexpression von Cathepsin F verglichen und die Daten mittels Prism Software ausgewertet. Fehlerbalken werden als  $\pm$ SEM gezeigt. N=3.  $\beta$ -GC kann unabhängig von einer Cathepsin F Überexpression mit LIMP-2 kopräzipitiert werden.

Auch wenn Cathepsin F Überexpression die Interaktion von LIMP-2 und  $\beta$ -GC nicht vermindert, wurde anschließend mittels EndoH/PNGaseF-Verdau untersucht, ob  $\beta$ -GC nach Cathepsin F Überexpression weiterhin in post-ER bzw. in lysosomalen Strukturen zu finden ist. Hierfür wurden N2a-Zellen mit Cathepsin F aktiv und inaktiv (C295A) transfiziert. Anschließend wurden die Lysate mit EndoH (E) bzw. PNGaseF (P) verdaut. Danach wurde



endogenes  $\beta$ -GC mittels Western Blot detektiert. Hierbei zeigte sich in allen Proben, dass nach dem EndoH Verdau vergleichbare Mengen der post-ER Form von  $\beta$ -GC zu detektieren sind und das Protein nicht EndoH sensitiv ist (Abb. 64A). Als Kontrolle dient ein PNGaseF-Verdau, der die Größe des deglykosilierten  $\beta$ -GC-Proteins anzeigt. Die Ergebnisse zeigen, dass mittels EndoH-Verdau keine  $\beta$ -GC-Retention im ER in Abhängigkeit von Cathepsin F detektiert werden kann (Abb. 64B).



**Abb. 64 Retention von  $\beta$ -GC im ER in Abhängigkeit der CathF-Überexpression in N2a Zellen.** A) N2a Zellen wurden mit Cathepsin F oder Cathepsin F-C295A transfiziert. Die Lysate wurden anschließend mit EndoH (E) oder PNGaseF (P) verdaut und mittels SDS-PAGE und Western Blotting untersucht. B) Die entsprechende Bandenintensität wurde mittels ImageJ ermittelt und die Daten mit Hilfe der GraphPad Prism Software und ANOVA mit anschließendem Tukey's post hoc ausgewertet. N=3. Fehlerbalken werden als  $\pm$ SEM angegeben. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied der ER Retention von  $\beta$ -GC in Abhängigkeit einer Cathepsin F Überexpression.

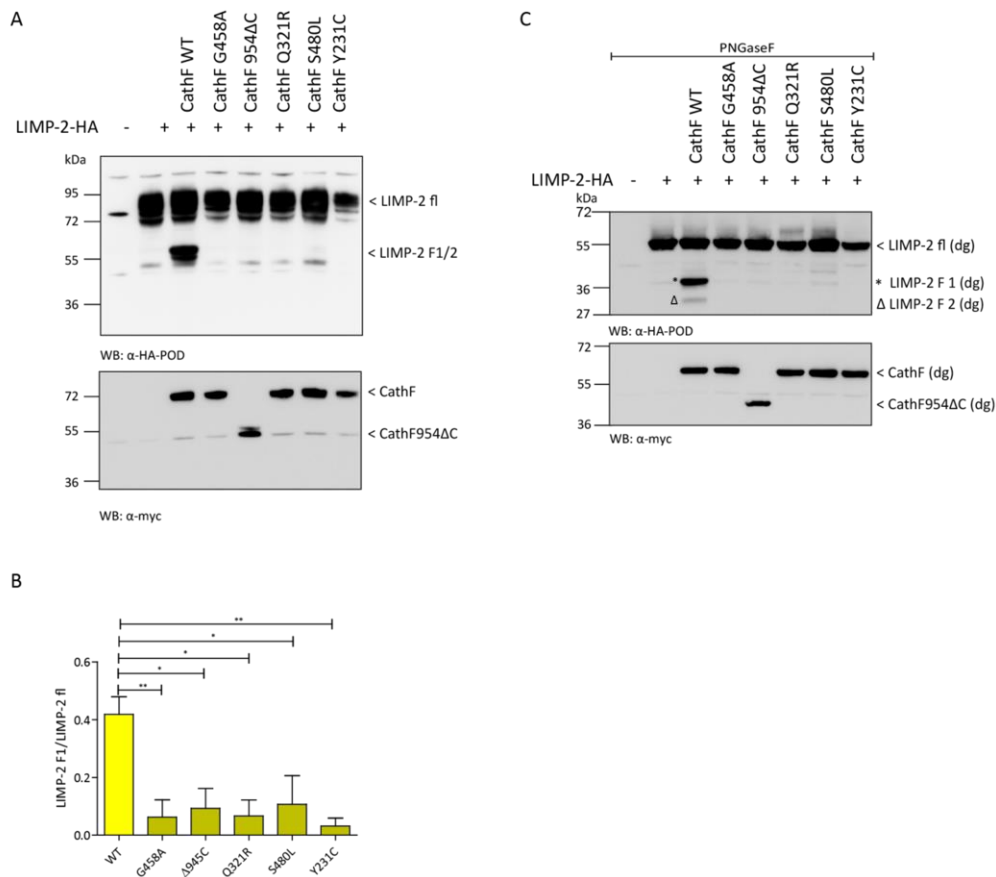
Somit kann zwar gezeigt werden, dass  $\beta$ -GC Überexpression die Spaltung von LIMP-2 durch Cathepsin F reduziert, Cathepsin F hat allerdings keinen Einfluss auf die Lokalisation von  $\beta$ -GC oder die Bindung von LIMP-2 und  $\beta$ -GC.

### 6.4.3 Funktionelle Analysen von Kufs-Erkrankung assoziierten Cathepsin F-Mutanten

Mutationen in Cathepsin F werden mit der Type-B-Kufs-Erkrankung assoziiert. Da bis jetzt kein *in vivo* Substrat von Cathepsin F bekannt war, konnte die Funktionalität der Mutanten nicht getestet werden (Smith et al. 2013). In dieser Arbeit wurde die Funktionalität der Mutanten verifiziert. Hierzu wurden die Type-B-Kufs-Erkrankung assoziierten Mutanten von Cathepsin F zunächst in HEK-Zellen zusammen mit Wildtyp LIMP-2 überexprimiert und analysiert. Es zeigte sich, dass die Menge an generiertem Spaltprodukt durch die Cathepsin F Mutanten signifikant reduziert war im Vergleich zum Wildtyp Cathepsin F (Abb. 65A/B). Um die beiden Spaltfragmente genauer zu untersuchen, wurde das Experiment wiederholt und die Lysate vor der Analyse mittels PNGaseF verdaut (Abb. 65C). Hierbei waren nach der Expression des Wildtyp Cathepsin F - wie bereits vorher gezeigt - die beiden LIMP-2

Spaltfragmente zu detektieren. Die Spaltfragmente waren in den Lysaten, in denen die Kufs-Erkrankung assoziierten Mutanten exprimiert wurden, nicht zu sehen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Überexpression der Kufs-Erkrankung assoziierten Cathepsin F Mutanten zu einer signifikant reduzierten Spaltung von LIMP-2 im Vergleich zu Wildtyp Cathepsin F führt – die Mutanten also keine enzymatische Aktivität in den durchgeführten Versuchen zeigten.



**Abb. 65 Analyse der LIMP-2 Spaltung durch Typ-B-Kufs-Erkrankung assoziierte Cathepsin F Mutanten.** A) HEK Zellen wurden mit LIMP-2-HA und den angegebenen *myc-getaggten* Kufs Erkrankung assoziierten Cathepsin F Mutanten transfiziert. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert und die Proteine durch spezifische Antikörperfärbung mittels myc- und HA-POD Antikörpers sichtbar gemacht. B) In den resultierenden Blots wurde dann die Menge an LIMP-2fl (full length) und LIMP-2 Fragment wurde mittels ImageJ ermittelt und die Menge an Fragment durch die Menge an LIMP-2fl dividiert. Die Daten wurden mittels GraphPad Prism Software und ANOVA mit anschließendem Tukey's post hoc ausgewertet. N=3. Fehlerbalken werden als  $\pm$ SEM angegeben; \*p < 0,05; \*\*p < 0,01. Blots zur statistischen Auswertung wurden teilweise von R. Weisner erstellt. C) Zelllysate wurden wie in A hergestellt und anschließend mit PNGaseF verdaut. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot aufgetrennt und gegen myc bzw. HA-POD gefärbt. Es sind LIMP-2 full length (fl) und die beiden Fragmente zu detektieren. Dg = deglykosiliert.

## 6.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

- LIMP-2 Dimer:** Es konnte gezeigt werden, dass LIMP-2 Dimere bilden kann. Mutationen in der Ligandenbinderegion oder den Transmembrandomänen konnte die Dimerisierung nicht verhindern, was auf mehrere Interaktionsstellen und eine sehr stabile Dimerisierung schließen lässt.
- LIMP-2/PRAF2:** PRAF2 konnte als 19kDa großes Transmembranprotein identifiziert werden, das in neuronalen Zellen mit LIMP-2 kopräzipitiert werden kann. LIMP-2 hat keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation oder das Proteinlevel des PRAF2-Proteins.
- LIMP-2/VAMP-2:** VAMP-2 kann mit LIMP-2 sowohl in Überexpression als auch endogen in Gehirnlisaten kopräzipitiert werden. LIMP-2 hat andererseits keinen offensichtlichen Effekt auf die Expression oder Lokalisation von VAMP-2. Initiale funktionelle Untersuchungen konnten LIMP-2 an neuronalen Synapsen detektieren und deuten darauf hin, dass synaptische Vesikel in LIMP-2 defizienten Synapsen akkumulieren.
- LIMP-2/PRR:** LIMP-2 und der PRR können miteinander kopräzipitiert werden. LIMP-2 hat allerdings keinen Einfluss auf die Expression oder Lokalisation des PRR *in vivo*. Es konnte gezeigt werden, dass LIMP-2 einen negativen Effekt auf den Wnt-Signalweg hat. Dieser Einfluss scheint zumindest unter Momentaufnahmen unabhängig vom PRR zu sein, obwohl der PRR einen essentiellen Teil des Wnt-Signalweges darstellt.
- LIMP-2 Proteolyse:** In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass LIMP-2 der Proteolyse unterliegt. Dabei konnte Cathepsin F als hauptverantwortliche Protease identifiziert werden, die LIMP-2 in späten Endosomen/Lysosomen spaltet. Die Proteolyse von LIMP-2 findet des Weiteren auch *in vivo* statt. Als Spaltungsstelle konnte die Ligandenbinderegion von LIMP-2 identifiziert werden. Nachdem LIMP-2 als ein neues Substrat von Cathepsin F identifiziert wurde, konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Mutationen in Cathepsin F, die die Kufs-Erkrankung auslösen, nicht in der Lage sind LIMP-2 zu spalten und somit enzymatisch nicht aktiv sind.

## 7 Diskussion

Die Funktion von LIMP-2 als Transporter der lysosomalen Protease  $\beta$ -Glukocerebrosidase ( $\beta$ -GC) vom endoplasmatischen Retikulum (ER) ins Lysosom stellt die am besten untersuchte Funktion von LIMP-2 dar (Reczek et al. 2007). Die eigentliche Funktion von LIMP-2 im Lysosom ist hingegen nicht geklärt. Es ist bekannt, dass Mutationen in LIMP-2 zum *Action-myoclonus and renal failure* Syndrom führen (Berkovic et al. 2008). Die Symptome der Erkrankung unterscheiden sich von den Symptomen, die Morbus-Gaucher-Patienten zeigen, die keine oder inaktive  $\beta$ -GC besitzen (Guggenbuhl et al. 2008). Dies legt nahe, dass LIMP-2 neben dem Transport von  $\beta$ -GC noch weitere essentielle und bis jetzt unbekannte Funktionen in der Zelle besitzt. Die Identifikation neuer Interaktionspartner und die Charakterisierung von Proteinen, die die Funktion von LIMP-2 modulieren könnten, sind unter anderen wichtig für das Verständnis, wie eine Defizienz in LIMP-2 zu dem Krankheitsbild des AMRF-Syndroms beitragen kann.

Funktionen von Proteinen sind häufig abhängig von Interaktionspartnern, mit denen sie interagieren können oder von denen sie beeinflusst werden. Aufgrund dessen kann die Identifikation und Charakterisierung dieser Interaktion zur Aufklärung der Funktion einzelner Proteine beitragen. Dabei kann zwischen permanenter und reversibler/ transienter Interaktion unterschieden werden. Erstere ist vor allem bei komplexen Makromolekülen zu finden, die einen dauerhaften Proteinverbund bilden. Transiente Interaktionen finden zwischen den verschiedensten Proteinen, Transportern, Kinasen, Proteasen oder Kanälen statt und sind nur auf kurze Perioden beschränkt (Ozbabacan et al. 2011).

In dieser Arbeit konnten auf unterschiedlichen Wegen vier potenzielle Interaktionspartner von LIMP-2 identifiziert und deren Interaktion charakterisiert werden, was als Grundlage für die weitere funktionelle Charakterisierung von LIMP-2 dienen kann.

## 7.1 Potenzielle Funktionen von LIMP-2 als Multimer

Eine Vielzahl von Proteinen können ihre Funktion erst durch die Di- oder Multimerisierung ausführen (Marianayagam et al. 2004). Die Analyse der Kristallstruktur von LIMP-2 (Neculai et al. 2013) zeigte, dass LIMP-2 eine Interaktion mit sich selbst eingeht und Dimere formen kann. Zur Untersuchung der Funktion der Dimerisierung wurde versucht Mutanten von LIMP-2 herzustellen, die keine Dimerisierung mehr eingehen können. Dabei wurden die helikale Ligandenbinderegion und die Transmembrandomänen als Interaktionsstellen untersucht, da die Kristallstruktur von LIMP-2 nahelegte, dass potentielle LIMP-2 Dimere über die Ligandenbinderegion interagieren können (Neculai et al. 2013). Für SR-BI als Familienmitglied von LIMP-2 wurde wiederum gezeigt, dass es über die Transmembrandomänen dimerisiert (Gaidukov et al. 2011). Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigten allerdings, dass sich die Interaktion selbst durch die Insertion mehrerer Mutationen und großer Deletionen nicht unterdrücken ließ. Dies kann entweder darauf hindeuten, dass der gewählte Assay (Koimmunpräzipitation) nicht selektiv genug zur Identifikation von Mutanten ist, die keine Dimerisierung mehr eingehen oder, dass LIMP-2 einen sehr stabilen und dementsprechend eventuell auch funktionellen Dimer bildet.

Die Dimerisierung von Proteinen kann wichtig für verschiedene biologische Funktionen sein. Di- oder Multimerisierungen finden sich auch häufig bei Proteinen, die Poren oder Kanäle bilden und dadurch Moleküle über eine Membran transportieren (Agre and Kozono 2003; Marianayagam et al. 2004). Es wurde gezeigt, dass die Familienmitglieder von LIMP-2, CD36 und SR-BI, Cholesterol(ester) durch einen Tunnel transportieren können. Dieser Tunnel wurde mittels Kristallstruktur in LIMP-2 entdeckt (Neculai et al. 2013). Der Tunnel kann vom Monomer gebildet werden. Dies deutet nicht daraufhin, dass die Dimerisierung des Proteins wichtig für eine eventuelle Kanalfunktion ist. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass der Transport eines noch nicht bekannten Moleküls durch den Kanal eine Dimerisierung voraussetzt.

Zusätzlich wurde für LIMP-2 gezeigt, dass eine Überexpression des Proteins die Retention einer klinischen  $\beta$ -GC-Mutante im Endoplasmatischen Retikulum aufheben kann (Reczek et al. 2007). Das deutet daraufhin, dass LIMP-2 als Chaperon die Fehlfaltung des  $\beta$ -GC Proteins reguliert und somit die ER-Retention aufhebt. Es ist bekannt, dass Proteine, die als Chaperone fungieren häufig funktionelle Homodimere formen (Jorgensen et al. 2003). Somit könnte die Dimerisierung von LIMP-2 ein weiterer Hinweis auf die Funktion als Chaperon sein.

Auch die Funktion im Transport von  $\beta$ -GC könnte LIMP-2 als Homodimer ausführen. So wurde gezeigt, dass die Stöchiometrie von LIMP-2 und  $\beta$ -GC im Transport 2:2 zu sein scheint

(Reczek et al. 2007). Der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (M6PR), der wichtig für den Transport der meisten lysosomalen Enzyme ist, tritt ebenfalls als Dimer oder Tetramer auf. Dabei wird die Oligomerisierung bei neutralem pH-Wert gegenüber saurem pH-Wert favorisiert (Kornfeld 1992). Da sowohl LIMP-2 als auch die M6PR ihre Liganden bei neutralem pH-Wert binden und die Proteine bei saurem pH-Wert wieder dissoziieren (Braulke and Bonifacino 2009; Zachos et al. 2012), könnte die pH-Wert-abhängige Dimerisierung wichtig für die kontrollierte Bindung und den Transport der Liganden sein.

## 7.2 Identifizierung und Charakterisierung neuer Interaktionspartner von LIMP-2 mittels Affinitätschromatographie

Zur Identifikation von Interaktionspartnern wurden in dieser Arbeit zunächst Proteine untersucht, die in einer Affinitätschromatographie (HEK Screen) mit LIMP-2 direkt interagieren. Bei dieser Suche nach Interaktionspartnern wird davon ausgegangen, dass Proteine, die sich gegenseitig funktionell beeinflussen, auch eine direkte physikalische Interaktion miteinander eingehen. Somit können mit diesem Versuchsansatz Interaktionen, die nur sehr kurze oder lose Interaktionen eingehen, wie es beispielsweise bei Phosphorylierungen und enzymatischen Spaltungen der Fall sein kann (Phizicky and Fields 1995), teilweise nicht nachgewiesen werden. Auch können Interaktionen übersehen werden, die zellspezifisch oder pH-Wert-abhängig vorkommen.

In dieser Arbeit wurden zunächst Interaktionspartner von LIMP-2 aus einer Affinitätschromatographie untersucht, die in HEK-Zellen durchgeführt wurde. Die identifizierten potenziellen Interaktionspartner wurden mittels zweier Interaktionsscores (comPASS (Coon OMSSA Proteomic Analysis Software Suite) und MiST (Mass Spectrometry Interaction Statistics) Score) eingeteilt (Jager et al. 2011; Jager et al. 2012; Jager et al. 2012). Dabei korreliert die Höhe des Scores mit der Wahrscheinlichkeit, dass es sich um spezifische Interaktionen handelt.  $\beta$ -GC wurde in diesem Screen als der Interaktionspartner mit der höchsten Wahrscheinlichkeit identifiziert, was den Erfolg der Methode unterstrich. Nach der Analyse der potenziellen Interaktionspartner dieses Screens wurde entschieden die Interaktion von LIMP-2 mit VAMP-2 und PRAF2 näher zu untersuchen.

### 7.2.1 PRAF2 und LIMP-2: Mögliche Interaktionspartner in neuronalen Zellen

PRAF2 wurde als potenzieller Interaktionspartner von LIMP-2 im HEK-Screen identifiziert. Die Versuche zeigten, dass es sich dabei um ein circa 19kDa großes Transmembranprotein handelt. Zusätzlich wurde die Proteinexpression von PRAF2 in verschiedenen murinen Geweben untersucht. Hierbei zeigte sich eine sehr geringe Expression im Herzen, geringe Expression in Milz, Leber und Nieren und hohe Expression im Gehirn, was vergleichbar mit der bereits untersuchten Proteinexpression von PRAF2 in humanen Geweben ist (Fo et al. 2006). Das Protein ist zum einen in ER lokalisiert und zum anderen in nicht näher zu charakterisierenden kleinen Vesikeln. Auch wenn die Vesikel weder dem Golgi noch frühen oder sauren Endosomen zugeordnet werden konnten, wiesen bereits andere Arbeitsgruppen eine Lokalisation von PRAF2 in kleinen Vesikeln innerhalb der Zelle nach (Geerts et al. 2007; Borsics et al. 2010). Für die Familienmitglieder PRAF1 (PRA1/prenylin) und PRAF3

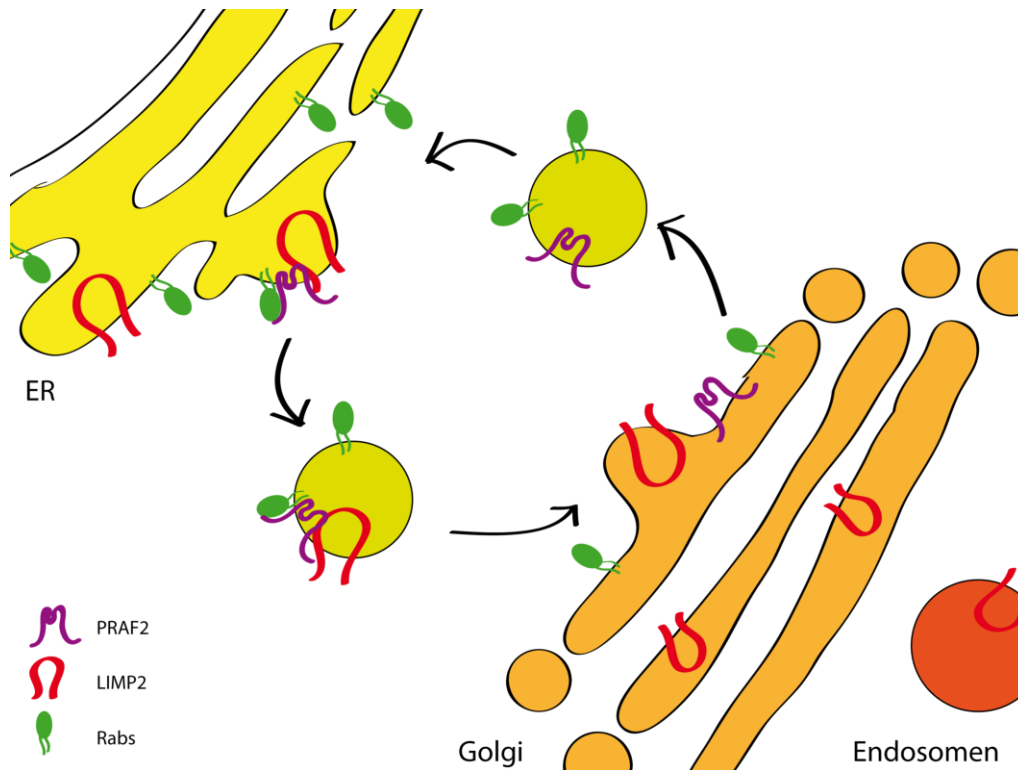
(JWA/ GTRAP3-18/ ARL6IP5) wurden teilweise ähnliche Lokalisationen gezeigt. So ist PRAF1 vor allem im Golgi-Apparat, post-Golgi-Vesikeln, *lipid rafts*, Endosomen und an der Plasmamembran beschrieben (Compton and Behrend 2006). PRAF3 ist als ER- und Golgi-Protein diskutiert (Ruggiero et al. 2008). Weitere Kollokalisationsstudien von PRAF2, die auch die Untersuchung von *lipid rafts* und Transportvesikeln der Endozytose und des subzellulären Proteintransports (COPI und COPII Vesikel) einschließen, könnten Aufschluss über die Lokalisation des Proteins liefern.

Diese Kollokalisations-Ergebnisse deuten darauf hin, dass PRAF2 und LIMP-2 vermutlich nicht im Lysosom direkt miteinander interagieren und dort funktionell aktiv sind. Trotzdem konnten Koimmunpräzipitationen in neuronalen Zellen zeigen, dass die beiden Proteine bereits im ER miteinander interagieren können. LIMP-2 hatte keinen direkten Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation oder die Proteinexpression von PRAF2. Da keine PRAF2-defizienten Mäuse oder Zellen verfügbar waren, konnte nicht überprüft werden, ob LIMP-2 und seine Lokalisation und Expression durch PRAF2 beeinflusst wird.

Da die Funktion von PRAF2 größtenteils unbekannt ist, könnten Studien zu PRAF1 und PRAF3 Hinweise auf eine potenzielle Funktion der Interaktion von LIMP-2 und PRAF2 im ER liefern: Alle drei Proteine gehören zur *prenylated Rab acceptor 1 domain family* (Fo et al. 2006). Dies deutet darauf hin, dass die Proteine in der Lage sind prenylierte Rab (*Ras-related in brain*)-Proteine zu binden. Rabs sind kleine GTPasen, die je nach Aktivitätszustand GTP (Guanosintriphosphat, aktiv) oder GDP (Guanosindiphosphat, inaktiv) binden (Pereira-Leal und Seabra 2000). Sie sind über einen Prenylrest an ihrer spezifischen Membran in der Zelle verankert (Iakovenko et al. 2000). Jedes Organell oder Vesikel in der Membran besitzt eine spezifische Rab-Proteinkomposition. Somit kontrollieren Rabs den Vesikeltransport zwischen verschiedensten Membranen in der Zelle (Bhuin and Roy 2014). Dafür rekrutieren Rabs sogenannte Rab-Effektor-Proteine (Hutagalung and Novick 2011). Für PRAF1 wurde bereits gezeigt, dass es mit Rab1 (ER-assoziiert) und Rab3A (Synaptische Vesikel-assoziiert) interagiert (Martincic et al. 1997). Vor allem die Funktion im Transport der Vesikel vom ER zum Golgi, und somit der Transport der entsprechenden in den Vesikeln verpackten Proteine, ist für PRAF-Proteine beschrieben (Lin et al. 2001; Ruggiero et al. 2008). Auch LIMP-2 wird über diesen Weg vom ER in den Golgi und letztendlich in Endosomen transportiert (Braulke and Bonifacino 2009). In dem Zusammenhang wäre es denkbar, dass PRAF2 den spezifischen Transport von LIMP-2 vom ER in den Golgi kontrolliert. Hierbei könnte PRAF2 als Effektor mit den entsprechenden Rabs (Rab 1, 2 oder 18) im ER interagieren und somit LIMP-2 spezifisch in Transportvesikeln aus dem ER transportieren (Abb. 66). Dies würde auch



erklären, warum LIMP-2 keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von PRAF2 besitzt, wie es in dieser Arbeit gezeigt werden konnte: In diesem Fall wäre die Lokalisation von LIMP-2 abhängig von PRAF2 und nicht umgekehrt.



**Abb. 66 Potenzielle Funktion von PRAF2 im Transport von LIMP-2 vom ER in den Golgi Apparat (Golgi).** ER assoziierte Rab Proteine sind mittels Prenylrest an der Membran verankert. PRAF2 kann als Rab-Effektor mit den Rabs interagieren. Zusätzlich geht PRAF2 eine Interaktion mit LIMP-2 ein. Die Rabs und PRAF2 regulieren den Transport der Vesikel vom ER zum Golgi. Dabei könnte LIMP-2 zum Golgi transportiert werden. PRAF2 und die Rabs könnten anschließend zum ER recycelt werden. LIMP-2 wird weiter durch den Golgi zu frühen Endosomen transportiert.

Wie bereits beschrieben wäre neben der Interaktion von LIMP-2 und PRAF2 im ER auch eine zellspezifische Interaktionen in neuronalen Zellen denkbar.

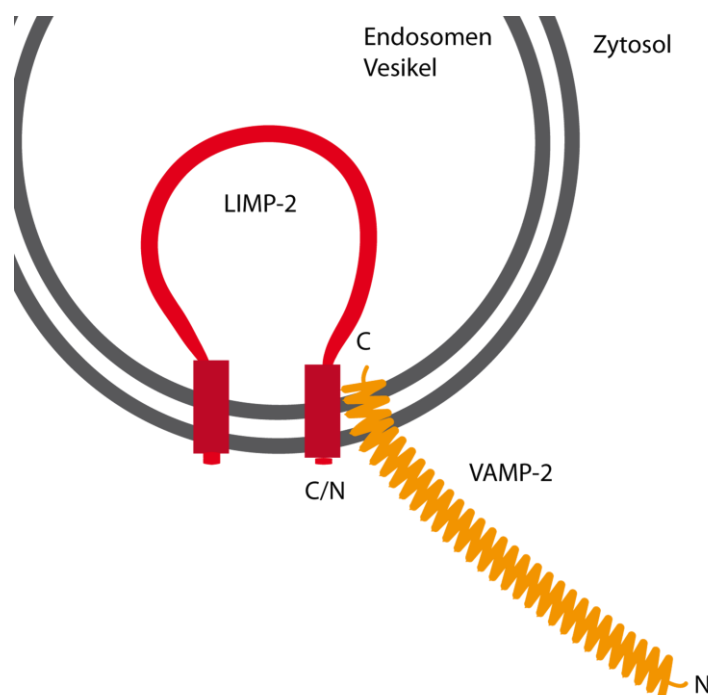
Die Funktion von PRAF2 in Neuronen ist nicht bekannt, allerdings zeigen verschiedene Studien, dass PRAF2 oder seine Familienmitglieder eine wichtige Rolle im Gehirn spielen. PRAF2 ist vor allem dafür bekannt eine erhöhte Expression in Tumoren aufzuweisen (Borsics et al. 2010). Dazu gehören vor allem auch Neuroblastome als häufige Tumorerkrankung im Gehirn (Geerts et al. 2007). Dabei wird diskutiert, ob PRAF2 wichtig für die Kontrolle der Apoptose und Zellteilung in diesen Geweben ist, da die Herunterregulation von PRAF2 in Tumorzellen in Zellkulturexperimenten das Zellüberleben, die Zellmigration und Invasivität reduzierte (Borsics et al. 2010; Vento et al. 2010; Yco et al. 2013). LIMP-2 wurde noch nicht mit der Entstehung oder dem Verlauf von Krebserkrankungen in Verbindung gebracht. Allerdings ist es bekannt, dass Lysosomen allgemein eine Rolle in Tumoren spielen können. Das zeigt sich daran, dass in Tumorgewebe eine erhöhte Expression lysosomaler Enzyme detek-

tiert werden kann und eine verminderte Sensitivität gegenüber lysosomaler Permeabilisierung, die normalerweise Apoptose induziert, vorherrscht (Kroemer and Jaattela 2005). Inwiefern LIMP-2 und PRAF2 in diesem Prozess eine Rolle spielen könnten, bleibt offen.

## 7.2.2 Validierung von VAMP-2 als potenzieller Interaktionspartner von LIMP-2

### 7.2.2.1 Die Transmembrandomänen sind essentiell für die Interaktion von LIMP-2 und VAMP-2

VAMP-2 ist ein Protein, das als SNARE-Protein wichtig für die neuronale Reizweiterleitung ist. Auch dieses Protein konnte in der Affinitätschromatographie mit LIMP-2 präzipitiert werden. Die Interaktion der beiden Proteine konnte in dieser Arbeit mittels Koimmunpräzipitationen bestätigt werden. Hierbei zeigte sich, dass die beiden Proteine über die Transmembrandomänen von LIMP-2 interagieren, wobei nicht verifiziert wurde, welche Transmembrandomäne von LIMP-2 die entscheidende ist. Da es sich bei VAMP-2 um ein Transmembranprotein handelt, das lediglich einen sehr kleinen luminalen Teil aufweist, und seine große SNARE-Domäne in Zytosol lokalisiert ist, war die Interaktion über die Transmembrandomänen der Proteine die wahrscheinlichste (Abb. 67).



**Abb. 67 Schematische Darstellung der Interaktionsstelle von LIMP-2 und VAMP-2.** LIMP-2 und VAMP-2 interagieren über die Transmembrandomänen von LIMP-2 miteinander. Dabei ist nicht geklärt, ob die Interaktion über die N – oder C-terminale Transmembrandomäne von LIMP-2 stattfindet.

### 7.2.2.3 Potenzielle funktionelle Bedeutung von LIMP-2 und VAMP-2 in der neuronalen Reizweiterleitung

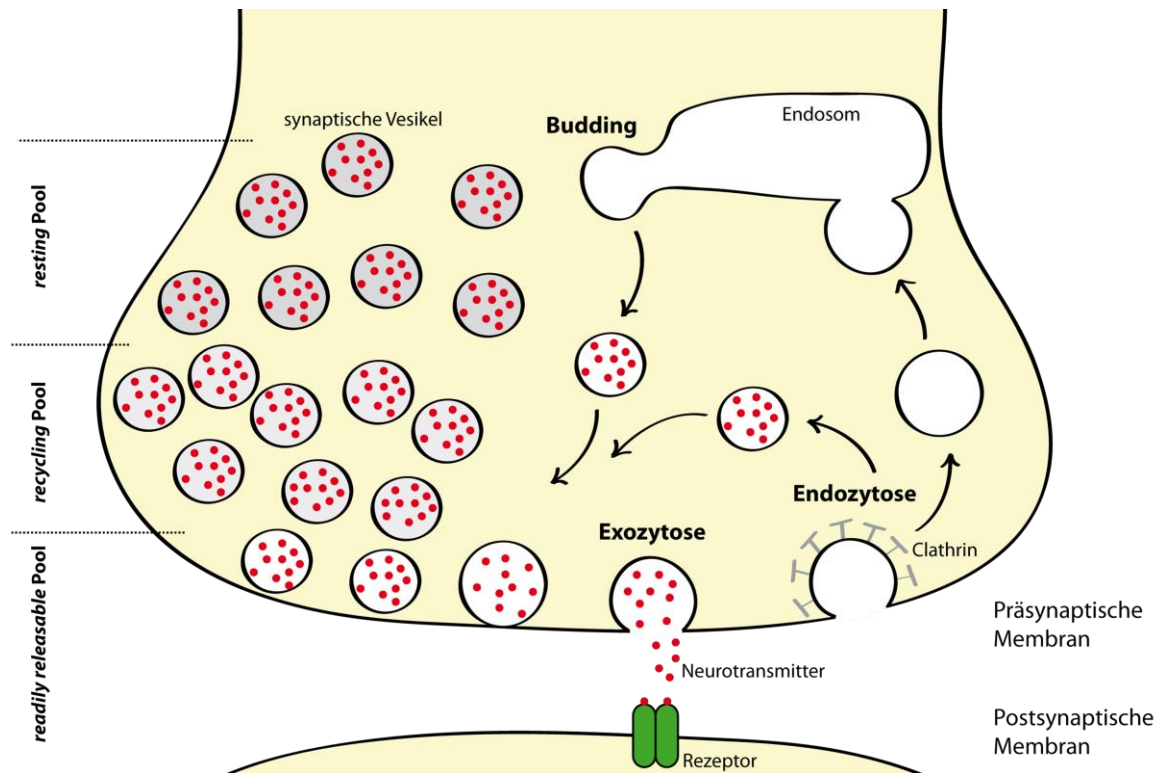
VAMP-2 ist in Neuronen wichtig für die Ausschüttung von Neurotransmittern an der Synapse. VAMP-2-defiziente Mäuse zeigten allerdings keinen ernsthaften neurologischen Phänotyp, auch wenn die Mäuse kurz nach der Geburt sterben (Schoch et al. 2001). Die Transmitterausschüttung war in den VAMP-2-defizienten Neuronen weiterhin möglich, wenn auch verlangsamt. Somit scheint VAMP-2 eher wichtig für die schnelle Vesikelfusion und Transmitterausschüttung zu sein, aber nicht essenziell für die Fusion und Neurotransmitterausschüttung an sich (Deak et al. 2004).

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass LIMP-2, aber auch LAMP-2, mit VAMP-2 interagiert und zumindest LIMP-2 in angereicherten Synapsen detektiert werden konnte, zeigten initiale elektronenmikroskopische Befunde eine leichte Akkumulation von synaptischen Vesikeln in LIMP-2-defizienten Synapsen. VAMP-2-defiziente Synapsen zeigen wiederum keinen Anstieg in der Zahl der synaptischen Vesikel, allerdings sind die synaptischen Vesikel größer und unförmiger (Deak et al. 2004). Quantitative Untersuchungen von LIMP-2-defizienten Neuronen sollten in Zukunft klären, ob die Anzahl der synaptischen Vesikel tatsächlich erhöht ist oder ob eine Vergrößerung des Vesikeldurchmessers der synaptischen Vesikel vorliegt und die synaptischen Vesikel dadurch dichter gepackt zu sein scheinen. Dies würde dann den VAMP-2-defizienten Neuronen gleichen.

Diese Untersuchungen sollten auch die Charakterisierung der synaptischen Vesikel einschließen. Grundsätzlich kann dabei mittels elektronenmikroskopischen Aufnahmen zwischen drei Gruppen (*Pools*) von synaptischen Vesikeln unterschieden werden (Abb. 68). Zum *readily releasable pool* gehören Vesikel, die bereits an der synaptischen Membran angelagert sind und für die schnelle Neurotransmitterausschüttung wichtig sind. Ist dieser *pool* erschöpft, können Vesikel des *recycling pools* an die Membran fusionieren und weitere Neurotransmitter freisetzen. Die dritte Gruppe beinhaltet die Vesikel des *resting pools*, der interessanterweise Vesikel beinhaltet, die auch nach langanhaltender Neuronenstimulation keine Neurotransmitterausschüttung vollziehen und deren physiologische Bedeutung noch nicht geklärt ist (Alabi and Tsien 2012).

Veränderungen der Neurotransmitterausschüttung können unter anderem Epilepsie und Ataxie zur Folge haben (Casillas-Espinosa et al. 2012). Für VAMP-2 wurde gezeigt, dass die Reduktion dieses Proteins die Entstehung von Epilepsien verringert (Matveeva et al. 2012). Mutationen in LIMP-2 führen im Menschen ebenfalls zu einer Form der Epilepsie und Ataxie. Das konnte auch bei LIMP-2-defizienten Mäusen beobachtet werden (Gamp et al. 2003;

Berkovic et al. 2008). Somit wäre die Untersuchung der Neurotransmitterausschüttung in Abhängigkeit von LIMP-2 durchaus impliziert.



**Abb. 68 Schematische Darstellung der Fusion und des Recycling der synaptischen Vesikel an der Präsynaptischen Membran.** Adaptiert nach Gundelfinger et al. 2003, Alabi and Tsien 2012. Synaptische Vesikel können in drei Pools eingeteilt werden, je nachdem ob sie direkt (*readily releasable*), verzögert (*recycling*) oder auch nicht nach längerer Stimulation (*resting*) exozytiert werden. Nach der Exozytose der Neurotransmitter werden mittels Clathrin-vermittelter Endozytose neue synaptische Vesikel generiert, die entweder direkt mit neuen Neurotransmittern beladen werden oder mit Endosomen fusionieren. Danach entstehen dann durch Abknospung (*Budding*) neue synaptische Vesikel des *readily releasable* Pools.

Die Fusion der synaptischen Vesikel mit der Membran zur Neurotransmitterausschüttung macht das anschließende Recycling der Vesikel notwendig (Abb. 68). Hierbei konnte bereits gezeigt werden, dass VAMP-2 wichtig für diesen Vorgang ist (Deak et al. 2004). Es wurde außerdem gezeigt, dass bei diesem Prozess die Clathrin-vermittelte Endozytose eine Rolle spielt, um durch Invagination der Plasmamembran neue synaptische Vesikel zu formen (Jung and Haucke 2007). Die so neu entstanden synaptischen Vesikel können dann direkt mit neuen Neurotransmittern befüllt werden oder mit Endosomen fusionieren (Gundelfinger et al. 2003). Nach der Fusion der synaptischen Vesikel mit Endosomen, entstehen neue synaptische Vesikel durch Abknospung (*Budding*) von den Endosomen. In diesen Endosomen wäre es möglich, dass VAMP-2 mit LIMP-2 als endosomales Protein in Kontakt tritt.

### 7.3 LIMP-2 und der Prorenin Rezeptor: Mögliche Interaktionspartner im Wnt-Signalweg

Zur Identifikation von Interaktionspartnern wurde neben der beschriebenen Affinitätschromatographie in HEK-Zellen bereits in vorangegangenen Arbeiten ein sogenannter Yeast-Two-Hybrid Screen durchgeführt. Dieser basiert auf der Annahme, dass sich potenzielle Interaktionspartner in der Zelle auch in räumlicher Nähe befinden und somit identifiziert werden können. Je ein Teil eines Ubiquitin-Proteins ist an LIMP-2 bzw. an die potentiellen Interaktionspartner fusioniert. Erst wenn die Proteine in räumliche Nähe kommen, wird das Ubiquitin prozessiert und ein ebenfalls fusionierter Transkriptionsfaktor kann aktiv und die entsprechenden Zellen und somit die Interaktionspartner identifiziert werden (Johnsson and Varshavsky 1994). In diesem Screen wurde der Prorenin Rezeptor als potenzieller Interaktionspartner identifiziert (Oelbe 2012).

In dieser Arbeit konnte die Interaktion mittels Koimmunpräzipitationen verifiziert werden. Der PRR stellte einen vielversprechenden Interaktionspartner dar, da sowohl LIMP-2 als auch der PRR im Zusammenhang mit Nieren-assoziierten Symptomen/ Phänotypen beschrieben worden sind (Berkovic et al. 2008, Ichihara et al. 2006; Kaneshiro et al. 2007). Die renalen Symptome, die Patienten mit LIMP-2-Mutationen zeigen, sind wahrscheinlich unabhängig von einer LIMP-2-Funktion als Transporter von  $\beta$ -GC, da Gaucher-Patienten, die Mutationen im  $\beta$ -GC-Gen besitzen, nur sehr selten Nieren-assoziierte Symptome aufweisen (Santoro et al. 2002).

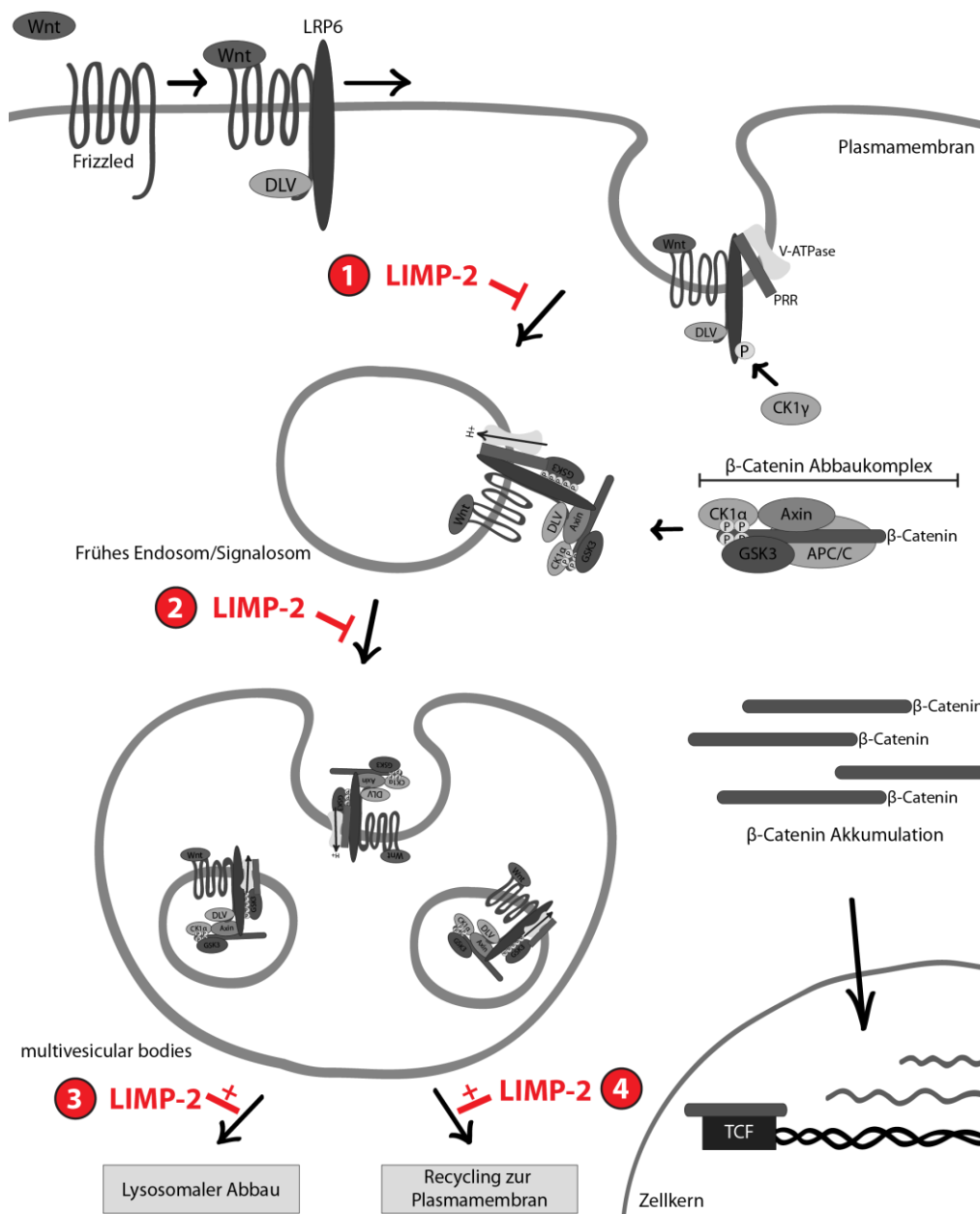
Mutationen in LIMP-2 führen im Menschen zu einer Glomerulosklerose (Berkovic et al. 2008). Dabei handelt es sich um eine Gruppe von Erkrankungen der Niere, bei der Vernarbungen in den Glomeruli identifiziert werden können (Thomas 2009). Glomeruli sind essentiell für die Bildung des Primärharns und bilden außerdem die Blut-Harn-Schranke. Dies kann ein Grund dafür sein, dass AMRF-Patienten und LIMP-2-defiziente Mäuse eine Proteinurie aufweisen, da die Filtration des Harns nicht mehr gewährleistet ist (Gamp et al. 2003; Berkovic et al. 2008). Für den PRR wurde gezeigt, dass die Inhibition des Rezeptors die Entwicklung einer induzierten Glomerulosklerose verlangsamen oder sogar verhindern kann (Ichihara et al. 2006; Kaneshiro et al. 2007).

Sowohl der PRR als auch LIMP-2 sind in den Glomeruli der Niere exprimiert (Lee et al. 2012). Der PRR ist vor allem als Teil des Renin-Angiotensin-Systems in der Niere beschrieben (Oshima et al. 2011). Renin als Ligand für den PRR wird in den Glomeruli vom juxtaglomerulären Apparat sezerniert, nachdem es zunächst in Vesikeln akkumuliert, die ebenfalls LIMP-2 in ihrer Membran aufweisen (Lee et al. 2012). Allerdings konnten

Untersuchungen an LIMP-2-defizienten Mäusen nicht zeigen, dass LIMP-2 die Sekretion oder das Renin-Angiotensin-System im Allgemeinen beeinflusst (Schmid et al. 2013). Aufgrund dessen wurde das Augenmerk in dieser Arbeit nicht auf die Funktion von LIMP-2 und dem PRR im Renin-Angiotensin-System, sondern auf eine potenzielle Funktion im Wnt-Signalweg gelegt, in dem der PRR als Teil der v-ATPase wichtig für die Azidifizierung intrazellulärer Vesikel ist (Oshima et al. 2011).

In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass LIMP-2 einen potenziell negativen Effekt auf den Wnt-Signalweg besitzt. Es konnte allerdings nicht gezeigt werden, dass LIMP-2 den PRR so beeinflusst, dass dies der Grund für den Einfluss auf den Wnt-Signalweg sein könnte. So war zumindest unter Momentanbedingungen weder die Lokalisation noch die Spaltung des PRR durch LIMP-2 beeinflusst. Aufgrund dessen war nicht nachzuweisen, ob der negative Einfluss, den LIMP-2 auf den Wnt-Signalweg hat, auf eine Interaktion der beiden Proteine zurückzuführen ist. Allerdings konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Proteine des Lysosoms wie LIMP-2 generell einen Einfluss auf den Wnt-Signalweg zu haben scheinen.

Da der negative Effekt, den LIMP-2 auf den Signalweg hat, erst nach der Wnt-Stimulation zu erkennen war, ist nicht davon auszugehen, dass LIMP-2 ohne Stimuli den Signalweg beeinflusst, sondern direkt an den Abläufen, die nach einer Stimulation induziert werden, beteiligt ist. Es ist bekannt, dass nach der Bindung von Wnt3a an den Frizzled-Rezeptor das LRP6-Protein an Frizzled bindet (Abb. 69). Die Proteine werden dann in Signalosomen internalisiert, wobei LRP6 phosphoryliert wird. Dies führt zur Bindung des  $\beta$ -Catenin-Degradationskomplexes an LRP6. Der komplette Wnt-Komplex wird dann in die intrazellulären Vesikel der *multivesicular bodies* (MVB) aufgenommen. Dies führt dazu, dass neu synthetisiertes  $\beta$ -Catenin als Transkriptionsfaktor wirken kann und Wnt-abhängige Zielgene exprimiert werden (Sihn et al. 2010; Dobrowolski and De Robertis 2012).



**Abb. 69: Schematische Darstellung des Wnt-Signalweges (adaptiert von Dobrowolski und De Robertis (2012) und Sihm et al. (2010)).** LIMP-2 könnte auf verschiedenen Wegen den Wnt-Signalweg negativ beeinflussen. LIMP-2 könnte die Internalisierung des Wnt-Komplexes oder die Bildung der Signalosomen negativ beeinflussen (1). Außerdem könnte LIMP-2 die Bildung der intraluminalen Vesikel der *multivesicular bodies* reduzieren (2). Ein positiver Einfluss auf die Fusion von *multivesicular bodies* mit Lysosomen (3) oder das Recycling des Wnt-Komplexes (4) durch LIMP-2 würde ebenfalls zu reduziertem Wnt-Signaling führen.

Hierbei wäre es möglich, dass LIMP-2 einen negativen Effekt auf die Bildung der Signalosomen hat (Abb. 69.1). Es hat sich gezeigt, dass für die Bildung der Signalosomen die Endozytose ein essentieller Faktor ist. Die Herunterregulation von Dynamin oder Rab5 reduziert die Aktivität des Wnt-Signalweges. Beides sind Faktoren für die Clathrin-abhängige Endozytose, die dementsprechend wichtig für die Induktion des Wnt-Signalweges zu sein scheint (Blitzer

and Nusse 2006). Zwar ist noch nicht beschrieben, dass LIMP-2 selbst wichtig für die Clathrin-abhängige Endozytose ist, doch konnte bereits gezeigt werden, dass die Überexpression von LIMP-2 zu vergrößerten Endosomen, die den Charakter früher Endosomen haben, führt und dass dieser Prozess abhängig von Rab5 ist (Kuronita et al. 2002). So ist es durchaus möglich, dass die Überexpression von LIMP-2 dazu führt, dass die Komponenten des Wnt-Signalweges in frühen Endosomen/ Signalosomen verbleiben und nicht in MVB internalisiert werden. Diese Internalisierung ist allerdings essentiell für die weitere Aktivierung des Wnt-Signalweges (Gagliardi et al. 2008). Die Kolo-kalisation von Komponenten des Wnt-Komplexes mit diesen vergrößerten Vesikeln nach LIMP-2-Überexpression in Abhängigkeit einer Wnt-Stimulation könnten Hinweise auf diese mögliche Funktion von LIMP-2 liefern.

Des Weiteren könnte LIMP-2 einen negativen Effekt auf die Formation der intraluminalen Vesikel (ILV) der MVB haben. Denn erst wenn der Wnt-Komplex die ILVs erreicht hat, also keinen Kontakt mehr zum Zytosol besitzt, kann neu synthetisiertes  $\beta$ -Catenin zur Expression Wnt-abhängiger Gene führen (Taelman et al. 2010). Es wurde gezeigt, dass die ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*)-Maschinerie wichtig für diesen Prozess ist. Diese wird aus verschiedenen zytosolischen Proteinen zusammengesetzt und ermöglicht die Invagination der Membran der späten Endosomen und schließlich die Ablösung der Vesikel (Schmidt and Teis 2012). Koimmunpräzipitationen könnten klären, ob LIMP-2 mit diesem Komplex interagieren kann oder ob sich in Zellen, die LIMP-2 überexprimieren, keine ILVs in den MVB finden lassen.

Die Fusion der MVB mit Lysosomen stellt den letzten Schritt in der Degradation des Wnt-Komplexes dar. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass es, wenn dieser Prozess nicht mehr stattfindet und es zu einer Akkumulation von MVB kommt, einen positiven Einfluss auf dem Wnt-Signalweg hat. Auch leichte Funktionsstörungen im Lysosomen, z.B. durch die Verwendung niedriger Dosen von Bafilomycin A1, haben diesen Effekt (Dobrowolski et al. 2012). Führt also die LIMP-2- oder auch LAMP-2-Defizienz zu weniger Fusion von MVB mit Lysosomen, kann dies den positiven Effekt in den defizienten MEFs auf den Wnt-Signalweg erklären. In LAMP-2-defizienten Mäusen wurde bereits gezeigt, dass es zu einer Akkumulation von autophagozytotischen Vesikeln kommt, die Funktionalität von Lysosomen also gestört ist (Tanaka et al. 2000). In dem Zusammenhang wäre es interessant zu beobachten, ob es in LIMP-2- oder LAMP-2-defizienten MEFs zu einer Akkumulation von Proteinen des Wnt-Komplexes in späten Endosomen/ MVB nach Wnt-Stimulation kommt.

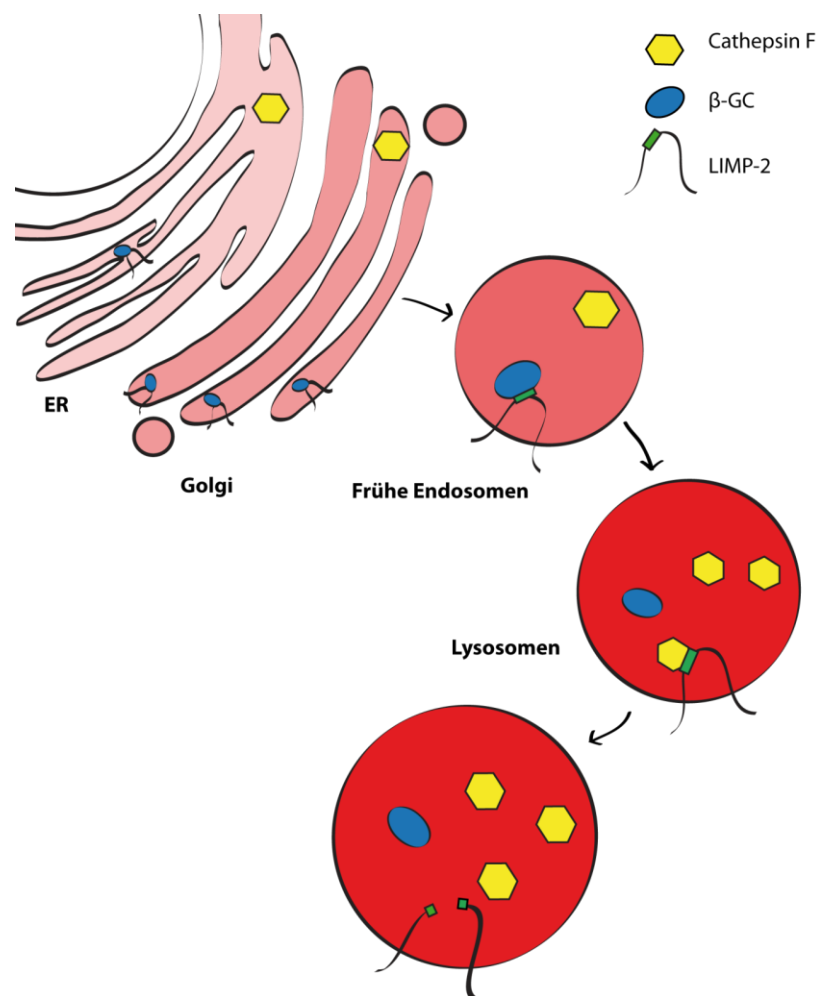
Auch wenn gezeigt werden konnte, dass leichte Funktionsstörungen in Lysosomen einen positiven Effekt auf das Wnt-Signaling haben (Dobrowolski et al. 2012), führt die Inhibition der



v-ATPase mit Bafilomycin in höheren Dosen zu reduziertem Wnt-Signaling, wie es auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Zusätzlich wurde gezeigt, dass Deletionen von Untereinheiten der v-ATPase (PRR oder  $\alpha 3$ ) ebenfalls einen negativen Effekt haben. Die Funktionalität der v-ATPase ist dementsprechend essentiell für den Wnt-Signalweg. Würde LIMP-2 die Funktionalität der v-ATPase durch die Interaktion mit dem PRR negativ beeinflussen, würde dies den negativen Einfluss von LIMP-2 auf den Wnt-Signalweg erklären. In dieser Arbeit konnte aber unter Momentanbedingungen nicht gezeigt werden, dass die Proteinlevel des PRRs in Abhängigkeit von LIMP-2 nach Wnt-Stimulation verändert waren. Allerdings wäre es möglich, dass das Recycling des PRRs durch LIMP-2 beeinflusst wird und LIMP-2 somit den Wnt-Signalweg beeinflusst. Es wurde bereits gezeigt, dass GSK3 als Teil des Wnt-Komplexes durchaus wieder aus den ILVs entlassen werden kann, es also zu einer Refusion der ILVs mit der endosomalen Membran kommt (Dobrowolski and De Robertis 2012). Dieses Recycling der GSK3 führt dazu, dass  $\beta$ -Catenin wieder phosphoryliert und abgebaut wird. Hat LIMP-2 also einen positiven Effekt auf das Recycling des PRR oder des Wnt-Komplexes im Allgemeinen, würde eine Überexpression von LIMP-2 zu verminderten Wnt-Signaling führen, wie es auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Um dies zu testen, könnte die Menge an recyceltem PRR an der Plasmamembran oder die Menge an zytosolischem GSK3 in Abhängigkeit von LIMP-2 getestet werden.

#### 7.4 Identifizierung von Cathepsin F als Protease von LIMP-2

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass LIMP-2 prozessiert wird. Dabei konnte insbesondere Cathepsin F als verantwortliche Protease identifiziert werden (7.4.1). Die Spaltung von LIMP-2 findet in späten Endosomen bzw. Lysosomen statt. Die Ligandenbinderegion, an der auch  $\beta$ -GC bindet, scheint dabei eine wichtige Stelle für die Induktion der Spaltung zu sein (7.4.2). Nicht nur Mutationen in diesem Bereich beeinflussen die Spaltung, sondern auch die Überexpression des Liganden  $\beta$ -GC reduziert die Cathepsin F induzierte Proteolyse. Nach der Identifikation von LIMP-2 als Substrat für Cathepsin F konnte zusätzlich gezeigt werden, dass Mutanten von Cathepsin F, die mit der Entstehung der Kufs-Erkrankung assoziiert sind, keine Proteolyse von LIMP-2 mehr induzieren können (7.4.3) (Abb. 70).



**Abb. 70: Schematische Darstellung der Ergebnisse zur LIMP-2 Prozessierung durch Cathepsin F.** LIMP-2 bindet  $\beta$ -GC im ER und transportiert es zu Lysosomen. Nach der Dissoziation von LIMP-2 und  $\beta$ -GC kann Cathepsin F LIMP-2 in der Ligandenbinderegion spalten.

#### 7.4.2 LIMP-2 wird als lysosomales Membranprotein durch Cathepsine prozessiert

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass LIMP-2 sowohl *in cellulo* als auch *in vivo* proteolytisch gespalten wird. Diese Spaltung findet erst in späten Endosomen bzw. Lysosomen statt. Es konnte gezeigt werden, dass Cathepsin F neben Cathepsin L hauptverantwortlich für diese Proteolyse ist. Interessanterweise wurde bereits gezeigt, dass auch andere lysosomalen Membranproteinen durch Cathepsine gespalten werden können (Durand et al. 2010; Savalas et al. 2011; Steenhuis et al. 2012).

Die Funktionalität der Spaltung von lysosomalen Membranproteinen konnte das erste Mal für die *Heparan Sulfate Acetyl-CoA:  $\alpha$ -Glucosaminide N-Acetyltransferase* (HGSNAT) gezeigt werden (Durand et al. 2010). HGSNAT kann Acetyl-Coenzym A an Heparansulfat binden und initiiert damit die Degradation des Heparansulfats. Die Proteolyse und die Oligomerisierung des Proteins sind dabei essenziell um diesen Schritt auszuführen. Neben HGSNAT konnte auch für die lysosomalen Membranproteine *ceroid-lipofuscinosis neuronal protein 7* (CLN7) und *disrupted in renal carcinoma 2* (DIRC2) eine Prozessierung beobachtet werden, wobei beide Proteine vor allem durch Cathepsin L prozessiert wurden (Savalas et al. 2011; Steenhuis et al. 2012). Auch für LIMP-2 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es zu einem geringen Teil von Cathepsin L gespalten werden kann. Da für Cathepsin L und F auch schon gezeigt werden konnte, dass sie redundant agieren können, da sie in *in vitro* Studien die gleichen Peptide spalten können (Wang et al. 1998), ist nicht auszuschließen, dass Cathepsin F auch die Spaltung von DIRC2 und CLN7 induzieren kann.

Die gezielte Spaltung von lysosomalen Membranproteinen scheint eine Möglichkeit zu sein, deren Funktion zu modulieren, wobei für LIMP-2 die Funktion der Spaltung noch ermittelt werden muss.

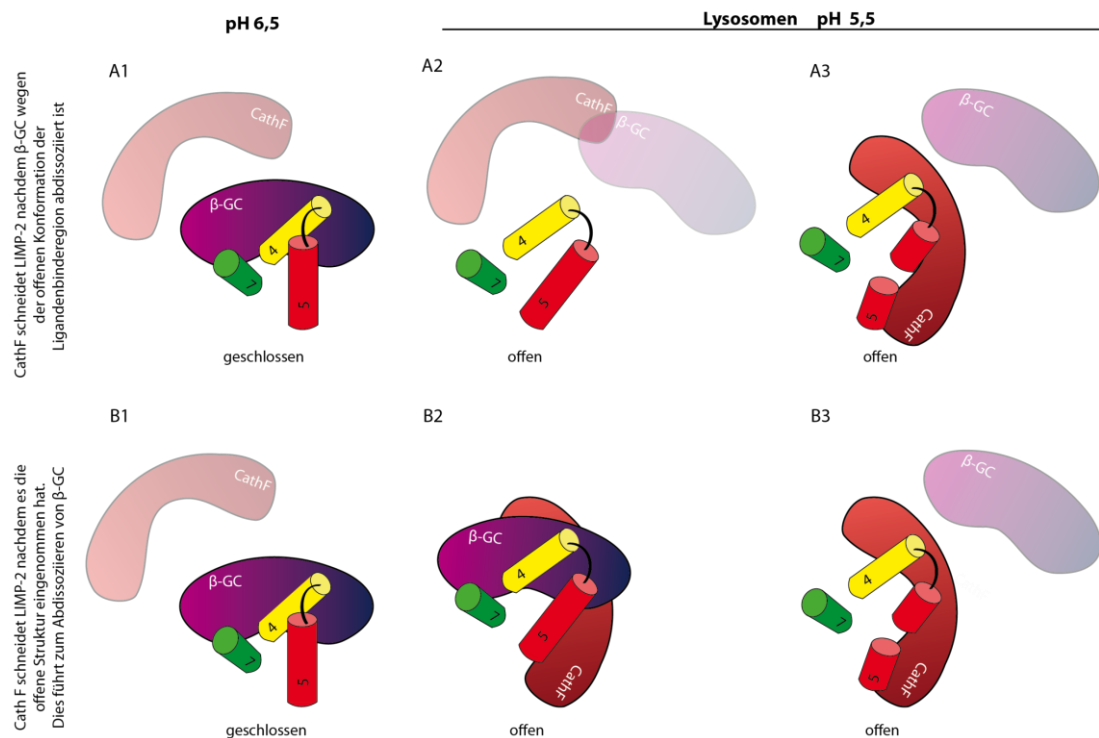
#### 7.4.3 Modulation der LIMP-2 Funktionalität durch Spaltung in der Ligandenbinderegion

Strukturell besitzt LIMP-2 eine bereits bekannte und charakterisierte Ligandenbinderegion. Diese ist sowohl wichtig für die Bindung von  $\beta$ -GC im ER als auch vom Enterovirus 71 (EV71) an der Plasmamembran (Neculai et al. 2013; Dang et al. 2014). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Region auch wichtig für die Spaltung von LIMP-2 ist. Aminosäure-Austauschmutationen in diesem Bereich, die strukturelle Veränderungen hervorrufen können, zeigten hierbei vermehrte oder verminderte Spaltung. Dies könnte zum einen darauf zurückzuführen sein, dass in dieser Region keine Glykosylierungen zu finden sind. Es ist bekannt, dass Glykosylierungen lysosomale Membranproteine vor der

Degradation schützen (Wilke et al. 2012). Zum anderen ist die Ligandenbinderegion exponiert. Auch für CLN7 wurde gezeigt, dass die ins lysosomale Lumen ragenden Bereiche vermutlich die Spaltungsregion darstellen (Steenhuis et al. 2012).

Interessanterweise konnte in dieser Arbeit beobachtet werden, dass die Überexpression von  $\beta$ -GC, das mit der Ligandenbinderegion von LIMP-2 interagiert (Neculai et al. 2013), die Spaltung von LIMP-2 durch Cathepsin F vermindert. Das lässt darauf schließen, dass LIMP-2, solange es mit  $\beta$ -GC interagiert, nicht gespalten wird, was wiederum die Annahme unterstützt, dass die Spaltung in der Region um Helix 5 stattfindet. Die Interaktion von  $\beta$ -GC mit der Ligandenbinderegion kann allerdings nicht allein ausschlaggebend für die Spaltung durch Cathepsin F sein. Mutanten in Helix 7, die auch kein  $\beta$ -GC mehr binden können, zeigen im Gegensatz zu den Helix 5-Mutanten keine vermehrte Spaltung.

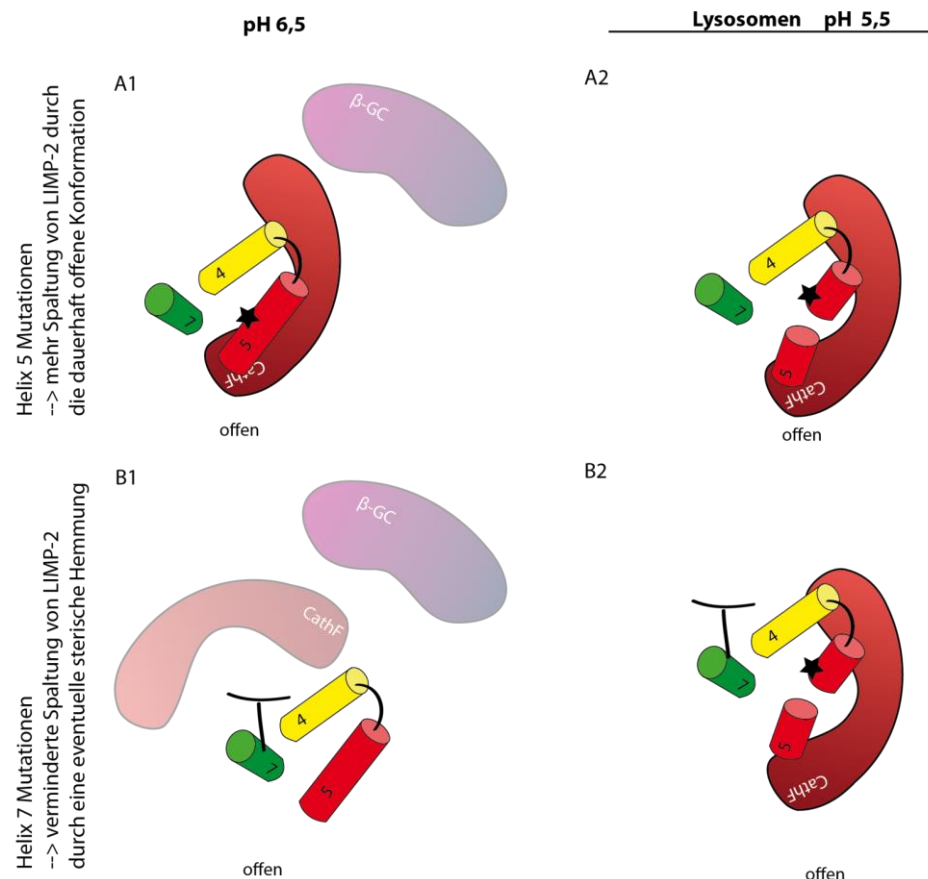
Untersuchungen der Kristallstruktur von LIMP-2 konnten zeigen, dass die Ligandenbinderegion zwei unterschiedliche Konformationen eingeht, je nachdem, ob sie von einem neutralen oder sauren pH-Wert umgeben ist (Zhao et al. 2014). Dabei zeigte sich, dass die Helices 5 und 7 bei pH 6,5 eine sehr kompakte Struktur einnehmen (Abb. 71 A1). Bei pH 5.5 im Lysosom sind Helix 5 und 7 weiter voneinander entfernt und zeigen somit eine etwas losere Struktur (Abb. 71 A2). Diese Konformationsänderung führt vermutlich dazu, dass die Affinität zu  $\beta$ -GC reduziert wird und der Ligand im Lysosom freigesetzt werden kann. Nun kann es bezüglich Cathepsin F der Fall sein, dass die Freisetzung von  $\beta$ -GC dazu führt, dass Cathepsin F an LIMP-2 binden und dieses spalten kann (Abb. 71 A3). Andererseits könnte es auch sein, dass die Konformationsänderung die Ligandenbindestelle für Cathepsin F zugänglich macht (Abb. 71 B2). Die Spaltung von LIMP-2 durch Cathepsin F könnte dann zum Freisetzen von  $\beta$ -GC führen (Abb. 71 B3). In beiden Fällen wäre der Transport von  $\beta$ -GC zum Lysosomen nicht beeinflusst und korreliert mit den Ergebnissen in dieser Arbeit, wobei  $\beta$ -GC Cathepsin F-unabhängig an LIMP-2 bindet und ins Lysosom transportiert wird.



**Abb. 71: Schematische Darstellung der Konformationsänderung und Spaltung der Ligandenbinderegion von LIMP-2.** Bei pH 6,5 ist die Ligandenbinderegion, die aus Helix 4, 5 und 7 gebildet wird geschlossen und β-GC kann binden. (A1, B1). Bei pH 5,5 im Lysosom ändert sich die Konformation in einen offenen Zustand. Das kann entweder dazu führen, dass β-GC abdissoziiert (A2) und Cathepsin F dann die Region spaltet (A3) oder dass Cathepsin F an die Ligandenbinderegion bindet (B2) und durch die Spaltung die Ablösung von β-GC induziert (B3).

Wenn man die Kristallstruktur zugrunde legt, würden Mutationen in Helix 5 dazu führen, dass Helix 5 und 7 nicht mehr so stabil binden, da für Aminosäuren an Position 156, 163 und 191 und 187 beschrieben worden ist, dass sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen die stabile Konformation ermöglichen (Dang et al. 2014). Mutationen dieser Aminosäuren würden dementsprechend die Interaktion von LIMP-2 und β-GC verhindern, wie es auch bereits gezeigt werden konnte (Neculai et al. 2013). In dieser Arbeit wurde dementsprechend beobachtet, dass Mutationen der Aminosäure 156 tatsächlich dazu führen, dass mehr Spaltung induziert wird. Eine Erklärung könnte sein, dass durch die offene Konformation der LIMP-2-Mutante Cathepsin F vermehrt binden kann, eventuell auch schon in nicht sauren Kompartimenten und β-GC diese Interaktion nicht stört, da β-GC selbst nicht binden kann (Abb. 72 A1-2). Dies zeigten auch Koimmunpräzipitationen in dieser Arbeit, wonach Cathepsin F an die Helix 5 Mutante I156D besser binden konnte (Daten nicht gezeigt). Außerdem wurde gezeigt, dass Mutationen in Helix 5 vermehrt geschnitten werden. Mutationen in Helix 7 könnten zwar auch die geschlossene Struktur verhindern (Dang et al. 2014), allerdings konnte in dieser Arbeit beobachtet werden, dass Mutationen in Helix 7 zur verminderten Spaltung führen und eine reduzierte Bindung von Cathepsin F an die LIMP-2-

Mutanten vorliegt (Daten nicht gezeigt). Dies lässt darauf schließen, dass eventuell weitere sterische Hinderungen durch die Helix 7-Mutationen eingefügt werden (Abb. 72 B1-2). Nichtsdestotrotz scheint die Spaltung in dieser Region ein nützliches Werkzeug für die Regulation der Ligandenbindung zu sein, wonach entweder gezielt Liganden durch die Spaltung freigesetzt werden oder die Spaltung solange verhindert wird, bis der Ligand an den Zielort transportiert wurde.



**Abb. 72: Schematische Darstellung der Konformationsänderung und Spaltung der Ligandenbinderegion von LIMP-2-Mutanten.** Bei pH 6,5 ist die Ligandenbinderegion bei den Mutanten in Helix 5 und Helix 7 offen. Allerdings kann nur bei den Helix 5-Mutanten Cathepsin F besser binden (A1) und zur vermehrten Spaltung führen (A2). Mutationen in Helix 7 verhindern sogar teilweise die Spaltung (B), was eine sterische Behinderung durch die Mutation vermuten lässt. Durch den offenen Zustand beider Mutanten kann  $\beta$ -GC nicht binden und wird nicht ins Lysosom transportiert.

In dem Zusammenhang sollte auch erwähnt werden, dass  $\beta$ -GC nicht der einzige bekannte Ligand von LIMP-2 ist. Es wurde gezeigt, dass LIMP-2 an der Plasmamembran ebenfalls in der Ligandenbinderegion den Enterovirus 71 (EV71) binden kann. Dieser Komplex wird dann endozytiert und das Virus wird in endozytotischen Vesikeln bei saurem pH-Wert in Abhängigkeit der Konformationsänderung in der Ligandenbinderegion von LIMP-2 von der Virenkapsel befreit (Dang et al. 2014). Es wäre durchaus möglich, dass die Spaltung von LIMP-2 durch Cathepsin F die Freisetzung des Virus in Endosomen unterstützt.

Eine weitere potenzielle Funktion von LIMP-2 wurde aufgrund der ermittelten Kristallstruktur postuliert. So konnte gezeigt werden, dass das Monomer von LIMP-2 einen Kanal bilden kann. Für die Familienmitglieder von LIMP-2, SR-B1 und CD36 konnte gezeigt werden, dass sie Cholesterolester durch diesen Kanal transportieren können (Neculai et al. 2013). Auch wenn bis heute nicht bekannt ist, ob der Kanal in LIMP-2 funktionell ist und welche Substrate transportiert werden können, so hätte eine Spaltung von Cathepsin F in LIMP-2 sicherlich einen regulierenden Effekt auf die Transportfunktion.

#### **7.4.4 Mutationen von Cathepsin F, die die Typ-B-Kufs-Erkrankung auslösen können, prozessieren LIMP-2 nicht**

Obwohl Cathepsin F noch keine gut charakterisierte Protease darstellt, konnten Mutationen in Mensch und Maus bereits näher charakterisiert werden. So zeigen Mäuse, die kein Cathepsin F mehr besitzen, einen Phänotyp, der auf eine lysosomale Speichererkrankung hindeutet (Tang et al. 2006). Die Mäuse entwickelten Koordinationsstörungen und allgemeinen Muskelschwund. Im Gehirn fand sich die charakteristische Akkumulation von Lipofuscin, was ein Pigment aus nicht abgebauten Lipiden darstellt. Dies deutet auf eine Störung im lysosomalen Abbau von Makromolekülen hin: Ein Merkmal neuronaler Lipofuszinosen, einer Untergruppe von lysosomalen Speichererkrankungen (Jalanko and Braulke 2009).

Interessanterweise konnten auch schon andere Cathepsine (z.B. Cathepsin D (Koike et al. 2000)) mit der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. Nicht immer reicht die Deletion einer einzelnen Protease aus, um eine Erkrankung zu induzieren (z.B. Cathepsin B und L (Felbor et al. 2002)). Doch bei Cathepsin F war die Deletion der Protease hinreichend, was auf Funktionen von Cathepsin F schließen lässt, die nicht von anderen Cathepsinen übernommen werden kann.

Mutationen von Cathepsin F im Menschen führen ebenfalls zu einer Form der späten neuronalen Lipofuszinose: Typ-B-Kufs-Erkrankung (Smith et al. 2013). Bisher wurden fünf verschiedene Mutationen im Cathepsin F-Gen beschrieben. Allerdings war es nicht möglich, zu überprüfen, ob diese Mutationen tatsächlich zu einer Inaktivität des Enzyms und somit zur Induktion der Symptome im Patienten führen.

In dieser Arbeit konnte LIMP-2 als eines der ersten natürlichen Substrate von Cathepsin F identifiziert werden. Dadurch war es möglich die Kufs-Erkrankung-assoziierten Mutanten auf ihre Aktivität hin zu testen. Es konnte gezeigt werden, dass keine der Mutanten in der Lage war LIMP-2 zu prozessieren. Dies kann sowohl auf die enzymatische Inaktivität der Proteasen als auch auf eine Fehllokalisierung zurückzuführen sein. Beides würde dazu führen, dass Substrate, die normalerweise von Cathepsin F im Lysosom gespalten und dementsprechend de-

gradiert werden, akkumulieren, solange keine andere Protease diese Aufgabe übernehmen kann.

Da Cathepsine oft ein weites Spektrum an Substraten aufweisen (Turk et al. 2012), kann nicht davon ausgegangen werden, dass LIMP-2 das einzige Substrat von Cathepsin F darstellt und dementsprechend alleine zur Pathophysiologie der Typ-B-Kufs-Erkrankung führt. Es ist eher denkbar, dass Substrate, die normalerweise in Lysosomen degradiert werden, durch die Inaktivität der Cathepsin F-Mutanten akkumulieren und somit zur Toxizität in den Zellen und zur Ausprägung der Neurodegeneration führen. Des Weiteren wäre es auch denkbar, dass Cathepsin F zum Beispiel im Falle von LIMP-2 mittels Proteolyse die Funktion lysosomaler Membranproteine induziert oder reguliert. In dem Zusammenhang ist es interessant, dass LIMP-2 eventuell durch seinen Kanal in der Lage ist Lipide zu transportieren (Neculai et al. 2013). Wäre diese Funktion durch die Spaltung von Cathepsin F reguliert, könnte dies zur Akkumulation der Lipide in den Lysosomen führen.

Auch wenn die Spaltung von LIMP-2 vermutlich nicht der entscheidende Auslöser für die Kufs-Erkrankung ist, ist es doch wichtig, dass in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass alle Typ-B-Kufs-Erkrankung-assoziierten Cathepsin F-Mutationen nicht mehr proteolytisch wirken können und dies sehr wahrscheinlich die Grundlage für die Pathologie der Erkrankung ist. Dies könnte vor allem für die Diagnose der Erkrankung eine Rolle spielen. Gerade bei der Typ-B-Kufs-Erkrankung ist es bis heute schwierig genaue Diagnosen zu stellen, da Symptome wie Ataxie, Demenz und Akkumulationen im Gehirn nicht immer auf eine späte neuronale Lipofuszinose zurückzuführen sind, sondern auch altersbedingte Erscheinungen sein können (Arsov et al. 2011). Wenn davon ausgegangen werden kann, dass nur Mutationen, die zu einem inaktiven Enzym führen, die Erkrankung auslösen, könnten Patienten auf die Aktivität des Enzyms hin getestet werden. Diese Art der Diagnostik wird bereits für andere neuronale Lipofuszinosen angewendet. So zeigen Patienten mit NCL und den entsprechenden Mutationen z.B. verminderte Enzymaktivitäten von Cathepsin D oder Tripeptidyl-peptidase 1 (TPP-1) in Blutzellen (Mole 2001). LIMP-2 könnte dabei als Substrat für die Überprüfung der enzymatischen Aktivität von Cathepsin F in Patientenproben dienen.



## 8 Literaturverzeichnis

- Advani, A., D. J. Kelly, A. J. Cox, K. E. White, S. L. Advani, K. Thai, K. A. Connelly, D. Yuen, J. Trogadis, A. M. Herzenberg, M. A. Kuliszewski, H. Leong-Poi and R. E. Gilbert (2009). "The (Pro)renin receptor: site-specific and functional linkage to the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in the kidney." *Hypertension* **54**(2): 261-269.
- Aerts, J. M., A. W. Schram, A. Strijland, S. van Weely, L. M. Jonsson, J. M. Tager, S. H. Sorrell, E. I. Ginns, J. A. Barranger and G. J. Murray (1988). "Glucocerebrosidase, a lysosomal enzyme that does not undergo oligosaccharide phosphorylation." *Biochimica et biophysica acta* **964**(3): 303-308.
- Agre, P. and D. Kozono (2003). "Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases." *FEBS letters* **555**(1): 72-78.
- Alabi, A. A. and R. W. Tsien (2012). "Synaptic vesicle pools and dynamics." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**(8): a013680.
- Andrejewski, N., E. L. Punnonen, G. Guhde, Y. Tanaka, R. Lullmann-Rauch, D. Hartmann, K. von Figura and P. Saftig (1999). "Normal lysosomal morphology and function in LAMP-1-deficient mice." *The Journal of biological chemistry* **274**(18): 12692-12701.
- Arsov, T., K. R. Smith, J. Damiano, S. Franceschetti, L. Canafoglia, C. J. Bromhead, E. Andermann, D. F. Vears, P. Cossette, S. Rajagopalan, A. McDougall, V. Sofia, M. Farrell, U. Aguglia, A. Zini, S. Meletti, M. Morbin, S. Mullen, F. Andermann, S. E. Mole, M. Bahlo and S. F. Berkovic (2011). "Kufs disease, the major adult form of neuronal ceroid lipofuscinosis, caused by mutations in CLN6." *American journal of human genetics* **88**(5): 566-573.
- Balreira, A., P. Gaspar, D. Caiola, J. Chaves, I. Beirao, J. L. Lima, J. E. Azevedo and M. C. Miranda (2008). "A nonsense mutation in the LIMP-2 gene associated with progressive myoclonic epilepsy and nephrotic syndrome." *Human molecular genetics* **17**(14): 2238-2243.
- Barriocanal, J. G., J. S. Bonifacino, L. Yuan and I. V. Sandoval (1986). "Biosynthesis, glycosylation, movement through the Golgi system, and transport to lysosomes by an N-linked carbohydrate-independent mechanism of three lysosomal integral membrane proteins." *The Journal of biological chemistry* **261**(35): 16755-16763.
- Baumert, M., P. R. Maycox, F. Navone, P. De Camilli and R. Jahn (1989). "Synaptobrevin: an integral membrane protein of 18,000 daltons present in small synaptic vesicles of rat brain." *The EMBO journal* **8**(2): 379-384.
- Becher, A., A. Drenckhahn, I. Pahner and G. Ahnert-Hilger (1999). "The synaptophysin-synaptobrevin complex is developmentally upregulated in cultivated neurons but is absent in neuroendocrine cells." *European journal of cell biology* **78**(9): 650-656.
- Becker-Cohen, R., D. Elstein, A. Abrahamov, N. Algur, B. Rudensky, I. Hadas-Halpern, A. Zimran and Y. Frishberg (2005). "A comprehensive assessment of renal function in patients with Gaucher disease." *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* **46**(5): 837-844.
- Berger, A. C. and P. A. Roche (2009). "MHC class II transport at a glance." *Journal of cell science* **122**(Pt 1): 1-4.
- 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 and 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): 673-684.

- Bhuin, T. and J. K. Roy (2014). "Rab proteins: The key regulators of intracellular vesicle transport." Experimental cell research **328**(1): 1-19.
- Bilic, J., Y. L. Huang, G. Davidson, T. Zimmermann, C. M. Cruciat, M. Bienz and C. Niehrs (2007). "Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation." Science **316**(5831): 1619-1622.
- Blanz, J., J. Groth, C. Zachos, C. Wehling, P. Saftig and M. Schwake (2010). "Disease-causing mutations within the lysosomal integral membrane protein type 2 (LIMP-2) reveal the nature of binding to its ligand beta-glucocerebrosidase." Human molecular genetics **19**(4): 563-572.
- Blitzer, J. T. and R. Nusse (2006). "A critical role for endocytosis in Wnt signaling." BMC cell biology **7**: 28.
- Bonifacino, J. S. and L. M. Traub (2003). "Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes." Annual review of biochemistry **72**: 395-447.
- Borsics, T., E. Lundberg, D. Geerts, D. L. Koomoa, J. Koster, K. Wester and A. S. Bachmann (2010). "Subcellular distribution and expression of prenylated Rab acceptor 1 domain family, member 2 (PRAF2) in malignant glioma: Influence on cell survival and migration." Cancer science **101**(7): 1624-1631.
- Braulke, T. and J. S. Bonifacino (2009). "Sorting of lysosomal proteins." Biochimica et biophysica acta **1793**(4): 605-614.
- Brix, K. (2005). "Lysosomal Proteases: Revival of the Sleeping Beauty." Lysosomes Eureka.Com Inc **(1)**: 50-59.
- Brix, K., A. Dunkhorst, K. Mayer and S. Jordans (2008). "Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions." Biochimie **90**(2): 194-207.
- Buechling, T., K. Bartscherer, B. Ohkawara, V. Chaudhary, K. Spirohn, C. Niehrs and M. Boutros (2010). "Wnt/Frizzled signaling requires dPRR, the Drosophila homolog of the prorenin receptor." Current biology : CB **20**(14): 1263-1268.
- Burckle, C. and M. Bader (2006). "Prorenin and its ancient receptor." Hypertension **48**(4): 549-551.
- Cang, C., Y. Zhou, B. Navarro, Y. J. Seo, K. Aranda, L. Shi, S. Battaglia-Hsu, I. Nissim, D. E. Clapham and D. Ren (2013). "mTOR regulates lysosomal ATP-sensitive two-pore Na(+) channels to adapt to metabolic state." Cell **152**(4): 778-790.
- Canuel, M., A. Korkidakis, K. Konnyu and C. R. Morales (2008). "Sortilin mediates the lysosomal targeting of cathepsins D and H." Biochemical and biophysical research communications **373**(2): 292-297.
- Casillas-Espinosa, P. M., K. L. Powell and T. J. O'Brien (2012). "Regulators of synaptic transmission: roles in the pathogenesis and treatment of epilepsy." Epilepsia **53 Suppl 9**: 41-58.
- Chan, L. G., U. D. Parashar, M. S. Lye, F. G. Ong, S. R. Zaki, J. P. Alexander, K. K. Ho, L. L. Han, M. A. Pallansch, A. B. Suleiman, M. Jegathesan and L. J. Anderson (2000). "Deaths of children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in sarawak, malaysia: clinical and pathological characteristics of the disease. For the Outbreak Study Group." Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America **31**(3): 678-683.
- Charrow, J. (2009). "Enzyme replacement therapy for Gaucher disease." Expert opinion on biological therapy **9**(1): 121-131.
- Chaves, J., I. Beirao, A. Balreira, P. Gaspar, D. Caiola, M. C. Sa-Miranda and J. L. Lima (2011). "Progressive myoclonus epilepsy with nephropathy C1q due to SCARB2/LIMP-2 deficiency: clinical report of two siblings." Seizure : the journal of the British Epilepsy Association **20**(9): 738-740.
- Clevers, H. (2006). "Wnt/beta-catenin signaling in development and disease." Cell **127**(3): 469-480.

- Clevers, H. and R. Nusse (2012). "Wnt/beta-catenin signaling and disease." Cell **149**(6): 1192-1205.
- Compton, S. L. and E. N. Behrend (2006). "PRAF1: a Golgi complex transmembrane protein that interacts with viruses." Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire **84**(6): 940-948.
- Conlon, P. J., K. Lynn, M. P. Winn, L. D. Quarles, M. L. Bembe, M. Pericak-Vance, M. Speer and D. N. Howell (1999). "Spectrum of disease in familial focal and segmental glomerulosclerosis." Kidney international **56**(5): 1863-1871.
- Cousin, C., D. Bracquart, A. Contrepas, P. Corvol, L. Muller and G. Nguyen (2009). "Soluble form of the (pro)renin receptor generated by intracellular cleavage by furin is secreted in plasma." Hypertension **53**(6): 1077-1082.
- Cox, T. M. (2010). "Gaucher disease: clinical profile and therapeutic developments." Biologics : targets & therapy **4**: 299-313.
- Cruciat, C. M., B. Ohkawara, S. P. Acebron, E. Karaulanov, C. Reinhard, D. Ingelfinger, M. Boutros and C. Niehrs (2010). "Requirement of prorenin receptor and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase-mediated acidification for Wnt signaling." Science **327**(5964): 459-463.
- Dang, M., X. Wang, Q. Wang, Y. Wang, J. Lin, Y. Sun, X. Li, L. Zhang, Z. Lou, J. Wang and Z. Rao (2014). "Molecular mechanism of SCARB2-mediated attachment and uncoating of EV71." Protein & cell **5**(9): 692-703.
- Dardis, A., M. Filocamo, S. Grossi, G. Ciana, S. Franceschetti, S. Dominissini, G. Rubboli, M. Di Rocco and B. Bembi (2009). "Biochemical and molecular findings in a patient with myoclonic epilepsy due to a mistarget of the beta-glucosidase enzyme." Molecular genetics and metabolism **97**(4): 309-311.
- De Duve, C., B. C. Pressman, R. Gianetto, R. Wattiaux and F. Appelmans (1955). "Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue." The Biochemical journal **60**(4): 604-617.
- Deak, F., S. Schoch, X. Liu, T. C. Sudhof and E. T. Kavalali (2004). "Synaptobrevin is essential for fast synaptic-vesicle endocytosis." Nature cell biology **6**(11): 1102-1108.
- Deak, F., O. H. Shin, E. T. Kavalali and T. C. Sudhof (2006). "Structural determinants of synaptobrevin 2 function in synaptic vesicle fusion." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **26**(25): 6668-6676.
- Deussing, J., K. Tisljar, A. Papazoglou and C. Peters (2000). "Mouse cathepsin F: cDNA cloning, genomic organization and chromosomal assignment of the gene." Gene **251**(2): 165-173.
- Dobrowolski, R. and E. M. De Robertis (2012). "Endocytic control of growth factor signalling: multivesicular bodies as signalling organelles." Nature reviews. Molecular cell biology **13**(1): 53-60.
- Dobrowolski, R., P. Vick, D. Ploper, I. Gumper, H. Snitkin, D. D. Sabatini and E. M. De Robertis (2012). "Presenilin deficiency or lysosomal inhibition enhances Wnt signaling through relocalization of GSK3 to the late-endosomal compartment." Cell reports **2**(5): 1316-1328.
- Dodds, R. A., J. R. Connor, F. Drake, J. Feild and M. Gowen (1998). "Cathepsin K mRNA detection is restricted to osteoclasts during fetal mouse development." Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research **13**(4): 673-682.
- Dong, X. P., X. Cheng, E. Mills, M. Delling, F. Wang, T. Kurz and H. Xu (2008). "The type IV mucopolipidosis-associated protein TRPML1 is an endolysosomal iron release channel." Nature **455**(7215): 992-996.
- Durand, S., M. Feldhammer, E. Bonneil, P. Thibault and A. V. Pshezhetsky (2010). "Analysis of the biogenesis of heparan sulfate acetyl-CoA:alpha-glucosaminide N-acetyltransferase provides insights into the mechanism underlying its complete

- deficiency in mucopolysaccharidosis IIIC." The Journal of biological chemistry **285**(41): 31233-31242.
- 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 and 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): 3132-3145.
- Eskelinen, E. L., Y. Tanaka and P. Saftig (2003). "At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins." Trends in cell biology **13**(3): 137-145.
- Febbraio, M., D. P. Hajjar and R. L. Silverstein (2001). "CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism." The Journal of clinical investigation **108**(6): 785-791.
- Felbor, U., B. Kessler, W. Mothes, H. H. Goebel, H. L. Ploegh, R. T. Bronson and B. R. Olsen (2002). "Neuronal loss and brain atrophy in mice lacking cathepsins B and L." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(12): 7883-7888.
- Fo, C. S., C. S. Coleman, C. J. Wallick, A. L. Vine and A. S. Bachmann (2006). "Genomic organization, expression profile, and characterization of the new protein PRA1 domain family, member 2 (PRAF2)." Gene **371**(1): 154-165.
- Fujita, H., J. Ezaki, Y. Noguchi, A. Kono, M. Himeno and K. Kato (1991). "Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding 85kDa sialoglycoprotein in rat liver lysosomal membranes." Biochemical and biophysical research communications **178**(2): 444-452.
- Fuller, M., P. J. Meikle and J. J. Hopwood (2006). Epidemiology of lysosomal storage diseases: an overview. Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS. A. Mehta, M. Beck and G. Sunder-Plassmann. Oxford.
- Gagliardi, M., E. Piddini and J. P. Vincent (2008). "Endocytosis: a positive or a negative influence on Wnt signalling?" Traffic **9**(1): 1-9.
- Gaidukov, L., A. R. Nager, S. Xu, M. Penman and M. Krieger (2011). "Glycine dimerization motif in the N-terminal transmembrane domain of the high density lipoprotein receptor SR-BI required for normal receptor oligomerization and lipid transport." The Journal of biological chemistry **286**(21): 18452-18464.
- Gamp, A. C., Y. Tanaka, R. Lullmann-Rauch, D. Wittke, R. D'Hooge, P. P. De Deyn, T. Moser, H. Maier, D. Hartmann, K. Reiss, A. L. Illert, K. von Figura and P. Saftig (2003). "LIMP-2/LGP85 deficiency causes ureteric pelvic junction obstruction, deafness and peripheral neuropathy in mice." Human molecular genetics **12**(6): 631-646.
- Geerts, D., C. J. Wallick, D. L. Koomoa, J. Koster, R. Versteeg, R. C. Go and A. S. Bachmann (2007). "Expression of prenylated Rab acceptor 1 domain family, member 2 (PRAF2) in neuroblastoma: correlation with clinical features, cellular localization, and cerulenin-mediated apoptosis regulation." Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research **13**(21): 6312-6319.
- Ghosh, P., N. M. Dahms and S. Kornfeld (2003). "Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale." Nature reviews. Molecular cell biology **4**(3): 202-212.
- Goldstein, J. L., S. E. Dana, J. R. Faust, A. L. Beudet and M. S. Brown (1975). "Role of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low density lipoprotein. Observations in cultured fibroblasts from a patient with cholesteryl ester storage disease." The Journal of biological chemistry **250**(21): 8487-8495.
- Grabowski, G. A. (2008). "Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease." Lancet **372**(9645): 1263-1271.
- Groth, J. (2012). "Strukturelle und funktionelle Untersuchung des lysosomalen integralen Membranproteins LIMP-2."

- Guggenbuhl, P., B. Grosbois and G. Chales (2008). "Gaucher disease." Joint, bone, spine : revue du rhumatisme **75**(2): 116-124.
- Gundelfinger, E. D., M. M. Kessels and B. Qualmann (2003). "Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis." Nature reviews. Molecular cell biology **4**(2): 127-139.
- Hirose, T., M. Hashimoto, K. Totsune, H. Metoki, K. Asayama, M. Kikuya, K. Sugimoto, T. Katsuya, T. Ohkubo, J. Hashimoto, H. Rakugi, K. Takahashi and Y. Imai (2009). "Association of (pro)renin receptor gene polymorphism with blood pressure in Japanese men: the Ohasama study." American journal of hypertension **22**(3): 294-299.
- Hirose, T., M. Hashimoto, K. Totsune, H. Metoki, A. Hara, M. Satoh, M. Kikuya, T. Ohkubo, K. Asayama, T. Kondo, K. Kamide, T. Katsuya, T. Ogihara, S. Izumi, H. Rakugi, K. Takahashi and Y. Imai (2011). "Association of (pro)renin receptor gene polymorphisms with lacunar infarction and left ventricular hypertrophy in Japanese women: the Ohasama study." Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension **34**(4): 530-535.
- Hopfner, F., B. Schormair, F. Knauf, A. Berthele, T. R. Tolle, R. Baron, C. Maier, R. D. Treede, A. Binder, C. Sommer, C. Maihofner, W. Kunz, F. Zimprich, U. Heemann, A. Pfeufer, M. Nabauer, S. Kaab, B. Nowak, C. Gieger, P. Lichtner, C. Trenkwalder, K. Oexle and J. Winkelmann (2011). "Novel SCARB2 mutation in action myoclonus-renal failure syndrome and evaluation of SCARB2 mutations in isolated AMRF features." BMC neurology **11**: 134.
- Howell, D. P., R. J. Krieser, A. Eastman and M. A. Barry (2003). "Deoxyribonuclease II is a lysosomal barrier to transfection." Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy **8**(6): 957-963.
- Hu, C., M. Ahmed, T. J. Melia, T. H. Sollner, T. Mayer and J. E. Rothman (2003). "Fusion of cells by flipped SNAREs." Science **300**(5626): 1745-1749.
- Hutagalung, A. H. and P. J. Novick (2011). "Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology." Physiological reviews **91**(1): 119-149.
- Iakovenko, A., E. Rostkova, E. Merzlyak, A. M. Hillebrand, N. H. Thoma, R. S. Goody and K. Alexandrov (2000). "Semi-synthetic Rab proteins as tools for studying intermolecular interactions." FEBS letters **468**(2-3): 155-158.
- Ichihara, A., F. Suzuki, T. Nakagawa, Y. Kaneshiro, T. Takemitsu, M. Sakoda, A. H. Nabi, A. Nishiyama, T. Sugaya, M. Hayashi and T. Inagami (2006). "Prorenin receptor blockade inhibits development of glomerulosclerosis in diabetic angiotensin II type 1a receptor-deficient mice." Journal of the American Society of Nephrology : JASN **17**(7): 1950-1961.
- Jager, S., P. Cimermanic, N. Gulbahce, J. R. Johnson, K. E. McGovern, S. C. Clarke, M. Shales, G. Mercenne, L. Pache, K. Li, H. Hernandez, G. M. Jang, S. L. Roth, E. Akiva, J. Marlett, M. Stephens, I. D'Orso, J. Fernandes, M. Fahey, C. Mahon, A. J. O'Donoghue, A. Todorovic, J. H. Morris, D. A. Maltby, T. Alber, G. Cagney, F. D. Bushman, J. A. Young, S. K. Chanda, W. I. Sundquist, T. Kortemme, R. D. Hernandez, C. S. Craik, A. Burlingame, A. Sali, A. D. Frankel and N. J. Krogan (2012). "Global landscape of HIV-human protein complexes." Nature **481**(7381): 365-370.
- Jager, S., N. Gulbahce, P. Cimermanic, J. Kane, N. He, S. Chou, I. D'Orso, J. Fernandes, G. Jang, A. D. Frankel, T. Alber, Q. Zhou and N. J. Krogan (2011). "Purification and characterization of HIV-human protein complexes." Methods **53**(1): 13-19.
- Jager, S., D. Y. Kim, J. F. Hultquist, K. Shindo, R. S. LaRue, E. Kwon, M. Li, B. D. Anderson, L. Yen, D. Stanley, C. Mahon, J. Kane, K. Franks-Skiba, P. Cimermanic, A. Burlingame, A. Sali, C. S. Craik, R. S. Harris, J. D. Gross and N. J. Krogan (2012).

- "Vif hijacks CBF-beta to degrade APOBEC3G and promote HIV-1 infection." Nature **481**(7381): 371-375.
- Janvier, K. and J. S. Bonifacino (2005). "Role of the endocytic machinery in the sorting of lysosome-associated membrane proteins." Molecular biology of the cell **16**(9): 4231-4242.
- Jefferies, K. C., D. J. Cipriano and M. Forgac (2008). "Function, structure and regulation of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases." Archives of biochemistry and biophysics **476**(1): 33-42.
- Johnsson, N. and A. Varshavsky (1994). "Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**(22): 10340-10344.
- Jorgensen, C. S., L. R. Ryder, A. Steino, P. Hojrup, J. Hansen, N. H. Beyer, N. H. Heegaard and G. Houen (2003). "Dimerization and oligomerization of the chaperone calreticulin." European journal of biochemistry / FEBS **270**(20): 4140-4148.
- Jung, N. and V. Haucke (2007). "Clathrin-mediated endocytosis at synapses." Traffic **8**(9): 1129-1136.
- Kaneshiro, Y., A. Ichihara, M. Sakoda, T. Takemitsu, A. H. Nabi, M. N. Uddin, T. Nakagawa, A. Nishiyama, F. Suzuki, T. Inagami and H. Itoh (2007). "Slowly progressive, angiotensin II-independent glomerulosclerosis in human (pro)renin receptor-transgenic rats." Journal of the American Society of Nephrology : JASN **18**(6): 1789-1795.
- Kaushik, S. and A. M. Cuervo (2012). "Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world." Trends in cell biology **22**(8): 407-417.
- Kinouchi, K., A. Ichihara and H. Itoh (2011). "Functional characterization of (pro)renin receptor in association with V-ATPase." Frontiers in bioscience **16**: 3216-3223.
- Kinouchi, K., A. Ichihara, M. Sano, G. H. Sun-Wada, Y. Wada, A. Kurauchi-Mito, K. Bokuda, T. Narita, Y. Oshima, M. Sakoda, Y. Tamai, H. Sato, K. Fukuda and H. Itoh (2010). "The (pro)renin receptor/ATP6AP2 is essential for vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase assembly in murine cardiomyocytes." Circulation research **107**(1): 30-34.
- Knipper, M., C. Claussen, L. Ruttiger, U. Zimmermann, R. Lullmann-Rauch, E. L. Eskelinen, J. Schroder, M. Schwake and P. Saftig (2006). "Deafness in LIMP2-deficient mice due to early loss of the potassium channel KCNQ1/KCNE1 in marginal cells of the stria vascularis." The Journal of physiology **576**(Pt 1): 73-86.
- Koike, M., H. Nakanishi, P. Saftig, J. Ezaki, K. Isahara, Y. Ohsawa, W. Schulz-Schaeffer, T. Watanabe, S. Waguri, S. Kametaka, M. Shibata, K. Yamamoto, E. Kominami, C. Peters, K. von Figura and Y. Uchiyama (2000). "Cathepsin D deficiency induces lysosomal storage with ceroid lipofuscin in mouse CNS neurons." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **20**(18): 6898-6906.
- Koomoa, D. L., R. C. Go, K. Wester and A. S. Bachmann (2008). "Expression profile of PRAF2 in the human brain and enrichment in synaptic vesicles." Neuroscience letters **436**(2): 171-176.
- Kornfeld, S. (1992). "Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors." Annual review of biochemistry **61**: 307-330.
- Kroemer, G. and M. Jaattela (2005). "Lysosomes and autophagy in cell death control." Nature reviews. Cancer **5**(11): 886-897.
- Krop, M., X. Lu, A. H. Danser and M. E. Meima (2013). "The (pro)renin receptor. A decade of research: what have we learned?" Pflugers Archiv : European journal of physiology **465**(1): 87-97.
- Kuronita, T., E. L. Eskelinen, H. Fujita, P. Saftig, M. Himeno and Y. Tanaka (2002). "A role for the lysosomal membrane protein LGP85 in the biogenesis and maintenance of endosomal and lysosomal morphology." Journal of cell science **115**(Pt 21): 4117-4131.

- Lee, D., M. J. Desmond, S. A. Fraser, M. Katerelos, K. Gleich, S. F. Berkovic and D. A. Power (2012). "Expression of the transmembrane lysosomal protein SCARB2/Limp-2 in renin secretory granules controls renin release." Nephron. Experimental nephrology **122**(3-4): 103-113.
- Lee, K., X. Jin, K. Zhang, L. Copertino, L. Andrews, J. Baker-Malcolm, L. Geagan, H. Qiu, K. Seiger, D. Barngrover, J. M. McPherson and T. Edmunds (2003). "A biochemical and pharmacological comparison of enzyme replacement therapies for the glycolipid storage disorder Fabry disease." Glycobiology **13**(4): 305-313.
- Lewandowska, E., W. Lipczynska-Lojkowska, J. Modzelewska, T. Wierzba-Bobrowicz, H. Mierzewska, G. M. Szpak, E. Passenik and K. Jachinska (2009). "Kufs' disease: diagnostic difficulties in the examination of extracerebral biopsies." Folia neuropathologica / Association of Polish Neuropathologists and Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences **47**(3): 259-267.
- Lin, J., Z. Liang, Z. Zhang and G. Li (2001). "Membrane topography and topogenesis of prenylated Rab acceptor (PRA1)." The Journal of biological chemistry **276**(45): 41733-41741.
- Lloyd, J. B. a. S. F. (1986). "The lysosome membrane." Trends in Biochemical Sciences **11**(9): 365-368.
- Ludwig, J., S. Kerscher, U. Brandt, K. Pfeiffer, F. Getlawi, D. K. Apps and H. Schagger (1998). "Identification and characterization of a novel 9.2-kDa membrane sector-associated protein of vacuolar proton-ATPase from chromaffin granules." The Journal of biological chemistry **273**(18): 10939-10947.
- Luzio, J. P., M. D. Parkinson, S. R. Gray and N. A. Bright (2009). "The delivery of endocytosed cargo to lysosomes." Biochemical Society transactions **37**(Pt 5): 1019-1021.
- Marianayagam, N. J., M. Sunde and J. M. Matthews (2004). "The power of two: protein dimerization in biology." Trends in Biochemical Sciences **29**(11): 618-625.
- Martincic, I., M. E. Peralta and J. K. Ngsee (1997). "Isolation and characterization of a dual prenylated Rab and VAMP2 receptor." The Journal of biological chemistry **272**(43): 26991-26998.
- Mason, J. B. L. a. R. W. (1997). "Biology of the Lysosome: 27 (Subcellular Biochemistry)." Springer **193-195**.
- Matveeva, E. A., D. A. Price, S. W. Whiteheart, T. C. Vanaman, G. A. Gerhardt and J. T. Slevin (2012). "Reduction of vesicle-associated membrane protein 2 expression leads to a kindling-resistant phenotype in a murine model of epilepsy." Neuroscience **202**: 77-86.
- Meikle, P. J., J. J. Hopwood, A. E. Clague and W. F. Carey (1999). "Prevalence of lysosomal storage disorders." JAMA **281**(3): 249-254.
- Michelle Rothaug, F. Z., Joseph Robert Mazzulli, Michaela Schweizer, Hermann Altmeppen, Renate Lüllmann-Rauch, Wouter W. Kallemeijn, Paulo Gaspar, Johannes M. Aerts, Markus Glatzel, Paul Saftig, Dimitri Krainc, Michael Schwake and Judith Blanz (2014). "LIMP-2 expression is critical for  $\beta$ -glucocerebrosidase activity and  $\alpha$ -synuclein clearance." PNAS in press.
- Mole, S. (2002). "Gene table: neuronal ceroid lipofuscinoses." European journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society **6**(2): 129-130.
- Mu, F. T., J. M. Callaghan, O. Steele-Mortimer, H. Stenmark, R. G. Parton, P. L. Campbell, J. McCluskey, J. P. Yeo, E. P. Tock and B. H. Toh (1995). "EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif." The Journal of biological chemistry **270**(22): 13503-13511.

- Munro, S. and H. R. Pelham (1987). "A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins." Cell **48**(5): 899-907.
- Nagler, D. K., T. Sulea and R. Menard (1999). "Full-length cDNA of human cathepsin F predicts the presence of a cystatin domain at the N-terminus of the cysteine protease zymogen." Biochemical and biophysical research communications **257**(2): 313-318.
- Nakamura, N., C. Rabouille, R. Watson, T. Nilsson, N. Hui, P. Slusarewicz, T. E. Kreis and G. Warren (1995). "Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130." The Journal of cell biology **131**(6 Pt 2): 1715-1726.
- Neculai, D., M. Schwake, M. Ravichandran, F. Zunke, R. F. Collins, J. Peters, M. Neculai, J. Plumb, P. Loppnau, J. C. Pizarro, A. Seitova, W. S. Trimble, P. Saftig, S. Grinstein and S. Dhe-Paganon (2013). "Structure of LIMP-2 provides functional insights with implications for SR-BI and CD36." Nature **504**(7478): 172-176.
- Nguyen, G., F. Delarue, C. Burckle, L. Bouzahir, T. Giller and J. D. Sraer (2002). "Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin." The Journal of clinical investigation **109**(11): 1417-1427.
- Oelbe, M. (2012). "LIMP2-Defizienz und das action myoclonus and renal failure (AMRF) syndrom."
- Ogata, S. and M. Fukuda (1994). "Lysosomal targeting of Limp II membrane glycoprotein requires a novel Leu-Ile motif at a particular position in its cytoplasmic tail." The Journal of biological chemistry **269**(7): 5210-5217.
- Ohashi, T. (2012). "Enzyme replacement therapy for lysosomal storage diseases." Pediatric endocrinology reviews : PER **10 Suppl 1**: 26-34.
- Ohkuma, S., Y. Moriyama and T. Takano (1982). "Identification and characterization of a proton pump on lysosomes by fluorescein-isothiocyanate-dextran fluorescence." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **79**(9): 2758-2762.
- Ondr, J. K. and C. T. Pham (2004). "Characterization of murine cathepsin W and its role in cell-mediated cytotoxicity." The Journal of biological chemistry **279**(26): 27525-27533.
- Oorni, K., M. Sneek, D. Bromme, M. O. Pentikainen, K. A. Lindstedt, M. Mayranpaa, H. Aitio and P. T. Kovanen (2004). "Cysteine protease cathepsin F is expressed in human atherosclerotic lesions, is secreted by cultured macrophages, and modifies low density lipoprotein particles in vitro." The Journal of biological chemistry **279**(33): 34776-34784.
- Oshima, Y., K. Kinouchi, A. Ichihara, M. Sakoda, A. Kurauchi-Mito, K. Bokuda, T. Narita, H. Kurosawa, G. H. Sun-Wada, Y. Wada, T. Yamada, M. Takemoto, M. A. Saleem, S. E. Quaggin and H. Itoh (2011). "Prorenin receptor is essential for normal podocyte structure and function." Journal of the American Society of Nephrology : JASN **22**(12): 2203-2212.
- Ozbabacan, S. E., H. B. Engin, A. Gursoy and O. Keskin (2011). "Transient protein-protein interactions." Protein engineering, design & selection : PEDS **24**(9): 635-648.
- Perandones, C., F. E. Micheli, L. A. Pellene, M. A. Bayly, S. F. Berkovic and L. M. Dibbens (2012). "A case of severe hearing loss in action myoclonus renal failure syndrome resulting from mutation in SCARB2." Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society **27**(9): 1200-1201.
- Pereira-Leal, J. B. and M. C. Seabra (2000). "The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily." Journal of molecular biology **301**(4): 1077-1087.
- Pfeffer, S. R. (2001). "Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function." Trends in cell biology **11**(12): 487-491.



- Phizicky, E. M. and S. Fields (1995). "Protein-protein interactions: methods for detection and analysis." Microbiological reviews **59**(1): 94-123.
- Platt, F. M. and R. H. Lachmann (2009). "Treating lysosomal storage disorders: current practice and future prospects." Biochimica et biophysica acta **1793**(4): 737-745.
- Poot, M., L. L. Gibson and V. L. Singer (1997). "Detection of apoptosis in live cells by MitoTracker red CMXRos and SYTO dye flow cytometry." Cytometry **27**(4): 358-364.
- Prescott, A. R., J. M. Lucocq, J. James, J. M. Lister and S. Ponnambalam (1997). "Distinct compartmentalization of TGN46 and beta 1,4-galactosyltransferase in HeLa cells." European journal of cell biology **72**(3): 238-246.
- Price, O. T., C. Lau and R. M. Zucker (2003). "Quantitative fluorescence of 5-FU-treated fetal rat limbs using confocal laser scanning microscopy and Lysotracker Red." Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology **53**(1): 9-21.
- Pryor, P. R., B. M. Mullock, N. A. Bright, M. R. Lindsay, S. R. Gray, S. C. Richardson, A. Stewart, D. E. James, R. C. Piper and J. P. Luzio (2004). "Combinatorial SNARE complexes with VAMP7 or VAMP8 define different late endocytic fusion events." EMBO reports **5**(6): 590-595.
- Ramser, J., F. E. Abidi, C. A. Burckle, C. Lenski, H. Toriello, G. Wen, H. A. Lubs, S. Engert, R. E. Stevenson, A. Meindl, C. E. Schwartz and G. Nguyen (2005). "A unique exonic splice enhancer mutation in a family with X-linked mental retardation and epilepsy points to a novel role of the renin receptor." Human molecular genetics **14**(8): 1019-1027.
- Reczek, D., M. Schwake, J. Schroder, H. Hughes, J. Blanz, X. Jin, W. Brondyk, S. Van Patten, T. Edmunds and P. Saftig (2007). "LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase." Cell **131**(4): 770-783.
- Repnik, U., V. Stoka, V. Turk and B. Turk (2012). "Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death." Biochimica et biophysica acta **1824**(1): 22-33.
- Rijnboutt, S., H. M. Aerts, H. J. Geuze, J. M. Tager and G. J. Strous (1991). "Mannose 6-phosphate-independent membrane association of cathepsin D, glucocerebrosidase, and sphingolipid-activating protein in HepG2 cells." The Journal of biological chemistry **266**(8): 4862-4868.
- Rossi, A., Q. Deveraux, B. Turk and A. Sali (2004). "Comprehensive search for cysteine cathepsins in the human genome." Biological chemistry **385**(5): 363-372.
- Ruggiero, A. M., Y. Liu, S. Vidensky, S. Maier, E. Jung, H. Farhan, M. B. Robinson, H. H. Sitte and J. D. Rothstein (2008). "The endoplasmic reticulum exit of glutamate transporter is regulated by the inducible mammalian Yip6b/GTRAP3-18 protein." The Journal of biological chemistry **283**(10): 6175-6183.
- Saftig, P. and J. Klumperman (2009). "Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function." Nature reviews. Molecular cell biology **10**(9): 623-635.
- Santamaria, I., G. Velasco, A. M. Pendas, A. Paz and C. Lopez-Otin (1999). "Molecular cloning and structural and functional characterization of human cathepsin F, a new cysteine proteinase of the papain family with a long propeptide domain." The Journal of biological chemistry **274**(20): 13800-13809.
- Santoro, D., B. E. Rosenbloom and A. H. Cohen (2002). "Gaucher disease with nephrotic syndrome: response to enzyme replacement therapy." American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation **40**(1): E4.
- Savalas, L. R., B. Gasnier, M. Damme, T. Lubke, C. Wrocklage, C. Debacker, A. Jezegou, T. Reinheckel, A. Hasilik, P. Saftig and B. Schroder (2011). "Disrupted in renal

- carcinoma 2 (DIRC2), a novel transporter of the lysosomal membrane, is proteolytically processed by cathepsin L." The Biochemical journal **439**(1): 113-128.
- Schmid, J., M. Oelbe, P. Saftig, M. Schwake and F. Schweda (2013). "Parallel regulation of renin and lysosomal integral membrane protein 2 in renin-producing cells: further evidence for a lysosomal nature of renin secretory vesicles." Pflugers Archiv : European journal of physiology **465**(6): 895-905.
- Schmidt, O. and D. Teis (2012). "The ESCRT machinery." Current biology : CB **22**(4): R116-120.
- Schoch, S., F. Deak, A. Königstorfer, M. Mozhayeva, Y. Sara, T. C. Sudhof and E. T. Kavalali (2001). "SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice." Science **294**(5544): 1117-1122.
- Schroen, B., J. J. Leenders, A. van Erk, A. T. Bertrand, M. van Loon, R. E. van Leeuwen, N. Kubben, R. F. Duisters, M. W. Schellings, B. J. Janssen, J. J. Debets, M. Schwake, M. A. Hoydal, S. Heymans, P. Saftig and Y. M. Pinto (2007). "Lysosomal integral membrane protein 2 is a novel component of the cardiac intercalated disc and vital for load-induced cardiac myocyte hypertrophy." The Journal of experimental medicine **204**(5): 1227-1235.
- Schulz, A., A. Kohlschütter, J. Mink, A. Simonati and R. Williams (2013). "NCL diseases - clinical perspectives." Biochimica et biophysica acta **1832**(11): 1801-1806.
- Schulze, H., T. Kolter and K. Sandhoff (2009). "Principles of lysosomal membrane degradation: Cellular topology and biochemistry of lysosomal lipid degradation." Biochimica et biophysica acta **1793**(4): 674-683.
- Schweneker, M., A. S. Bachmann and K. Moelling (2005). "JM4 is a four-transmembrane protein binding to the CCR5 receptor." FEBS letters **579**(7): 1751-1758.
- Scimeca, J. C., A. Franchi, C. Trojani, H. Parrinello, J. Grosgeorge, C. Robert, O. Jaillon, C. Poirier, P. Gaudray and G. F. Carle (2000). "The gene encoding the mouse homologue of the human osteoclast-specific 116-kDa V-ATPase subunit bears a deletion in osteosclerotic (oc/oc) mutants." Bone **26**(3): 207-213.
- Settembre, C., A. Fraldi, D. L. Medina and A. Ballabio (2013). "Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism." Nature reviews. Molecular cell biology **14**(5): 283-296.
- Shahwan, A., M. Farrell and N. Delanty (2005). "Progressive myoclonic epilepsies: a review of genetic and therapeutic aspects." The Lancet. Neurology **4**(4): 239-248.
- Shi, G. P., R. A. Bryant, R. Riese, S. Verhelst, C. Driessen, Z. Li, D. Bromme, H. L. Ploegh and H. A. Chapman (2000). "Role for cathepsin F in invariant chain processing and major histocompatibility complex class II peptide loading by macrophages." The Journal of experimental medicine **191**(7): 1177-1186.
- Sihn, G., A. Rousselle, L. Vilianovitch, C. Burckle and M. Bader (2010). "Physiology of the (pro)renin receptor: Wnt of change?" Kidney international **78**(3): 246-256.
- Smith, K. R., H. H. Dahl, L. Canafoglia, E. Andermann, J. Damiano, M. Morbin, A. C. Bruni, G. Giaccone, P. Cossette, P. Saftig, J. Grotzinger, M. Schwake, F. Andermann, J. F. Staropoli, K. B. Sims, S. E. Mole, S. Franceschetti, N. A. Alexander, J. D. Cooper, H. A. Chapman, S. Carpenter, S. F. Berkovic and M. Bahlo (2013). "Cathepsin F mutations cause Type B Kufs disease, an adult-onset neuronal ceroid lipofuscinosis." Human molecular genetics **22**(7): 1417-1423.
- Soldati, T., C. Rancano, H. Geissler and S. R. Pfeffer (1995). "Rab7 and Rab9 are recruited onto late endosomes by biochemically distinguishable processes." The Journal of biological chemistry **270**(43): 25541-25548.
- Sollner, T., S. W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst and J. E. Rothman (1993). "SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion." Nature **362**(6418): 318-324.

- Steenhuis, P., J. Froemming, T. Reinheckel and S. Storch (2012). "Proteolytic cleavage of the disease-related lysosomal membrane glycoprotein CLN7." Biochimica et biophysica acta **1822**(10): 1617-1628.
- Su, A. I., T. Wiltshire, S. Batalov, H. Lapp, K. A. Ching, D. Block, J. Zhang, R. Soden, M. Hayakawa, G. Kreiman, M. P. Cooke, J. R. Walker and J. B. Hogenesch (2004). "A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(16): 6062-6067.
- Sutton, R. B., D. Fasshauer, R. Jahn and A. T. Brunger (1998). "Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution." Nature **395**(6700): 347-353.
- Taelman, V. F., R. Dobrowolski, J. L. Plouhinec, L. C. Fuentealba, P. P. Vorwald, I. Gumper, D. D. Sabatini and E. M. De Robertis (2010). "Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes." Cell **143**(7): 1136-1148.
- Tamai, M., C. Yokoo, M. Murata, K. Oguma, K. Sota, E. Sato and Y. Kanaoka (1987). "Efficient synthetic method for ethyl (+)-(2S,3S)-3-[(S)-3-methyl-1-(3-methylbutylcarbamoyl)butylcarbamoyl]-2-oxiranecarboxylate (EST), a new inhibitor of cysteine proteinases." Chemical & pharmaceutical bulletin **35**(3): 1098-1104.
- Tanaka, Y., G. Guhde, A. Suter, E. L. Eskelinen, D. Hartmann, R. Lullmann-Rauch, P. M. Janssen, J. Blanz, K. von Figura and P. Saftig (2000). "Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice." Nature **406**(6798): 902-906.
- Tang, C. H., J. W. Lee, M. G. Galvez, L. Robillard, S. E. Mole and H. A. Chapman (2006). "Murine cathepsin F deficiency causes neuronal lipofuscinosis and late-onset neurological disease." Molecular and cellular biology **26**(6): 2309-2316.
- Thomas, D. B. (2009). "Focal segmental glomerulosclerosis: a morphologic diagnosis in evolution." Archives of pathology & laboratory medicine **133**(2): 217-223.
- Trimble, W. S., T. S. Gray, L. A. Elferink, M. C. Wilson and R. H. Scheller (1990). "Distinct patterns of expression of two VAMP genes within the rat brain." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **10**(4): 1380-1387.
- Turk, B., D. Turk and V. Turk (2000). "Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers." Biochimica et biophysica acta **1477**(1-2): 98-111.
- Turk, V., V. Stoka, O. Vasiljeva, M. Renko, T. Sun, B. Turk and D. Turk (2012). "Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers." Biochimica et biophysica acta **1824**(1): 68-88.
- Turk, V., B. Turk and D. Turk (2001). "Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities." The EMBO journal **20**(17): 4629-4633.
- Umezawa, H. (1976). "Structures and activities of protease inhibitors of microbial origin." Methods in enzymology **45**: 678-695.
- Uyama, E., S. Araki, S. Kawasaki, R. Okamura and M. Owada (1987). "[Three adult siblings of Gaucher's disease with corneal opacities, deafness, valvular heart disease, deformed toes, communicating hydrocephalus and leptomeningeal thickening]." Rinsho shinkeigaku = Clinical neurology **27**(10): 1248-1255.
- Vega, M. A., F. Rodriguez, B. Segui, C. Cales, J. Alcalde and I. V. Sandoval (1991). "Targeting of lysosomal integral membrane protein LIMP II. The tyrosine-lacking carboxyl cytoplasmic tail of LIMP II is sufficient for direct targeting to lysosomes." The Journal of biological chemistry **266**(25): 16269-16272.
- Veinot, J. P., D. Elstein, D. Hanania, A. Abrahamov, S. Srivatsa and A. Zimran (1999). "Gaucher's disease with valve calcification: possible role of Gaucher cells, bone matrix proteins and integrins." The Canadian journal of cardiology **15**(2): 211-216.

- Vento, M. T., V. Zazzu, A. Loffreda, J. R. Cross, J. Downward, M. P. Stoppelli and I. Iaccarino (2010). "Prpf2 is a novel Bcl-xL/Bcl-2 interacting protein with the ability to modulate survival of cancer cells." *PloS one* **5**(12): e15636.
- Wang, B., G. P. Shi, P. M. Yao, Z. Li, H. A. Chapman and D. Bromme (1998). "Human cathepsin F. Molecular cloning, functional expression, tissue localization, and enzymatic characterization." *The Journal of biological chemistry* **273**(48): 32000-32008.
- Wang, R. Y., O. A. Bodamer, M. S. Watson and W. R. Wilcox (2011). "Lysosomal storage diseases: diagnostic confirmation and management of presymptomatic individuals." *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* **13**(5): 457-484.
- Weber, T., B. V. Zemelman, J. A. McNew, B. Westermann, M. Gmachl, F. Parlati, T. H. Sollner and J. E. Rothman (1998). "SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion." *Cell* **92**(6): 759-772.
- Wex, T., B. Levy, H. Wex and D. Bromme (2000). "Human cathepsins W and F form a new subgroup of cathepsins that is evolutionary separated from the cathepsin B- and L-like cysteine proteases." *Advances in experimental medicine and biology* **477**: 271-280.
- Wilke, S., J. Krausze and K. Bussow (2012). "Crystal structure of the conserved domain of the DC lysosomal associated membrane protein: implications for the lysosomal glycoalyx." *BMC biology* **10**: 62.
- Yamayoshi, S., K. Fujii and S. Koike (2012). "Scavenger receptor b2 as a receptor for hand, foot, and mouth disease and severe neurological diseases." *Frontiers in microbiology* **3**: 32.
- Yamayoshi, S., S. Iizuka, T. Yamashita, H. Minagawa, K. Mizuta, M. Okamoto, H. Nishimura, K. Sanjoh, N. Katsushima, T. Itagaki, Y. Nagai, K. Fujii and S. Koike (2012). "Human SCARB2-dependent infection by coxsackievirus A7, A14, and A16 and enterovirus 71." *Journal of virology* **86**(10): 5686-5696.
- Yamayoshi, S., Y. Yamashita, J. Li, N. Hanagata, T. Minowa, T. Takemura and S. Koike (2009). "Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71." *Nature medicine* **15**(7): 798-801.
- Yco, L. P., D. Geerts, J. Koster and A. S. Bachmann (2013). "PRAF2 stimulates cell proliferation and migration and predicts poor prognosis in neuroblastoma." *International journal of oncology* **42**(4): 1408-1416.
- Yoshikawa, A., Y. Aizaki, K. Kusano, F. Kishi, T. Susumu, S. Iida, S. Ishiura, S. Nishimura, M. Shichiri and T. Senbonmatsu (2011). "The (pro)renin receptor is cleaved by ADAM19 in the Golgi leading to its secretion into extracellular space." *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* **34**(5): 599-605.
- Yoshimori, T., A. Yamamoto, Y. Moriyama, M. Futai and Y. Tashiro (1991). "Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells." *The Journal of biological chemistry* **266**(26): 17707-17712.
- Zachos, C. (2012). "Untersuchungen zur pH-Wert-Abhängigkeit des lysosomalen integralen Membranproteins Typ 2 als Transportrezeptor."
- Zachos, C., J. Blanz, P. Saftig and M. Schwake (2012). "A critical histidine residue within LIMP-2 mediates pH sensitive binding to its ligand beta-glucocerebrosidase." *Traffic* **13**(8): 1113-1123.
- Zhao, Y., J. Ren, S. Padilla-Parra, E. E. Fry and D. I. Stuart (2014). "Lysosome sorting of beta-glucocerebrosidase by LIMP-2 is targeted by the mannose 6-phosphate receptor." *Nature communications* **5**: 4321.

Zoncu, R., L. Bar-Peled, A. Efeyan, S. Wang, Y. Sancak and D. M. Sabatini (2011). "mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase." Science **334**(6056): 678-683.

## 9 Material

### 9.1 Labormaterialien

#### 9.1.1 Geräte

Agarosegeldokumentationsanlage, Gel Jet Imager	Intas, Göttingen, D
Agarosegelelektrophoresekammer, Modell H5	Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, US
Analysenwaage	Kern & Sohn, Durrwangen, D
Autoklav	Tecnomara Integra Bioscience, Fernwald, D
Chemilumineszenzkamera LAS-4000	Fujifilm, Carrollton, US
DNA-Photometer, GeneQuant pro	Biochrom Ltd, Cambridge UK
Elektroporationsgerät Gene Pulser™	BioRad, München, D
Fluoreszenzmikroskop, Axiovert 200M	Zeiss, Jena, D
Homogenisator, Precellys 24	Peqlab, Erlangen, D
Horizontalschüttler, RM 5	Assistent, Sondheim, D
Inkubator Zell- und Gewebekulturen HERAcell 150	Heraeus, Hanau, D
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop, FluoView 1000	Olympus, Hamburg, D
BX50 Mikroskop	Olympus, Hamburg, DE
Lichtmikroskop, T1-SNCP	Nikon Corporation Instrument Company, Japan
Luminometer, GLOMAX	Promega Mannheim, D
Mikropipetten	Gilson, Middleton, US Eppendorf, Hamburg, D
Mikrowellenherd	Panasonic Deutschland, Hamburg, D
96-Loch-Mikrotiterplattenleser, Gen5	Biotek Instruments, Bad Friedrichshall, D
PCR-Cycler, GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA
pH-Elektrode	Krick, Langenselbold, D
Pipetboy	Integra Bioscience, Fernwald, D
Real Time PCR LightCycler® LC480	Roche, Mannheim, D
SW40 swinging bucket rotor	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, D
SDS-PAGE-Elektrophoresekammer	Mini-Protean 3-Elektrophorese-System, BioRad, München, D
Semi-Dry-Blot-Apparatur	BioRad, München, D
Spannungsquelle	PowerPac 200/300, BioRad, München, D
Sterilbank	Laminar Flow Bioflow, Clan LAF, Meckenheim, D
Tank-Blot-Apparatur	BioRad, München, D
Thermoblock Thermomixer	5436, Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifuge	5415C, Eppendorf, Hamburg, D

Type 70.1 Ti Rotor	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, D
Ultraschallbad, Branson Sonifier 450	Heinemann, Schwabisch Gmünd, D
Ultrazentrifuge, Optima TLX, TLA 55 Rotor	Beckman, Fullerton, USA
Vortexer	Heidolph, Schwabach, D
Waage	Ohaus, Parsippany, USA
Wasserbad	GFL, Burgwedel, D
Ultrazentrifuge, J2-HS	Beckman, Fullerton, CA
Zentrifuge, Multifuge 3SR+	Heraeus, Hanau, D
Zentrifuge, Universal 32	Hettich, Tuttlingen, D

### 9.1.2 Materialien

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

### 9.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Enzyme

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Roth (Karlsruhe), Roche (Mannheim) oder Sigma Aldrich (Steinheim) erworben. Materialien für Klonierungsexperimente (DNA Polymerasen, Restriktionsenzyme und Marker) wurden von Fermentas (St. Leon-Rot) gekauft.

Agarose	Lonza, Köln,
Ampicillin	Melford Laboratories, Chelsworth, U
Bromphenolblau	Canalco, Bethesda, MD, U
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt, D
DMEM high Glucose	PAA, Laboratories, Linz, A
DMSO (Dimethyl-Sulfoxid)	Serva, Heidelberg, D
Dynabeads® Protein G	Invitrogen, Karlsruhe, D
Endoglycosidase H	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
EST (E-64-d)	Enzo Life Science, Farmingdale, USA
FCS	PAA, Laboratories, Linz, A
Fugene® HD Transfektions Reagenz	Roche AG, Basel, Schweiz
Genetecin G418	PAA, Laboratories, Linz, A
Lipofectamin2000R	Invitrogen, Karlsruhe, D
<i>Lysotracker Red DND-99</i>	Invitrogen, Karlsruhe, D
MG-132	Merck, Darmstadt, D
Mitotracker ®	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Mowiol	Calbiochem, LaJolla CA, US
N-Glykosidase F (PNGase F)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
4-Nitrophenyl $\beta$ -D-glucopyranoside	Sigma Aldrich, Steinheim, D
p-Nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosiminid	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Paraformaldehyd, $\geq 95$ %	Fluka, Buchs, Schweiz
Penicillin/Streptomycin	PAA-Laboratories, Linz, A
Polyethylenimin (PEI)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Pepstatin A 100X	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Puromycin	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Tetrazyklin	Merck, Darmstadt, D

### 9.1.4 Kits und Fertiggele

BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Rockford, US
DAB staining Kit	Vector Laboratories, Enzo Life Sciences, Lörrach, D
Dual Luciferase® Reporter Assay Kit	Promega, Mannheim, D



ECL Advanced Western Blot Detection System	Amersham, Little Chalfont, UK
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
PureYield Plasmid Midiprep System	Promega, Mannheim, D
Plasmid Miniprep Kit	Fermentas, St. Leon-Rot, D
LightCycler 480 Probe Master	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
NucleoSpin® RNA Isolierung	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, D
First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gele 1,5mm 15 well	Life Technologies, Darmstadt, D
NuPAGE®-MES SDS Running Buffer (20x)	
Silver Stain Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vector Laboratories ABC Kit	Vector Laboratories, Enzo Life Sciences, Lörrach, D

## 9.2 Antikörper

### 9.2.1 Primärantikörper

Name	Hergestellt in	Gegen (Protein, Spezies)	WB-Verdünnung	IF-Verdünnung	Bezugsquelle
$\alpha$ -Aktin	Kaninchen	Aktin (human, murin)	1:1000		Sigma Aldrich, Steinheim, D
EEA1	Kaninchen	Early Endosome Antigen1 (human, murin)		1:100	Cell Signaling, Boston, US
$\alpha$ -GC8E4	Maus	$\beta$ -Glukocerebrosidasa (murin, human)	1:1000	nicht möglich	Hans Aerts, Academic Medical Center Amsterdam, NL
$\alpha$ -GM130	Maus	Golgi-Membranprotein 130 (human, murin)		1:100	BD Bioscience, Heidelberg, D
$\alpha$ -HA (POD-gekoppelt)	Ratte	Haemagglutinin (Influenza)	1:500	1:100	Roche, Mannheim, D
$\alpha$ -KDEL	Maus	ER- Retentionssignal (Säuger, Vögel)		1:100	Biomol, Hamburg, D
$\alpha$ -LAMP-2-H4B4	Maus	Lysosomal-assoziiertes Membranprotein-2 (human)	1:1000	1:100	DSHB, Iowa, US
$\alpha$ -LIMP-2 T2	Kaninchen	Lysosomales integrales Membranprotein Typ-2 (human, murin)	1:1000	1:250	Pineda, Berlin, D

M6PR	Kaninchen	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (human, murin)		1:100	S. Markmann, UKE, Hamburg, D
$\alpha$ -myc-9B11	Maus	c-myc	1:1000	1:250	Cell Signaling, Boston, US
$\alpha$ -myc-GTX	Ziege	c-myc	1:1000	1:250	Genetex, Cambridge, UK
$\alpha$ -PDI-Sc	Kaninchen	Protein-Disulfid-Isomerase, Säuge		1:50	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, US
PRAF2 (JM4)	Kaninchen	PRA 1 domain family member 2 (human, murin)	1:1000	1:100	Abcam plc, Cambridge, UK
$\alpha$ -PRR-ct	Kaninchen	Prorenin Rezeptor (human, murin)	1:100	nicht möglich	Pineda., Berlin, D
$\alpha$ -PRR-nt (ATP6AP2)	Kaninchen	Prorenin Rezeptor (human, murin)	1:1000	nicht möglich	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Rab7	Kaninchen	Ras-related Protein Rab-7 (human)		1:250	Cell Signaling, Boston, US
SP1	Kaninchen	Transkriptionsfaktor SP1 (human, murin)		1:250	Merck Millipore, Darmstadt, D
TGN46	Schaf	Trans-Golgi-Network Protein 46 (human)		1:100	S. Markmann, UKE, Hamburg, D
VAMP-2	Maus	Vesicle-associated membrane protein 2 (murin)	1:1000	1:100 (murine neuronale Zellen, keine Gewebe)	Synaptic Systems GmbH, Göttingen, D

### 9.2.2 Sekundärantikörper

Name	Hergestellt in	Gegen (Protein, Spezies)	WB-Verdünnung	IF-Verdünnung	Bezugsquelle
$\alpha$ -Kaninchen-HRP	Schaf	Kaninchen IgG	1:10000		Dianova GmbH, Hamburg, D
$\alpha$ -Maus-HRP	Schaf	Maus IgG	1:10000		Dianova GmbH, Hamburg, D
$\alpha$ -Ratte-HRP	Kaninchen	Ratte IgG	1:10000		Dianova GmbH, Hamburg, D
$\alpha$ -Ziege-HRP	Kaninchen	Ziege IgG	1:10000		Abcam plc, Cambridge, UK
$\alpha$ -Kaninchen	Esel	Kaninchen		1:500	Invitrogen,

Alexa Fluor 488					Karlsruhe, D
$\alpha$ -Kaninchen Alexa Fluor 594	Ziege	Kaninchen		1:500	Invitrogen, Karlsruhe, D
$\alpha$ -Kaninchen Alexa Fluor 647	Ziege	Kaninchen		1:500	Invitrogen, Karlsruhe, D
$\alpha$ -Ratte Alexa Fluor 488	Esel	Ratte		1:500	Invitrogen, Karlsruhe, D
$\alpha$ -Ratte Alexa Fluor 594	Ziege	Ratte		1:500	Invitrogen, Karlsruhe, D
$\alpha$ -Ratte Alexa Fluor 647	Ziege	Ratte		1:500	Invitrogen, Karlsruhe, D
$\alpha$ -Maus Alexa Fluor 488	Ziege	Maus		1:500	Invitrogen, Karlsruhe, D
$\alpha$ -Maus Alexa Fluor 594	Esel	Maus		1:500	Invitrogen, Karlsruhe, D
$\alpha$ -Maus Alexa Fluor 647	Ziege	Maus		1:500	Invitrogen, Karlsruhe, D
$\alpha$ -Human Alexa Fluor 488	Ziege	Mensch		1:500	Invitrogen, Karlsruhe, D
$\alpha$ -Schaf Alexa Fluor 488	Esel	Schaf		1:500	Invitrogen, Karlsruhe, D
$\alpha$ -Ziege Alexa Fluor 488	Esel	Ziege		1:500	Invitrogen, Karlsruhe, D
$\alpha$ -Ziege Alexa Fluor 594	Esel	Ziege		1:500	Invitrogen, Karlsruhe, D
$\alpha$ -Ziege Alexa Fluor 647	Kaninchen	Ziege		1:500	Invitrogen, Karlsruhe, D
$\alpha$ -Mouse biotinyliert	Ziege	Maus		1:500	Abcam, Cambridge, UK

### 9.3 Zelllinien

Name	Beschreibung	Referenz
Cos7	Nierenzellen der grünen Meerkatze ( <i>Cercopithecus aethiops</i> ), SV-40 immortalisiert	DMSZ, Braunschweig, D

HEK293	Humane Nierengewebszellen, Adenovirus-immortalisiert	ATTC, Wesel, D
L-Zellen	Murine embryonale Fibroblasten	Madelon Maurice, CMC Utrecht, NL
Wnt-3a Zellen	Murine embryonale Fibroblasten, stabile Überexpression des Wnt3a- Gens, Zeomycin-Resistenz auf transfiziertem Vektor	Madelon Maurice, CMC Utrecht, NL
LIMP-2 WT 583-2	Murine embryonale Fibroblasten, spontan immortalisiert	AG Saftig
LIMP-2 KO 583-3	Murine embryonale Fibroblasten mit einer LIMP-2 Defizienz spontan immortalisiert	AG Saftig
N2a	murine Neuroblastoma Zellen	AG Saftig
SH-SY5Y	humane Neuroblastoma Zellen	ATTC, Wesel, D
AMRF EH	humane Fibroblasten von AMRF Patienten (Familie A)	(Berkovic et al. 2008)
AMRF OR	humane Fibroblasten von AMRF Patienten (Familie B)	(Berkovic et al. 2008)
Humane Fibroblasten	humane Fibroblasten von Kontrollpersonen	(Berkovic et al. 2008)
a3 WT MEF	Murine embryonale Fibroblasten, immortalisiert	AG Saftig
a3 KO MEF	Murine embryonale Fibroblasten, mit einer v-ATPase Untereinheit a3 Defizienz, immortalisiert	AG Saftig
PRR WT MEF	Murine embryonale Fibroblasten, SV40 immortalisiert	AG Saftig
PRR KO MEF	Murine embryonale Fibroblasten, mit einer Prorenin Rezeptor Defizienz, SV40 immortalisiert	AG Saftig

#### 9.4 Rekombinante Proteine

hLIMP-2 LD	Luminale Domäne von humanem LIMP-2 mit C- terminal fusioniertem humanem IgG	R&D Systems, Minneapolis, USA	gelöst zu 100µg/ml in PBS
hCathepsin F	aktives humanes Cathepsin F Protein	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, D	bereits in Lösung

## 9.5 Oligonukleotide, Vektoren, Plasmide

### 9.5.1 Expressionsvektoren

#### 9.5.1.1 pEGFP-N1

Der pECFP-N1 Vektor beinhaltet das Gen für die Expression einer Variante des GFP (green fluorescent protein) Proteins in Säugerzellen. Der Vektor besitzt eine bakterielle Kanamycin Resistenz und eine Neomycinresistenz zur Selektion in Eukaryonten.

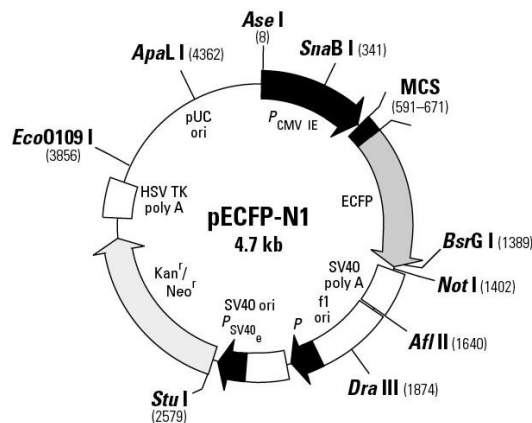


Abb. 73 Vektorkarte des pECFP-N1 Vektors (Addgene).

#### 9.5.1.2 pCI-neo

Der pCI-neo Vektor dient der konstitutiven Expression der inserierten cDNA in Säugerzellen. Als Promotor dient das *human cytomegalovirus* (CMV) Motif. Die Neomycin Resistenz kann als Selektion in Säugerzellen genutzt werden, wobei die Ampicillin der selektiven Amplifikation in Bakterienzellen dient. Multiple Klonierungsstellen machen die Insertion des gewünschten Gens nach dem Promotor möglich.

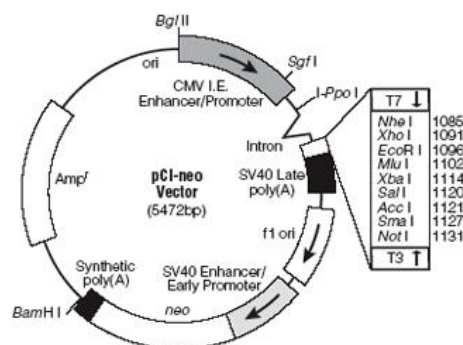


Abb. 74 Vektorkarte des pCI-neo Vektors (genemol.org)

### 9.5.1.3 pcDNA3.1 und der pFrog Vektor

Der pcDNA3.1 Vektor ist ebenfalls durch den CMV Vektor in der Lage konstitutiv ein inseriertes Gen in Säugerzellen zu exprimieren. Die Ampicillin Resistenz dient der Amplifikation des Vektors in *E.coli* und Neomycin kann als Selektionsmarker in Säugerzellen verwendet werden. Vektoren können sich in ihren Restriktionsschnittstellen in der sogenannten *multiple cloning site* unterscheiden (+/-)

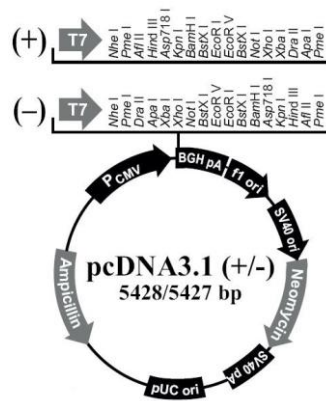


Abb. 75 Vektorkarte des pCI-neo Vektors (Xenbase)

Der pFrog Vektor ist ein Derivat des pcDNA3.1 Vektors und wurde von Prof. Dr. Dr. T. J. Jentsch hergestellt.

### 9.5.1.4 pcDNA4TO

Der pcDNA4TO Vektor besitzt wie der pcDNA3.1 Vektor einen CMV Promotor zur Genexpression in Säugerzellen. Die Selektion kann in Säugerzellen mittels Zeomycin stattfinden und in Bakterien kann eine selektive Amplifikation mittels Ampicillin erfolgen.

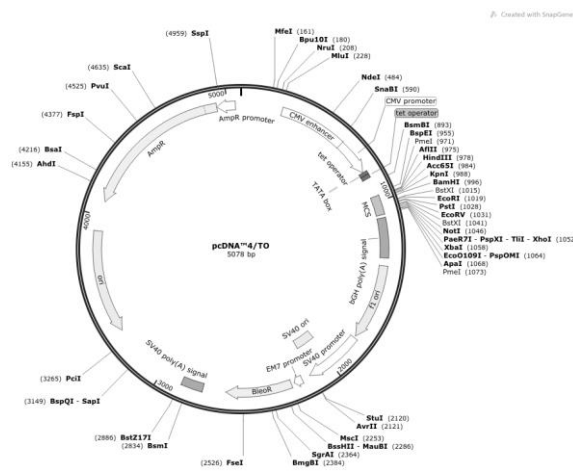


Abb. 76 Vektorkarte des pcDNA4TO Vektors (snappene).

### 9.5.1.5 pGL4

pGL4 Vektoren werden von Promega (Madison, USA) angeboten, um vor allem lumineszierende Proteine in Säugerzellen zu exprimieren. Die Vektoren können verschiedene Selektionsmarker und Restriktionsschnittstellen beinhalten, wobei sie zur Amplifikation in Bakterienzellen eine Ampicillinresistenz besitzen.

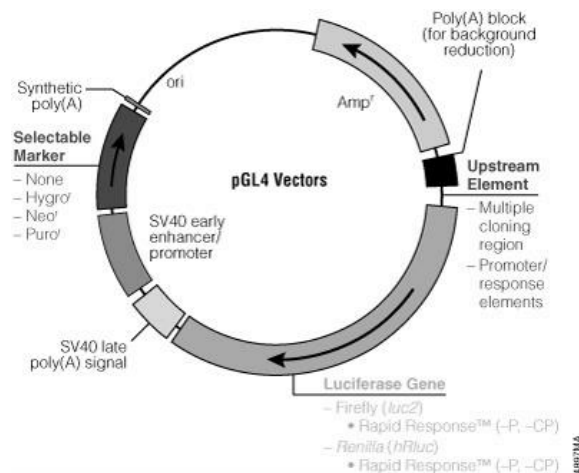


Abb. 77 Vektorkarte des pGL4 Vektors (Promega).

### 9.5.2 Konstrukte

Bezeichnung	Vektor	Resistenz		Exprimiertes Protein	Herkunft
		(in	E.coli)		
hLIMP2-3*Flag	pcDNA4TO	Amp		Humanes LIMP-2 Protein	AG Saftig
mLIMP-2-myc	pFrog	Amp		Murines LIMP-2 Protein	AG Saftig
mLIMP-2-HA	pFrog	Amp		Murines LIMP-2 Protein	AG Saftig
GFP	pECFP-N1	Kan		GFP Protein	Addgene, Cambridge, UK
mLIMP-2-LD-HA	pFrog	Amp		Murine LIMP-2 luminale Domäne (aa 35-430) mit $\beta$ -GC Signalepeptid	AG Saftig
mLIMP-2-LD-myc	pFrog	Amp		Murine LIMP-2 luminale Domäne (aa 35-430) mit $\beta$ -GC Signalepeptid	AG Saftig
mLIMP-2 DDD Helix 5-myc	pFrog	Amp		Murines LIMP-2 mit Mutationen L155D/I156D/L160D	AG Saftig
mLIMP-2 DDD Helix 7-myc	pFrog	Amp		Murines LIMP-2 mit Mutationen I184D/L187D/F191D	AG Saftig
mLIMP-2 DDD Helix 5/7-	pFrog	Amp		Murines LIMP-2 mit Mutationen	AG Saftig

myc			L155D/I156D/L160D/ I184D/L187D/F191D	
mLIMP-2-LD DDD Helix 5/7-myc	pFrog	Amp	Murine LIMP-2 luminale Domäne (aa 35-430) mit $\beta$ -GC Signalepeptid und Mutationen L155D/I156D/L160D/ I184D/L187D/F191D	AG Saftig
mLIMP-2-LD DDD Helix 5/7-HA	pFrog	Amp	Murine LIMP-2 luminale Domäne (aa 35-430) mit $\beta$ -GC Signalepeptid und Mutationen L155D/I156D/L160D/ I184D/L187D/F191D	AG Saftig
mPRAF2-HA	pFrog	Amp	Murines PRAF2 Protein	Eigene Herstellung
mLIMP-2-ER-myc	pFrog	Amp	Murines LIMP-2 mit einem ER Retentionsmotif	AG Saftig
hVAMP-2-myc	pFrog	Amp	Humanes VAMP-2 Protein	Eigene Herstellung
mLIMP-2- $\Delta$ LB-myc	pFrog	Amp	Murines LIMP-2 Protein mit der Mutation $\Delta$ aa92-235	Friederike Zunke
mPRR-HA	pFrog	Amp	Muriner Proreninrezeptor	AG Saftig
mLAMP-1	pCl-neo	Amp	Murines LAMP-1 Protein	AG Saftig
mLIMP-2 I156D-myc	pFrog	Amp	Murines LIMP-2 Protein mit der Mutation I156D	AG Saftig
hCathF-HA	pFrog	Amp	Humanes Cathepsin F Protein	AG Saftig
hCathF-myc	pFrog	Amp	Humanes Cathepsin F Protein	AG Saftig
hCathF-C295A-HA	pFrog	Amp	Humanes Cathepsin F Protein mit der Mutation C295A	AG Saftig
hCathF-C295A-myc	pFrog	Amp	Humanes Cathepsin F Protein mit der Mutation C295A	AG Saftig
hCathW-HA	pFrog	Amp	humanes Cathepsin W Protein	AG Saftig
mCathL	pcDNA3.1	Amp	Murines Cathepsin L Protein	AG Saftig
LIMP-2-L155D-myc	pFrog	Amp	Murines LIMP-2 mit der Mutation L155D	AG Saftig
LIMP-2-M159D-myc	pFrog	Amp	Murines LIMP-2 mit der Mutation M159D	AG Saftig
LIMP-2-L160D-myc	pFrog	Amp	Murines LIMP-2 mit der Mutation L160D	AG Saftig
LIMP-2-A162D-myc	pFrog	Amp	Murines LIMP-2 mit der Mutation A162D	AG Saftig



LIMP-2-Y163D-myc	pFrog	Amp	Murines LIMP-2 mit der Mutation Y163D	AG Saftig
LIMP-2-K166D-myc	pFrog	Amp	Murines LIMP-2 mit der Mutation K166D	AG Saftig
LIMP-2-L187D-myc	pFrog	Amp	Murines LIMP-2 mit der Mutation L187D	AG Saftig
LIMP-2-F191D-myc	pFrog	Amp	Murines LIMP-2 mit der Mutation F191D	AG Saftig
hCathF c.954ΔC-myc	pFrog	Amp	Humanes Cathepsin F mit der Mutation S480L	AG Saftig
hCathF S480L-myc	pFrog	Amp	Humanes Cathepsin F mit der Mutation c.954ΔC	AG Saftig
hCathF G458A-myc	pFrog	Amp	Humanes Cathepsin F mit der Mutation G458A	AG Saftig
hCathF Q321R-myc	pFrog	Amp	Humanes Cathepsin F mit der Mutation Q321R	AG Saftig
hCathF Y231C-myc	pFrog	Amp	Humanes Cathepsin F mit der Mutation Y231C	AG Saftig
pGL4-TOPflash	Amp	pGL4	Vektor mit TCF/LEF Promotor und Firefly Luziferase Gen	Promega, Madison, USA
pGL4-FOPflash	Amp	pGL4	Vektor mit mutiertem TCF/LEF Promotor und Firefly Luziferase Gen	Promega, Madison, USA
pGL4-Renilla	Amp	pGL4	Vektor mit konstitutiv exprimiertem Renilla Gen	Promega, Madison, USA
hβ-GC	Amp	pFrog	Humanes β-Glukocerebrosidase Protein	AG Saftig

### 9.5.3 Klonierungsprimer

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
PRAF2 HindIII	GATGAAGCTTATGTCCGAGGTGCGG
PRAF2 BAMHI	GATCGGATCCAGCTTCCTGCTCCT
VAMP-2_HindIII	ATGAAGCTTATGTCCGGCTACCGCT
VAMP-2_BamHI	ATGGGATCCAGTGCTGAAGTAAACGATG
pFrog Sequenzierungsprimer hin	GAGAACCCACTGCTTACTGG
pFrog Sequenzierungsprimer rück	GAGACTCCATTCGGGTGTTCT

### 9.5.4 Primer für die qRT-PCR

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Zu verwendende Probe (LC480 Roche)
hAxi2_left	GCTGACGGATGATTCCATGT	56
hAxi2_right	ACTGCCACACGATAAAGGAG	56
mAxi2_left	GAGAGTGAGCGGCAGAGC	96
mAxi2_right	CGGCTGACTCGTTCTCCT	96
mPRR_left	GGGTGGATAAACTGGCACTTC	27
mPRR_right	TGGAATTTGCAACGCTGTC	27

### 9.6 Computer Software

Adobe Photoshop Elements	Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
Adobe Illustrator	Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
DNASTAR Lasergene 8 (EditSeq / Seqman)	DNASTAR, Inc., Madison, WI USA
EndNoteX4	Thomson Reuters, Carlsbad, CA
FV10-ASW 2.0 bzw. 3.0	Olympus, Hamburg, D
Microsoft Office 2007 und 2010	Microsoft Dt. GmbH, Unterschleißheim
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
ImageJ	<a href="http://rsbweb.nih.gov/ij/">http://rsbweb.nih.gov/ij/</a>

### 9.7 Puffer, Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Allgemeine Puffer	
Blockierungslösung (CoIP)	1x PBS 1 % BSA
EBC-Puffer	120 mM NaCl 50 mM Tris/HCl 1 % NP-40 1x complete Proteaseinhibitor pH 7,4
10x PBS	1,37 M NaCl 27 mM KCl 20 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O pH 6,8
LB-Agar	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-yeast-Extrakt

	10 g NaCl 15 g/L Bacto-agar ad 1000 ml H <sub>2</sub> O pH 7,
LB-Medium	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-yeast-Extrakt 10 g NaCl ad 1000 ml H <sub>2</sub> O pH 7,4
50 x TAE-Puffer	2 M Tris 2 M Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA ad 1000 ml H <sub>2</sub> O pH 8,0-8,5
Lysispuffer	1x PBS 1,0 % Triton X-100 1x complete Proteaseinhibitor pH 7,4
TBS/PI	10 mM Tris/HCl pH 7,4, 150 mM NaCl 1x Complete (Roche) pro 50ml 1x Pefabloc (Sigma Aldrich) pro 50 ml 5 mM EDTA 1 % Triton-X 100
<b>Zellkultur</b>	
Einfrriermedium	1 % Penicillin/ Streptomycin 20 % DMSO 30 % FCS in DMEM high Glucose
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glukose (4.5 g/ml)	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
RPMI Medium 1640 für humane Fibroblasten	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
Zellkulturmedium Standard	500 ml DMEM high Glucose 50 ml FCS 5 ml Penicillin/ Streptomycin
<b>Western Blotting</b>	
Blockierlösung (WB)	1 x TBS-T 2 % Milchpulver
10x Elektrodenpuffer	1,92 M Glycerin

	250 mM Tris 35 mM SDS
SDS-Sammelgelpuffer	500mM Tris 0,4% SDS pH 6,8
SDS-Trenngelpuffer	1500mM Tris 0,4% SDS pH 8,8
4x Lämmli	40% Glycerin 4% SDS 500 mM Tris (pH 6,8) 0,02% Bromphenolblau 400 mM DTT
10x TBS	150 mM NaCl 25 mM Tris pH 7,4
1x TBST	1 ml Tween-20 100ml 10x TBS ad 1000ml H <sub>2</sub> O
10x Transferpuffer Tank-Blot	250 mM Tris 2 M Glycin ad 2000 ml H <sub>2</sub> O pH 8,3
1x Transferpuffer Tank-Blot	200 ml 10 x Tank-Blot-Puffer 400 ml Methanol ad 2000 ml H <sub>2</sub> O
Strippingpuffer	20 ml 10 %-iges SDS in H <sub>2</sub> O 6,25 ml 1 M Tris/HCl (pH 6,8) 0,83 ml 2-Mercaptoethanol 73 ml H <sub>2</sub> O
Sammelgel (für 4 Gele Mini Protean Systems)	1,35 ml Sammelgelpuffer 1,75 ml 30 %-iges Acrylamid mit 0,8 % Bisacrylamid (37,6 : 1) 6,75 ml H <sub>2</sub> O 60 µl 10 %-iges APS 30 µl 100 %-iges Temed
Trenngel (für 12,5 % Acrylamid, 1x Mini Protean Systems)	2,6 ml Trenngelpuffer 4,2 ml 30 %-iges Acrylamid mit 0,8 % Bisacrylamid (37,6 : 1) 3,1 ml H <sub>2</sub> O 60 µl 10 %-iges APS 30 µl 100 %-iges Temed

Mikroskopie	
DABCO-Stammlösung	1x PBS 200 mg/ml Diazobicycloctan
Blockierpuffer 1	0,12% Glycin
	0,2% Saponin / PBS
Blockierpuffer 2	10% FCS
	0,2% Saponin / PBS
Einbettmedium	1x PBS
	17 % Mowiol
	33 % Glycerol
	50 mg/ml DABCO
	eventuell 1µg/ml DAPI
Fixierpuffer	4% Paraformaldehyd in PBS
Mowiol	10 g Mowiol pro 40 ml PBS
	- 24 h bei RT rühren
	- 20 ml 100%iges Glycerol zugeben
	- 24 h bei RT rühren
	- pH-Kontrolle (pH 6-7)
	- 15 min bei 12000 rpm zentrifugieren
Permeabilisierungspuffer	0,2% Saponin / PBS
0,1M Phosphatpuffer	77.4 ml 1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	22.6 ml 1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	Ad ddH <sub>2</sub> O
	pH 7.4
In vitro Proteolyseassay	
Proteolysepuffer	20 mM MES
	150 mM NaCl
	2.5 mM EDTA
	1 mM DTT
	pH 6.
Tritosomenpräparation	
Tylaxapol Injektionslösung	17% Triton WR1339 in 0,9% NaCl
0,25M Sucroslösung	4,276g Sucrose in 50ml H <sub>2</sub> O
ρ 1.21 Sucroslösung	26,98g Sucrose
	33,02g H <sub>2</sub> O
ρ 1.15 Sucroslösung	20,09g Sucrose
	39,91g H <sub>2</sub> O
ρ 1.14 Sucroslösung	18,88g Sucrose
	41,12g H <sub>2</sub> O
ρ 1.06 Sucroslösung	8,59g Sucrose
	51,40g H <sub>2</sub> O

## 10 Anhang

### 10.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schematische Darstellung eines Lysosoms und einige seiner Proteine.

Abb. 2 Schematische Darstellung des Lysosomalen Integralen Membranproteins Typ-2 (LIMP-2).

Abb. 3: Schematische Darstellung des LIMP-2 bzw. Mannose-6-Phosphat-Rezeptor abhängigen Transports lysosomaler Hydrolasen.

Abb. 4: Zusammenfassung der Symptome von Menschen mit LIMP-2 Mutationen bzw. Morbus-Gaucher Patienten.

Abb. 5: Schematische Darstellung der Topologie des PRAF2-Proteins.

Abb. 6: Schematische Darstellung des VAMP-2-Proteins und der synaptischen Vesikelfusion.

Abb. 7: Schematische Darstellung des Proreninrezeptors.

Abb. 8: Schematische Darstellung des Wnt-Signalwegs.

Abb. 9: Schematische Darstellung des humanen Cathepsin F-Proteins.

Abb. 10 Schematische Darstellung der Polymerase-Kettenreaktion..

Abb. 11 Schematische Darstellung zur Deletions-und Punktmutations-PCR.

Abb. 12 Schematische Darstellung von Klonierungsexperimenten.

Abb. 13 Schematische Darstellung der qRT-PCR Amplifikation in der Universal Probe Library (UPL) von Roche.

Abb. 14 Schematische Darstellung des Glyosilierungsprozesses von Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparatus.

Abb. 15 Schematische Darstellung einer Koimmunpräzipitation.

Abb. 16 Apparationsaufbau bei der TANK-Western-Blot Methode.

Abb. 17 Schematische Darstellung des Wnt-Signalweges.

Abb. 18 Verteilung der Fraktionen nach der Dichtegradientenzentrifugation.

Abb. 19 Zusammenfassung der untersuchten Interaktionspartner von LIMP-2.

Abb. 20 LIMP-2 WT/LIMP-2 WT Koimmunpräzipitation in Cos7 Zellen.

Abb. 21 LIMP-2 WT/LIMP-2 luminale Domäne Koimmunpräzipitation in Cos7 Zellen.

Abb. 22 LIMP-2 Ligandenbinderegion Mutanten/LIMP-2 luminale Domäne Koimmunpräzipitation in Cos7 Zellen.

Abb. 23 Koimmunpräzipitation von LIMP-2 Ligandenbinderegion/Luminale Domäne Mutanten in Cos7 Zellen.

Abb. 24 Schematische Darstellung der Affinitätschromatografie des HEK-Screens.

Abb. 25 PRAF2 Überexpression und Membranlokalisation.

- Abb. 26 Endogene PRAF2 Expression in MEF-Zellen und murinen Organlysaten.
- Abb. 27 Subzelluläre Lokalisation von PRAF2-HA in Cos7-Zellen.
- Abb. 28 Kontrolle des PRAF2 Antikörpers in der Immunfluoreszenz.
- Abb. 29 Kolokalisationstudie von endogenem PRAF2 in Cos7-Zellen.
- Abb. 30 Koimmunpräzipitation von LIMP-2 und PRAF2 in N2a-Zellen.
- Abb. 31 Koimmunpräzipitation von LIMP-2 Mutanten und PRAF2 in N2a-Zellen.
- Abb. 32 Subzelluläre Lokalisation von PRAF2 in Abhängigkeit von LIMP-2 Überexpression in Cos7-Zellen.
- Abb. 33 Subzelluläre Lokalisation von PRAF2 in LIMP-2 WT- und KO-MEFs.
- Abb. 34 Proteinmenge von PRAF2 in murinen LIMP-2 WT und KO Geweben.
- Abb. 35 Analyse von VAMP-2 mittels Western Blot.
- Abb. 36 Subzelluläre Kolokalisation von VAMP-2 und LIMP-2 in neuronalen Zelllinien.
- Abb. 37 Koimmunpräzipitation von LIMP-2 und VAMP-2 in Cos7 Zellen.
- Abb. 38 Koimmunpräzipitation von LIMP-2 Mutanten und VAMP-2 in Cos7-Zellen.
- Abb. 39 Endogene Koimmunpräzipitation von LIMP-2/LAMP-2 und VAMP-2 aus Gehirnllysaten.
- Abb. 40 VAMP2-Expression in murinen LIMP-2 WT und KO Gehirngeweben.
- Abb. 41 LIMP-2 Detektion in Synaptosomen.
- Abb. 42 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Moosfaser-Synapsen von Wildtyp und LIMP-2-defizienten Mäusegehirnen.
- Abb. 43 Koimmunpräzipitation von LIMP-2 und dem PRR.
- Abb. 44 Verifizierung der Interaktionsstelle zwischen LIMP-2 und dem PRR.
- Abb. 45 Detektion der Menge an PRR in LIMP-2 Wildtyp (WT) und LIMP-2-defizienten (KO) Tritosomen.
- Abb. 46 Detektion der Proteinmenge des PRR in murinen LIMP-2 Wildtyp (WT) und defizienten (KO) Organen.
- Abb. 47 Schematische Darstellung des Wnt-Signalweges.
- Abb. 48 Wnt-abhängiger Luziferase-Assay in PRR defizienten MEFs und nach Bafilomycin A1 Behandlung.
- Abb. 49 Wnt-abhängiger Luziferase-Assay in LIMP-2-defizienten und Rescue Zellen und stabil transfizierten HEK Zellen.
- Abb. 50 Kontrolle der LIMP-2 abhängigen PRR-Expression und Proteinmenge nach Wnt3a-Stimulation.
- Abb. 51 Wnt-Signalweg abhängiger Luziferase-Assay in verschiedenen MEF-Zellen.

Abb. 52 Untersuchung der Axin2-Expression mittels qRT-PCR nach Wnt3a Stimulation in Abhängigkeit von LIMP-2.

Abb. 53 Detektion der Proteolyse von LIMP-2.

Abb. 54 Inhibitionstests der Spaltung der LIMP-2 I156D-Mutante.

Abb. 55 Identifizierung der LIMP-2 spaltenden Cathepsine.

Abb. 56 Identifizierung der LIMP-2 Spaltung durch Cathepsin F.

Abb. 57 Spaltung der rekombinanten luminalen Domäne von LIMP-2 durch rekombinantes Cathepsin F.

Abb. 58 Detektion der potenziellen Spaltstelle in LIMP-2.

Abb. 59 LIMP-2 wird in späten Endosomen/Lysosomen geschnitten.

Abb. 60 Detektion LIMP-2 spezifischer Spaltprodukte in Tritosomen.

Abb. 61 Detektion der endogenen Spaltung von LIMP-2 durch Cathepsin F in N2a-Zellen.

Abb. 62 Detektion der Cathepsin F-abhängigen LIMP-Spaltung nach  $\beta$ -GC Überexpression.

Abb. 63 Koimmunpräzipitation von LIMP-2 mit  $\beta$ -GC in Abhängigkeit der CathF-Überexpression.

Abb. 64 Retention von  $\beta$ -GC im ER in Abhängigkeit der CathF-Überexpression in N2a Zellen.

Abb. 65 Analyse der LIMP-2 Spaltung durch Kufs Erkrankung assoziierte Cathepsin F Mutanten.

Abb. 66 Potenzielle Funktion von PRAF2 im Transport von LIMP-2 vom ER in den Golgi Apparat (Golgi).

Abb. 67 Schematische Darstellung der Interaktionsstelle von LIMP-2 und VAMP-2.

Abb. 68 Schematische Darstellung der Fusion und des Recycling der synaptischen Vesikel an der Präsynaptischen Membran.

Abb. 69: Schematische Darstellung des Wnt-Signalweges

Abb. 70: Schematische Darstellung der Ergebnisse zur LIMP-2 Prozessierung durch Cathepsin F.

Abb. 71: Schematische Darstellung der Konformationsänderung und Spaltung der Ligandenbinderegion von LIMP-2.

Abb. 72: Schematische Darstellung der Konformationsänderung und Spaltung der Ligandenbinderegion von LIMP-2-Mutanten.

Abb. 73 Vektorkarte des pECFP-N1 Vektors (Addgene).

Abb. 74 Vektorkarte des pCI-neo Vektors (genemol.org)

Abb. 75 Vektorkarte des pCI-neo Vektors (Xenbase)



Abb. 76 Vektorkarte des pcDNA4TO Vektors (snapgene).

Abb. 77 Vektorkarte des pGL4 Vektors (Promega).

## 10.2 Abkürzungen

AMRF	Action Myoclonus Renal Failure Syndrom
APC	Adenomatous polyposis coli
$\beta$ -GC	$\beta$ -Glukocerebrosidase
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
Bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	complementary DNA
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DABCO	Diazobicyclooctan
ddH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
dE	Differenz der gemessenen Extinktionswerte
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
EndoH	Endoglykosidase H
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERGIC	ER-Golgi intermediate compartment
EV 71	Enterovirus 71
FastAP	fast alkaline phosphatase
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FOP	Far-from-optimal Tcf-binding
GD	Gaucher Erkrankung
GlcNac	N-Acetylglukosamin
GSK3	Glykogen Synthase Kinase 3

---

GTP/GDP	Guanosintriphosphat/ Guanosindiphosphat
Golgi	Golgi Apparatus
h	human
HEK	human embryonic kidney
HRP	Horse-Radish-Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton (Masseneinheit von Proteinen)
KDEL	Lysin-Aspartat-Glutamat-Leucin (ER-Retentionsmotiv)
KO	knockout
kV	Kilovolt
l	Liter
L2T2	LIMP-2-Tier-2 (Antikörper)
LAMP	Lysosome-Associated Membrane Protein (lysosomal assoziiertes Membranprotein)
LIMP	Lysosomal Integral Membrane Protein (lysosomales integrales Membranprotein)
LRP6	Low-density lipoprotein receptor-related protein 6
LSD	lysosomal storage disorders
m	murin
M	molar, Mol/Liter
µm	Mikrometer
mM	millimolar
µM	mikromolar
mA	Milliampere (Stromeinheit)
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
mg	Milligramm
µg	Mirkogramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
M6PR	Mannose-6-Phosphatrezeptor
mRNA	messenger RNA

---

NCL	Neuronale Ceroid-Lipofuszinosen
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N2a	murine Neuroblastoma Zellen
$\Omega$	Ohm (physikalische Größe des Widerstands)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
pfu	Pyrococcus furiosus
pH	pondus Hydrogenii („Wasserstoffgewicht“)
PNGaseF	N-Glykosidase F
PRAF2	PRA 1 domain family member 2
PRA	prenylated Rab acceptor
PRR	(Pro)Renin Rezeptor
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
Rab	Ras-related in brain
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Room Temperature (Raumtemperatur)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
sek	Sekunde
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
Std	Stunde
SV	Simian Virus
TAE	Tris-Acetat-EDTA (-Puffer)
TBS(T)	Tris Buffered Saline (Tris-gepufferte Kochsalzlösung) (+ 0,1% Tween-20)
TCF/LEF	Transcription factor/ lymphoid enhancer-binding factor
Temed	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
TOP	optimal Tcf-binding site
UK	United Kingdom (Großbritannien)
USA	United States of America

---

$\infty$	unendlich
U	Unit (Einheit der enzymatischen Aktivität)
UV	ultraviolett
V	Volt (Spannungseinheit)
v-ATPase	vesikuläre H <sup>+</sup> -ATPase
VAMP-2	Vesicle-associated membrane protein 2
WB	Westernblot
WT	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel

## 10.3 Lebenslauf

### Judith Peters

Anschrift: Fürkiek 3, 24582 Bisse  
Geboren am 20.08.1986 in Ibbenbüren  
Staatszugehörigkeit: deutsch

### Bildungsweg

Okt. 2011 – voraussichtlich Dez. 2014

#### Promotion im Bereich Biochemie

Christian-Albrechts-Universität Kiel

Arbeitsgruppe für Molekulare Zellbiologie und Transgene Forschung

Graduiertenkolleg 1459

Prof. Dr. Paul Saftig

Okt. 2009 – Sep. 2011

#### Masterstudium Zellbiologie

Universität Osnabrück

Masterarbeit: Arbeitsgruppe für Zoologie-Entwicklungsbiologie

Prof. Dr. Achim Paululat

*Abschluss mit Auszeichnung (1,1)*

Okt. 2006 – Sep. 2009

#### Bachelorstudium Zellbiologie

Universität Osnabrück

Bachelorarbeit: Arbeitsgruppe für Angewandte Genetik der Mikroorganismen

Prof. Dr. Hildgund Schrempf

Juni 2006

#### Allgemeine Hochschulreife

Johannes-Kepler-Gymnasium, Ibbenbüren

## 10.4 Publikationen und Poster

### Symposien

- 2011: Lysosomes Meeting, Hamburg
- 2012: Symposium on Proteintrafficking in Health and Disease, Hamburg  
Organisation und Poster Präsentation
- 2013: Symposium on Cellular Microcompartments, Osnabrück  
Poster Präsentation
- 2014: EMBO Workshop, Goldegg, Österreich  
Protein and lipid function in secretion and endocytosis, Poster Präsentation
- Symposium on Proteintrafficking in Health and Disease, Hamburg  
Organisation und Poster Präsentation

### Publikationen

Neculai D, Schwake M, Ravichandran M, Zunke F, Collins RF, **Peters J**, Neculai M, Plumb J, Loppnau P, Pizarro JC, Seitova A, Trimble WS, Saftig P, Grinstein S and Dhe-Paganon S. : Structure of LIMP-2 provides functional insights with implications for SR-BI and CD36. **Nature**. 2013 Dec 5;504(7478):172-6.

Rosendahl A, Niemann G, Lange S, Ahadzadeh E, Krebs C, Contrepas A, van Goor H, Wiech T, Bader M, Schwake M, **Peters J**, Stahl R, Nguyen G, Wenzel UO. Increased expression of (pro)renin receptor does not cause hypertension or cardiac and renal fibrosis in mice. **Lab Invest** (in press)

**Peters J**, Rittger A, Weisner R, Zunke F, Rothaug M, Damme M, Berkovic SF, Blanz J, Saftig P and Schwake M. Lysosomal integral membrane protein type 2 (LIMP-2/SCARB2) is a substrate of cathepsin F, a cysteine protease mutated in type B Kufs disease. Submitted to the Journal of Biological Chemistry

## 10.5 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt,

- dass diese Abhandlung, abgesehen von der Beratung durch Herrn Professor Dr. Paul Saftig und Herrn PD Dr. Michael Schwake nach Inhalt und Form die eigene Arbeit ist, die selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel durch mich verfasst wurde
- dass diese Dissertation noch nicht an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde, jedoch anteilig und in Koautorenschaft zum einen veröffentlicht
  - o (Neculai, D., M. Schwake, M. Ravichandran, F. Zunke, R. F. Collins, J. Peters, M. Neculai, J. Plumb, P. Loppnau, J. C. Pizarro, A. Seitova, W. S. Trimble, P. Saftig, S. Grinstein and S. Dhe-Paganon (2013). "Structure of LIMP-2 provides functional insights with implications for SR-BI and CD36." Nature)
  - o oder zum anderen zur Veröffentlichung bei einem wissenschaftlichen Magazin (The Journal of Biological Chemistry, Rockville, Maryland) eingereicht worden ist.
- dass diese Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist

Kiel, im Oktober 2014

Judith Peters

## 10.6 Danksagung

