

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

**UNTERSUCHUNG VON SNARE-PROTEINEN ALS
MÖGLICHE INTERAKTIONSPARTNER DES
LYSOSOMALEN INTEGRALEN MEMBRANPROTEINS TYP
2 (LIMP-2)**

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

vorgelegt von
ERNST ULRICH JOHANNES KNABBE
aus Hamburg

Kiel, 2015

1. Berichterstatter: Prof. Dr. P. Saftig

2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Lucius

Tag der mündlichen Prüfung: 22.9.2016

Publikationen

- [1] JUDITH PETERS, ANDREA RITTGER, REBECCA WEISNER, JOHANNES KNABBE, FRIEDERIKE ZUNKE, MICHELLE ROTH AUG, MARKUS DAMME, SAMUEL F. BERKOVIC, JUDITH BLANZ, PAUL SAFTIG, MICHAEL SCHWAKE: Lysosomal Integral Membrane Protein Type-2 (LIMP-2/SCARB2) is a Substrate of Cathepsin-F, a Cysteine Protease Mutated in Type-B-Kufs-Disease, in *Biochemical and Biophysical Research Communications* 457(3): 334-340, 2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	x
Abbildungsverzeichnis	xiv
Tabellenverzeichnis	xvi
1 Einleitung	1
1.1 Das Lysosom	1
1.2 Limp-2	5
1.3 Action Myoclonus Renal Failure Syndrom (AMRF)	7
1.4 Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment Protein Receptors (SNAREs)	9
1.5 Das SNARE-Protein USE1/D12	12
2 Fragestellung	16
3 Material und Methoden	17
3.1 Material	17
3.1.1 Geräte	17
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	18
3.1.3 Chemikalien, Reagenzien	19
3.1.4 Puffer, Lösungen	22
3.1.5 Kits	27
3.1.6 Enzyme	28
3.1.7 Proteaseinhibitoren	29
3.1.8 Antikörper	29
3.1.8.1 primäre Antikörper	29
3.1.8.2 sekundäre Antikörper	30
3.1.9 Zelllinien	31
3.1.10 Mausstämme	32

3.1.11	Software	32
3.1.12	Plasmide	33
3.1.13	siRNA	34
3.1.14	Klonierungsprimer	34
3.2	Methoden	35
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	35
3.2.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
3.2.1.2	Klonierungs-PCR	36
3.2.1.3	Fusions-PCR	37
3.2.1.4	Agarosegelelektrophorese	38
3.2.1.5	Restriktionsverdau	38
3.2.1.6	Dephosphorylierung	39
3.2.1.7	Ligation	39
3.2.1.8	Elektroporation	39
3.2.1.9	Vermehrung und Aufreinigung von Plasmiden	40
3.2.1.10	Konzentrationsbestimmung von DNA	40
3.2.1.11	Sequenzierung von Plasmiden	40
3.2.2	Zellbiologische Methoden	40
3.2.2.1	Kultivierung von Zellen	40
3.2.2.2	Zellpassagierung	41
3.2.2.3	Transiente Transfektion von Zellen	41
3.2.2.4	siRNA Behandlung der Zellen	42
3.2.2.5	Zellernte	42
3.2.2.6	Zellfixierung	42
3.2.2.7	Zellysatherstellung	43
3.2.2.8	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA	43
3.2.2.9	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
3.2.2.10	Membranpräparation	44
3.2.2.11	Tritosomenpräparation	44
3.2.2.12	Oberflächenbiotinylierung	45
3.2.2.13	EndoH- / und PNGaseF-Verdau	46
3.2.3	Hefe-System	46
3.2.3.1	Funktionsweise des <i>Split-Ubiquitin Yeast-Two-Hybrid-Systems</i>	46
3.2.3.2	Herstellung kompetenter Hefestämme	47
3.2.3.3	Transformation der Hefen	48

3.2.3.4	Ausplattieren der Hefen zur Interaktionstestung und Verdünnungsreihe	48
3.2.4	Immunologische Methoden	48
3.2.4.1	Western Blot (WB)	48
3.2.4.2	<i>Semi-Dry-Blot</i>	49
3.2.4.3	<i>Tank Blot</i>	49
3.2.4.4	Proteindetektion	49
3.2.4.5	Koimmunpräzipitation	50
3.2.5	Mikroskopische Methoden	50
3.2.5.1	Immunfluoreszenz	50
3.2.5.2	Immunfluoreszenzmikroskopie	51
4	Ergebnisse	52
4.1	Validierung der Ergebnisse des Hefescreens	52
4.1.1	Interaktion von murinem Limp-2 mit murinem D12 in der Hefe . . .	52
4.1.2	Konstruktion verschiedener Deletionsmutanten von murinem D12 .	53
4.1.3	Testung verschiedener Mutanten von D12 auf Interaktion mit Limp-2 in der Hefe	54
4.2	Validierung in Säugierzellen	55
4.2.1	Umklonierung der Hefe-Konstrukte in den Säugereexpressionsvektor pFrog	55
4.2.2	Expression und Lokalisation des mit einem HA-Tag versehenen Konstruktes von D12 in Cos7-Zellen	56
4.2.3	Koimmunpräzipitation von D12 nach Immunpräzipitation von Limp-2	56
4.2.4	Klonierung eines carboxyterminal mit einem myc-Tag markierten Konstruktes von D12	59
4.2.4.1	Lokalisation des carboxyterminal mit myc-Tag versehenen Konstruktes von murinem D12	60
4.2.4.2	Interaktion des carboxyterminal mit myc-Tag versehenen Konstruktes von D12 mit murinem Limp-2	61
4.2.5	Überprüfung der Validität des Immunpräzipitationssystems	62
4.2.6	Interaktion von humanem D12 und murinem Limp-2 in der CoIP .	63
4.3	Suche nach der Interaktionsstelle von Limp-2 und D12	64
4.3.1	Testung verschiedener Mutanten von murinem D12 auf Interaktion mit murinem Limp-2 im Koimmunpräzipitationssystem	64
4.3.2	Konstruktion eines aminoterminal deletierten D12	65

4.3.2.1	Interaktion von aminoterminal deletierten D12 und Limp-2	66
4.3.3	Konstruktion einer D12 Mutante, der das ELLG-Motiv fehlt	66
4.3.3.1	Fehlende Interaktion der ELLG-Mutante von D12 und Limp-2	67
4.3.3.2	Lokalisation der ELLG-Mutante von D12	68
4.4	Suche nach dem subzellulären Interaktionsort von Limp-2 und D12	69
4.4.1	Kolokalisation von Limp-2 und D12 im ER	69
4.4.2	Koimmunpräzipitation von D12 bei Immunpräzipitation der ER-Retentionsmutante von Limp-2	70
4.4.3	Konstruktion von Chimären aus D12 und Gosr2	71
4.4.3.1	Bedeutung des n-terminalen Teils von D12 für die Lokalisation im ER	72
4.5	Bedeutung der Interaktion von D12 und Limp-2	73
4.5.1	Vergleich der Lokalisation von D12 in Limp-2-Wildtyp und Knockout-Fibroblasten	73
4.5.2	D12 in Limp-2-Knockout- und Wildtyp-Tritosomes	74
4.5.3	Einfluss der Überexpression von D12 auf das Verhältnis von ER-zur post-ER-Form von Limp-2	75
4.5.4	Testung von siRNA gegen humanes D12 (hUse1)	76
4.5.4.1	Einfluss der Herunterregulation von Use1 auf das Verlassen des ER von Limp-2	77
4.5.5	Einfluss von Limp-2 auf D12- und Gosr2-Oberflächenexpression	78
4.5.5.1	Validierung des Einflusses von Limp-2 auf die Gosr2 Oberflächenexpression	80
4.5.5.2	Untersuchung in Limp-2-Wildtyp vs Knockout-Fibroblasten	81
4.5.6	Kolokalisation von Limp-2 und D12 in durch Limp-2-Überexpression entstandenen Vesikeln	81
5	Diskussion	83
5.1	<i>Yeast-Two-Hybrid-System</i>	83
5.2	Koimmunpräzipitationssystem	85
5.2.1	Interaktion von Limp-2 und D12	85
5.2.2	Kontrollexperimente	85
5.3	Identifikation der Interaktionsdomäne in D12	87
5.4	Suche nach dem subzellulären Interaktionsort von Limp-2 und D12	88
5.5	Untersuchung der physiologischen Rolle der Interaktion von D12 und Limp-2	90

5.5.1	Bekannte Interaktionspartner von SNARE-Proteinen und ihre Funktionen	90
5.5.1.1	Experimente zur physiologischen Rolle der Interaktion von Limp-2 und D12	91
5.6	Zusammenfassung	93
6	Zusammenfassung	96
	Literaturverzeichnis	98
	Danksagung	108
	Anhänge	109
6.1	Anhang: Ergebnisse des <i>Split-Ubiquitin-Yeast-Two-Hybrid</i> -Screens	109
6.2	Anhang: Lebenslauf	111
6.3	Anhang: Veröffentlichungen	114

Abkürzungsverzeichnis

NH₄Cl Ammoniumchlorid

β-GC β-Glucocerebrosidase

AMRF Action Myoclonus Renal Failure

AP alkalische Phosphatase

ATP Adenosintriphosphat

BSA bovines Serumalbumin

cDNA komplementäre DNA

CF zytosolische Fraktion

Co-IP Koimmunpräzipitation

COPI coat protein complex I

CT c-Terminus

ctm c-terminal myc

dH₂O destilliertes Wasser

DABCO Diazobicyclooctan

DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol

ddH₂O doppelt destilliertes Wasser

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Desoxyribonukleinsäure

-
- EDTA** Ethylendiamintetraessigsäure
- eGFP** enhanced green-fluorescent Protein
- Endo-H** Endoglycosidase H
- EndoH** Endoglycosidase H
- ER** endoplasmatisches Retikulum
- ERGIC** ER-Golgi-Intermediate Compartment
- FCS** Fetales Kälberserum
- GAPDH** Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
- h** Stunde
- HA** Hämagglutinin
- His** Histidin
- HRP** Meerrettichperoxidase
- IF** Immunfluoreszenz
- IP** Immunpräzipitation
- kDa** Kilo Dalton
- KO** Knockout
- LB** lysogeny broth
- Leu** Leucin
- Limp-2** lysosomales integrales Membranprotein 2
- M6P** Mannose-6-Phosphat
- MF** Membranfraktion
- ml** Milliliter
- NAG** Neuroblastoma-amplified Gene Product

nm Nanometer

NSF N-ethylmaleimid sensitiver Faktor

NTP Nukleosidtriphosphat

OD optische Dichte

p.a. pro analysis

PBS phosphatgepufferte Salzlösung

PCR Polymerase-Kettenreaktion

PFA Paraformaldehyd

PME progressive Myoklonien mit Epilepsie

PN postnukleärer Überstand

PNGaseF Peptid-N-Glycosidase F

RNA Ribonukleinsäure

rpm Umdrehungen pro Minute

SC synthetic complete

SDS Natriumlaurylsulfat

SDS-PAGE Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

siRNA small interfering RNA

SNARE soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor

TAE Tris-Acetat-EDTA

TBS Tris gepufferte Salzlösung

TBS/T Tris gepufferte Salzlösung mit Tween

TEMED Tetramethylethyldiamin

TFR Transferrinrezeptor

TGN Trans-Golgi Network

TL Totallysat

TM Transmembrandomäne

Tris Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Trp Tryptophan

WB Western Blot

WT Wildtyp

YPAD Yeast Extract Peptone Dextrose plus Adenine medium

Abbildungsverzeichnis

1.1	Aufbau und Funktionen des Lysosoms	3
1.2	Unterschiedliche Sortiermechanismen lysosomaler Hydrolasen	5
1.3	Sequenzvergleich verschiedener SNARE-Proteine	11
1.4	Zyklus aus SNARE-Assembly und Disassembly	13
1.5	Überblick über die Transportprozesse der Säugetierzelle und die identifizierten SNARE-Proteine	13
1.6	Modelle zweier Tethering-Komplexe	15
3.1	Schematische Darstellung einer Fusions-PCR	37
3.2	Modell des <i>Split-Ubiquitin-Yeast-Two-Hybrid</i> -Systems	47
4.1	Validierung des Ergebnisses aus dem Hefe-Screen	53
4.2	Untersuchung verschiedener Konstrukte von mD12 auf Interaktion	54
4.3	Membranfraktionierung von mD12 und mD12- Δ TM_HA	56
4.4	Koimmunpräzipitation von mD12 und mLimp-2	57
4.5	Keine Koimmunpräzipitation von mD12_HA bei Immunpräzipitation von mLamp2a_myc	59
4.6	Koimmunpräzipitation von mLimp-2 bei Immunpräzipitation von mD12_HA	60
4.7	Immunfluoreszenz von mD12-c_terminal_myc	61
4.8	Immunpräzipitation von mD12-c_terminal_myc und mLimp-2	62
4.9	Überprüfung des Immunpräzipitationssystems	63
4.10	Speziesspezifität der Interaktion	64
4.11	Immunpräzipitation der Konstrukte mD12- Δ CT_HA und mD12-TM_E4_HA mit mLimp-2_myc	65
4.12	Koimmunpräzipitation von mD12- Δ N26_HA und mLimp-2_myc	67
4.13	Koimmunpräzipitation von mD12- Δ ELLG_HA und mLimp-2_myc	68
4.14	Immunfluoreszenz von mLimp-2_myc und mD12- Δ ELLG_HA	69
4.15	Immunfluoreszenz von mLimp-2_myc und mD12_HA	70
4.16	Immunfluoreszenz der ER-Retentionsmutante von mLimp-2 und mD12	71

4.17 Immunpräzipitation von mD12 und der ER-Retentionsmutante von mLimp-2_myc	72
4.18 Analyse der Chimären aus Gosr2 und D12 per Immunfluoreszenz	73
4.19 Untersuchung der Lokalisation von mD12-c_terminal_myc in Wildtyp- und Limp-2-Knockout-Fibroblasten	74
4.20 Tritosomenpräparation aus einer Limp-2-Wildtyp- und einer Limp-2-Knockout-Maus	75
4.21 EndoH- und PNGaseF-Verdau in HeLa-Zellen	76
4.22 hUse1-siRNA Test	77
4.23 EndoH- und PNGaseF-Verdau in HeLa-Zellen nach Use1-siRNA-Behandlung	78
4.24 Oberflächenbiotinylierung in N2A-Zellen	79
4.25 Oberflächenbiotinylierung in N2A-Zellen	80
4.26 Oberflächenbiotinylierung in Limp-2-Wildtyp- und Knockout-Fibroblasten	81
4.27 Kolokalisation von mD12 und mLimp-2 in den großen Vesikeln, die bei Überexpression von mLimp-2 in Cos7-Zellen entstehen	82
5.1 Modell der Interaktion von D12 und Limp-2	94

Tabellenverzeichnis

3.1	Geräte	17
3.2	Verbrauchsmaterialien	19
3.3	Chemikalien, Reagenzien	20
3.4	Puffer, Lösungen	22
3.5	Verwendete Kits	28
3.6	Enzyme	28
3.7	Proteaseinhibitoren	29
3.8	primäre Antikörper	30
3.9	sekundäre Antikörper	31
3.10	verwendete Zelllinien	31
3.11	Mausstämme für die Tritosomenpräparation	32
3.12	Software	32
3.13	Plasmide	33
3.14	verwendete siRNA	34
3.15	Klonierungsprimer für die Erstellung von Plasmiden	34
3.16	Standard-PCR mit Protokoll	36
3.17	Verwendete Laser im konfokalen Laserscanning-Mikroskop	51
6.1	Auswertung des <i>Split-Ubiquitin-Yeast-Two-Hybrid</i> -Screens (Schwake et al., unveröffentlichte Ergebnisse)	109

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Das Lysosom

Das Lysosom ist das Verdauungsorganell der Zelle. Es wurde 1955 von Christian de Duve erstmalig beschrieben (de Duve, C. et al. 1955; de Duve, C., 2005), der hierfür 1974 den Nobelpreis für Medizin erhielt. Lysosomen finden sich nur in tierischen und menschlichen Zellen. In der Pflanze und in Hefen werden ihre Aufgaben von anderen Organellen, wie zum Beispiel der Vacuole, übernommen.

Das Lysosom ist von einer doppelschichtigen Phospholipidmembran umgeben. Innerhalb der Membran des Lysosoms werden Materialien, die durch Rezeptor-vermittelte Endozytose oder Phagozytose in die Zelle aufgenommen wurden, in ihre Einzelbestandteile aufgespalten. Hier spielt das Lysosom auch eine wichtige Rolle bei der antimikrobiellen Abwehr, da es nach der Verschmelzung des Phagosoms mit dem Endosom zur Zersetzung der per Phagozytose aufgenommenen Organismen kommt. Danach können MHCII-Moleküle mit den Bruchstücken beladen und an der Zelloberfläche von geeigneten Zellen präsentiert werden (Cresswell, 1994).

Außerdem fusioniert in den letzten Phasen der Autophagozytose das Lysosom mit dem Autophagosom zum Autophagolysosom, in dem zur Autophagozytose bestimmte Zellbestandteile verdaut werden. Das heißt, dass Lysosomen eine zentrale Rolle bei der Autophagozytose spielen (Eskelinen und Saftig, 2009). Eine Verbindung zwischen beiden Prozessen stellt auch der Transkriptionsfaktor TFEB her, der als Regulator lysosomaler Biogenese fungiert (Sardiello et al. 2009), indem er alle für die lysosomale Funktionalität notwendigen Proteine in ihrer Expression steigert. Es werden außerdem auch Gene, die für die Autophagozytose wichtig sind, über TFEB reguliert (Settembre et al. 2011). Ein weiterer Prozess, bei dem Lysosomen beteiligt sind, ist die lysosomale Exozytose, bei der es zur Verschmelzung des Lysosoms mit der Plasmamembran kommt. Hierbei können

sowohl unverdauliche Materialien entsorgt als auch Membranmaterial zur Reparatur von Membrandefekten bereitgestellt werden. Die Beeinflussung dieses Prozesses birgt möglicherweise Potential in der Vorbeugung und Therapie neurodegenerativer Erkrankungen, wie zum Beispiel M. Parkinson, da es bei diesen zur Akkumulation unverdauten Materials in Zellen kommt.

In letzter Zeit wurde auch gezeigt, dass Lysosomen über Freisetzung von Enzymen wie zum Beispiel Cathepsinen in das Zytosol eine Rolle bei der Apoptose spielen können (Repnik et al. 2012).

Der Verdauungsprozess von Makromolekülen stellt die zentrale Aufgabe des Lysosoms in der Zelle dar, weswegen es auch als Ort der Entsorgung und des Recyclings in der Zelle bezeichnet wird. Diese Aufgabe wird bewerkstelligt von über 50 löslichen sauren Hydrolasen. Dies sind zum Beispiel Glykosidasen, Phosphatasen, Proteasen, Lipasen, Nucleasen und Sulfatasen, die die jeweiligen Makromoleküle bei einem pH-Wert von ungefähr 4,8 in ihre Bestandteile zerlegen. Dieser im Vergleich zum zytosolischen pH-Wert von 7,8 sehr niedrige pH-Wert wird durch den Protonentransporter H^+ -ATPase erreicht, der unter ATP-Verbrauch das Lumen des Lysosoms mit Wasserstoffionen ansäuert. Die freigesetzten Einzelbestandteile wie Nukleotide, Aminosäuren, Fette und Zucker werden nun durch Transporter aus dem Lysosom befördert und zur erneuten Verwendung im Zellstoffwechsel freigegeben.

Außer aus den löslichen, sich im Lumen befindenden Hydrolasen, besteht das Lysosom noch aus unterschiedlichen lysosomalen Membranproteinen, die zum Schutz vor den eigenen Verdauungsenzymen in hohem Maße sowohl im ER als auch im Golgi-Apparat glykosyliert werden. Die Membranproteine mit dem größten Anteil sind CD63, das zur Klasse der Tetraspanine gehört, sowie Lamp1, Lamp2 und Limp-2/SCARB2 (Saftig und Klumperman, 2009).

Ein weiteres wichtiges Protein, das Bestandteil der lysosomalen Membran ist, ist ein Cholesteroltransporter. Seine Funktion erlaubt es dem Lysosom an der Cholesterolhomöostase der Zelle teilzunehmen (Carstea et al. 1997). Mutationen in diesem Membranprotein führen zur Niemann-Pick-Krankheit Typ C (Carstea et al. 1993). Eine bildliche Darstellung der wichtigsten lysosomalen Vorgänge findet sich in nachfolgender Abbildung Abb. 1.1.

Der Transport der meisten sauren Hydrolasen in das Lysosom erfolgt über das Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-System (Braulke und Bonifacino, 2009). Hierfür werden die löslichen Hydrolasen im ER an bestimmten Asparaginresten mit Mannosezuckerresten modifiziert, die dann im Golgi-Apparat weiter verändert und phosphoryliert werden. Diese phosphorylierten Mannosezuckerreste können nun von speziellen Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (M6P-Rezeptoren) erkannt und gebunden werden. Die M6P-Rezeptoren transportieren die Hydrolasen in das Lysosom, wo es aufgrund des sauren pH zu einer Dissoziation der

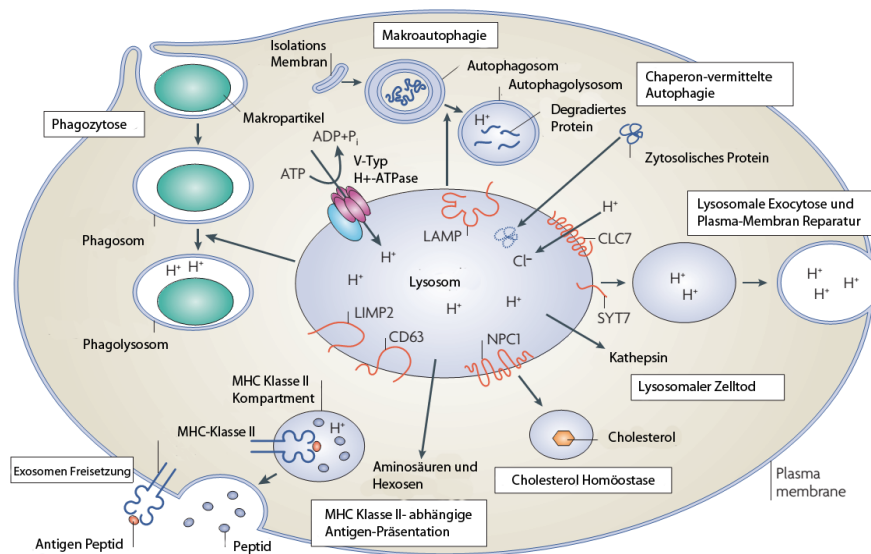


Abbildung 1.1: Zusammensetzung und Funktionen des Lysosoms. Abbildung nach (Saftig und Klumperman, 2009)

Enzyme von ihrem Transporter kommt. Der reguläre Weg führt vom cis-Golgi-Netzwerk über frühe und späte Endosomen und sogenannte Multivesicular Bodies in das Lysosom. Frühe Endosomen entstehen durch Endozytosevorgänge und darauffolgende Abschnürung der Vesikel von der Plasmamembran (Ghosh, Dahms und Kornfeld, 2003).

Mutationen in diesen Enzymen, die zu verminderter oder aufgehobener Funktionsfähigkeit führen, erzeugen im Menschen die sogenannten lysosomalen Speichererkrankungen, in denen es zu einer Akkumulation der Substrate des jeweiligen Enzyms mit nachfolgender Pathologie kommt. Außerdem können Mutationen, die zur Fehlsortierung der Enzyme führen, ebenfalls solche Krankheiten hervorrufen. Die lysosomalen Speichererkrankungen werden nach den jeweils akkumulierenden Stoffen in Mukopolysaccharidosen, Mukolipidosen, Sphingolipidosen, Oligosaccharidosen und Neuronale Ceroid-Lipofuszinosen eingeteilt. In ihrer Gesamtheit haben die Erkrankungen eine Häufigkeit von 1 auf 7500-8000 Geburten (Winchester, Vellodi und Young, 2000). Häufig betroffene Organsysteme sind Leber, Milz und Haut, aber auch Knorpel, Knochen und das Nervensystem.

Die häufigste lysosomale Speichererkrankung mit einer Auftrittswahrscheinlichkeit von 1:160000, aber starken regionalen Unterschieden, ist Morbus Gaucher. Hier ist die Funktionsfähigkeit der lysosomalen Hydrolase β -Glucocerebrosidase eingeschränkt oder fast aufgehoben. Die Aufgabe der β -Glucocerebrosidase ist die Hydrolyse von D-Glycosyl-N-Acylsphingosin zu D-Glukose und N-Acylsphingosin. Es kommt zur Anreicherung von D-Glycosyl-N-Acylsphingosin (Glucosylceramid), einem Glucocerebrosid, das Bestandteil von Zellmembranen ist, vor allem in Monozyten und Makrophagen. Das Glucocerebrosid, das vor allem nach Phagozytose von Blutzellen anfällt, kann nun nicht abgebaut wer-

den. Die glucosylceramidhaltigen Makrophagen, die lichtmikroskopisch identifiziert werden können, werden „Gaucher-Zellen“ genannt. Im Verlauf der Krankheit führt die Infiltration des Knochenmarks durch Gaucher-Zellen zur Zerstörung des Skeletts. Es kommt zu Raumforderungen in Leber, Milz, Knochenmark und Glaskörper.

Es können drei unterschiedliche Typen unterschieden werden, wobei Typ I erst im Erwachsenenalter auftritt mit Leber- und Milzvergrößerung sowie Anämie und Thrombozytopenie.

Der zweite Typ ist schwerwiegender und tritt schon im Säuglingsalter auf mit zusätzlichen Störungen des Nervensystems. Typ III rangiert im Schweregrad zwischen Typ I und Typ II. Einige der lysosomalen Speichererkrankungen lassen sich mit der Gabe der jeweiligen rekombinanten Enzyme therapieren, was zumindest die Schwere der Ausprägung mildert. Eine weitere lysosomale Speichererkrankung ist die I-Zell-Krankheit, bei der das Enzym N-Acetylglucosamin-1-phosphat-transferase fehlt, das die Mannose-Zuckerreste der lysosomalen Hydrolasen phosphoryliert. In der Folge können fast alle lysosomalen Hydrolasen nicht mehr in das Lysosom transportiert werden. In entsprechenden Mausmodellen konnten so lysosomale Hydrolasen identifiziert werden, die M6P-unabhängig in das Lysosom transportiert werden, wie zum Beispiel β -Glucocerebrosidase. Mittels Affinitätschromatographie ließ sich das lysosomale Membranprotein Limp-2/SCARB2 als Transporter für die β -Glucocerebrosidase darstellen (Reczek et al. 2007), ein anderes Transportprotein ist das Sortilin (Braulke und Bonifacino, 2009), das die Rolle von M6P-Rezeptoren übernehmen kann. Die Abb. 1.2 zeigt den Weg vom ER in das Lysosom mit den beteiligten Proteinen. Die β -Glucocerebrosidase nimmt hier eine Sonderstellung ein, da sie nicht von M6P-Rezeptoren, sondern von Limp-2 transportiert wird. Dieser Transportweg ist auch klinisch relevant, da Limp-2 Mutationen die Ausprägung von M. Gaucher modifizieren (Velayati et al. 2011). Allerdings wird Limp-2 ebenfalls posttranslational mit einem Mannose-6-Phosphat-Rest modifiziert, an den ein Mannose-6-Phosphat-Rezeptor bindet, so dass dieser Weg vielleicht ebenfalls Mannose-6-Phosphat-abhängig verläuft (Zhao et al. 2014).

Ein weiterer Transportweg in das Lysosom ist ebenfalls dargestellt. Hier gelangen die Enzyme über den Umweg der Plasmamembran in das frühe Endosom. Ebenfalls erkennbar sind die verschiedenen mitwirkenden Proteine wie Clathrin, das als Hüllprotein der Vesikel dient; außerdem GGA und die Adapterproteine AP-1 und AP-2, die für die Sortierung der M6P-Rezeptoren unabdingbar sind.

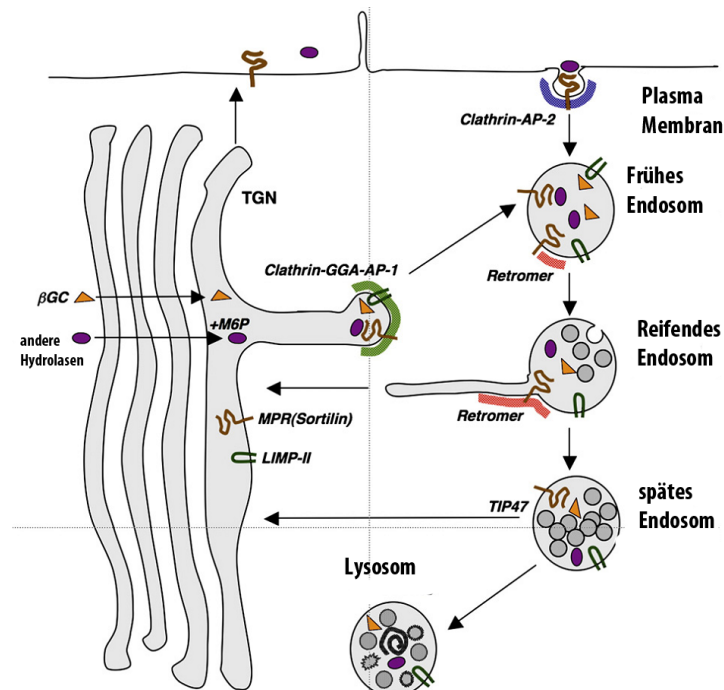


Abbildung 1.2: Unterschiedliche Sortiermechanismen lysosomaler Hydrolasen. Abbildung nach (Braulke und Bonifacio, 2009). Sichtbar sind auch die zwei unterschiedlichen Wege zum Lysosom, einmal der direkte Weg, einmal der Weg über die Plasmamembran.

1.2 Limp-2

Limp-2 ist ein Typ III-Transmembranprotein mit zwei Transmembrandomänen. Es wird auch als SCARB2 bezeichnet. Sein N- und C-Terminus befinden sich im Zytosol, wobei ein Dileucin-Motiv im C-Terminus für die Bindung an das Adapterprotein AP-3 und damit für den Transport in das Lysosom zuständig ist (Honing, Sandoval und Figura, 1998). Es gehört zu den häufigsten lysosomalen Membranproteinen.

Erste Hinweise auf eine wichtige Rolle von Limp-2 in der lysosomalen Biogenese und dem endosomal-lysosomalen Transportweg wurden durch Überexpression in verschiedenen Zelllinien erhalten, die eine Vergrößerung von Endosomen und Lysosomen nach etwa 36 Stunden zur Folge hatte (Kuronita, 2002). Anschließend wurde zusätzlich gezeigt, dass vor allem die N-terminale und luminale Domäne von Limp-2 für diese vergrößerten Vesikel zuständig ist (Kuronita et al. 2005).

In Limp-2-Knockout-Mäusen wurden uni- oder bilaterale Hydronephrosen beobachtet, die aus einer Verengung des Ureters an dem Übergang des Harnleiters in die Niere resultieren (Gamp et al. 2003). Ultrastrukturell zeigte sich hier eine Akkumulation von Lysosomen der Epithelzellen des Ureters und eine verändertes Verteilungsmuster von Uroplakin, das normalerweise in die apikale Membran der Epithelzellen eingesetzt wird und dem Schutz des Epithels vor dem Harn dient. Das Uroplakin wird dynamisch ein- und ausgebaut in ei-

nem fortwährenden endozytotischen Recyclingprozess, der bei Fehlen von Limp-2 gestört zu sein scheint. Aufgrund ständiger Reizung durch das Milieu des Harns kommt es nun zur Proliferation der Schleimhaut und zu nachfolgender Obstruktion. Zusammengefasst sind dies weitere Indizien für eine Rolle von Limp-2 bei endosomal-lysosomalen Transport- und Fusionsprozessen.

Einen weiteren Hinweis darauf stellt die Beobachtung dar, dass Limp-2-Knockout Mäuse an leichtgradiger tubulärer Proteinurie leiden, die daraus resultiert, dass aufgenommene Proteine nicht degradiert werden können. Dies deutet ebenfalls auf eine Rolle von Limp-2 bei der Fusion von Endosomen mit Lysosomen hin (Desmond et al. 2011). Des weiteren geht der Befund bei mit Listerien infizierten Limp-2-Knockout-Makrophagen in diese Richtung. Diese intrazellulären Bakterien werden normalerweise phagozytiert und anschließend in Phagolysosomen degradiert (Carrasco-Marin et al. 2011). In der zitierten Publikation konnte in aus Knochenmark differenzierten Makrophagen gezeigt werden, dass Limp-2 für die Fusion von Phagosomen mit Endo-/Lysosomen und die Produktion proinflammatorischer Zytokine wichtig ist.

In den Knockout-Mäusen ließ sich auch ein vermindertes Hörvermögen nachweisen, das sich in hohen Frequenzbereichen ungefähr ab dem ersten Monat nach der Geburt manifestiert. Es konnten ebenfalls nachlassende otoakustische Emissionen detektiert werden. Dieses Phänomen lässt sich auf den Verlust des Kaliumkanals KCNQ1 und seiner Untereinheit KCNE1 in den Marginalzellen der Stria Vascularis und einer veränderten Expression des Endozytoserezeptors Megalin zurückführen (Knipper et al. 2006). KCNQ1 ist für die Herstellung des endocochleären Potentials zuständig. Mit seiner kontinuierlichen Abnahme kommt es zu einem immer stärker werdenden Hörverlust. Verminderte Reinsertion in die Oberflächenmembran der Zellen der Stria Vascularis aufgrund des Fehlens von Limp-2 könnte diesen Phänotyp erklären.

Ein weiteres Merkmal der Limp-2-Knockout Mäuse ist die auf das periphere Nervensystem beschränkte progressive Neuropathie. Diese resultiert aus der Veränderung der Myelinschicht mit einer verminderten Expression verschiedener peripherer Myelinproteine in den Schwannzellen und einer Verminderung der Ranvierschen Knoten.

Eine weitere Analyse zeigte Limp-2 als Bestandteil des Discus intercalaris am Herzen (Schroen et al. 2007). Die Limp-2-Expression im Myokard ist bei kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz gesteigert, und Limp-2-Knockout Mäuse zeigen eine verminderte Anpassungsfähigkeit an gesteigerten Blutdruck und damit gesteigerte Vorlast. Sie entwickeln eher eine Kardiomyopathie als eine physiologische Anpassungshypertrophie. Dies könnte damit zusammenhängen, dass plasmamembranständiges Limp-2 den N-Cadherin- β -catenin Komplex bindet und so zu einer erhöhten Stabilität der Zellverbindungen des Myokards beiträgt.

Nach dem Transport der β -Glucocerebrosidase (β -GC) in das Lysosom verbleibt Limp-2 im Gegensatz zu den M6P-Rezeptoren im Lysosom. Zur Untersuchung der Bindung von Limp-2 an die β -Glucocerebrosidase wurden Bindungsstudien durchgeführt, die durch Abbruchmutationen zeigten, dass das Bindungsmotiv die sogenannte coiled-coil-Domäne darstellt, welche sich im luminalen Teil von Limp-2 zwischen den Aminosäuren 152 und 167 befindet (Blanz et al. 2010). Coiled-coiled-Domänen bestehen aus 2-5 α -Helices, die sich umeinander winden und Protein-Protein-Interaktionen vermitteln (Mason und Arndt, 2004).

In der Nähe dieser Domäne konnte ein Histidinrest identifiziert werden, der für die pH-abhängige Bindung der β -GC an Limp-2 entscheidend ist. Dieser wird im sauren Milieu des Lysosoms protoniert, was zu einer Dissoziation der β -GC von Limp-2 führt (Zachos et al. 2012). Die luminale Domäne wurde auch röntgenkristallographisch in ihrer Struktur aufgeklärt, wobei sich zeigte, dass dieser Teil von Limp-2 eine membrandurchspannende Öffnung besitzt, welche seine Rolle als mögliches Kanalprotein für Lipide nahelegt (Neculai et al. 2013).

Eine weitere Rolle, die Limp-2 spielt, wenn es sich an der Plasmamembran befindet, ist die eines Rezeptors und damit der Eintrittspforte des EV71 (Enterovirus 71), der die Hand-Fuß-Mund-Krankheit auslöst, aber auch schwerwiegende neurologische Krankheitsbilder wie Enzephalitis oder aseptische Meningitis hervorrufen kann (Yamayoshi et al. 2009). Dieser endozytotische Weg ist clathrin-abhängig und nur aktiv bei funktionierender Ansäuerung der Endosomen (Lin et al. 2012).

1.3 Action Myoclonus Renal Failure Syndrom (AMRF)

Mutationen in humanem Limp-2 verursachen verschieden stark ausgeprägte Krankheitsbilder. Als Oberbegriff wird das AMRF-Syndrom verwendet, das **A**ction **M**yo**cl**onus **R**enal **F**ailure Syndrom, das autosomal-rezessiv vererbt wird. Generell kommt es zu progressiven Myoklonien mit Epilepsie (PME), die gepaart ist mit fokaler, segmentaler Glomerulosklerose und Proteinurie, die ebenfalls im Verlauf der Krankheit zunimmt und letztendlich zum Nierenversagen führt.

Zentralnervöse Symptome sind Tremor und im Verlauf zunehmende Myoklonien, daraufhin generalisierte Krampfanfälle und Ataxie. Typischerweise tritt die Krankheit zwischen dem 15. und 20. Lebensjahr auf und führt zwischen dem 25. und 40. Lebensjahr zum Tod. Die erste Beschreibung von Mutationen im humanen Limp-2/SCARB2 als Auslösefaktor dieser Erkrankung erfolgte 2008 bei Nachkommen einer konsanguinen Heirat (Balreira et al. 2008). Hier war eine Missense-Mutation identifiziert worden, so dass keine Expression von Limp-2 mehr detektiert werden konnte. Die Aktivität der β -GC war

in Hautfibroblasten deutlich erniedrigt, in Leukozyten jedoch normal. Weitere Mutationen in verschiedenen Genbereichen wurden identifiziert (Berkovic et al. 2008). Außerdem wurden bei Analyse von Hirnschnitten Limp-2-defizienter Mäuse intra- und extrazelluläre Ablagerungen und Inklusionskörper in Groß- und Kleinhirn gefunden, die denen der AMRF-Patienten ähneln. Die Natur dieser intrazerebralen Ablagerungen ist bislang noch nicht bekannt, Ablagerungen in Leber und Lunge wurden jedoch als Glucosylceramid identifiziert, das das Substrat der β -GC ist.

Spezielle Tests zeigten, dass Limp-2-Knockout Mäuse unter Ataxie und neuromotorischen Störungen leiden. Epileptische Anfälle wurden bei den Mäusen bislang nicht beobachtet. Es wurde allerdings bei Patienten gezeigt, dass Fälle von progressiver myoklonischer Epilepsie mit Mutationen in Limp-2 ohne Nierenversagen existieren. Die Erklärung hierfür steht noch aus (Dibbens et al. 2009; Guerrero-Lopez et al. 2012). Auch Fälle mit Mutationen im Limp-2-Gen, die zu demyelinisierender peripherer Neuropathie führen, sind inzwischen beschrieben worden (Dibbens et al. 2011). Ein Case-Report existiert, worin der beschriebene Patient zusätzlich zum AMRF einen Verlust des Hörvermögens erlitt (Perandones et al. 2012).

In letzter Zeit häufen sich die Hinweise auf Korrelationen zwischen heterozygoten Mutationen in der β -Glucocerebrosidase und Parkinson (Sidransky et al. 2009; Westbroek, Gustafson und Sidransky, 2011; Murphy et al. 2014), und es konnten auch Mutationen im Limp-2-Gen identifiziert werden, die die Suszeptibilität für Parkinson erhöhen (Do et al. 2011; Michelakakis et al. 2012; Hopfner et al. 2013).

Eine Verbindung der Krankheitsbilder M. Gaucher und M. Parkinson lässt sich über die Akkumulation von α -Synuclein erklären. Stabile α -Synuclein-Oligomere bilden neurotoxische Lewy-Bodies bei M. Parkinson und anderen sogenannten Lewy-Body-Erkrankungen. Bei M. Parkinson geschieht dies vor allem in der Substantia Nigra, was zum Untergang der dopaminergen Nervenzellpopulation führt. Bei M. Gaucher lassen sich ebenfalls Lewy-Bodies nachweisen (Wong et al. 2004). Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass sich β -Glucocerebrosidase-Ablagerungen bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen in Lewy-Bodies finden (Goker-Alpan et al. 2010). Die Akkumulation von α -Synuclein wiederum führt zu einer verminderten Funktion der β -Glucocerebrosidase. Auf der anderen Seite hat eine erniedrigte β -Glucocerebrosidase-Aktivität eine α -Synuclein-Anhäufung zur Folge (Mazzulli et al. 2011). Diese Verbindung von α -Synuclein und der β -Glucocerebrosidase lässt sich auch in Limp-2-Knockout-Mäusen zeigen. Auch hier kommt es zu einer Akkumulation von α -Synuclein und anschließendem Nervenzelluntergang vor allem in dopaminergen Nervenzellen der Substantia Nigra, verbunden mit einer zentralen Gliose (Rothaug et al. 2014). In der Zellkultur konnte ein positiver Effekt der Überexpression von Limp-2 auf den Abbau von α -Synuclein gezeigt werden, was auch Relevanz

im Hinblick auf mögliche Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen hat.

Ein möglicher Degradationsweg von Limp-2 scheint die proteolytische Spaltung im Lysosom zu sein, die unter anderem von der Protease Cathepsin F durchgeführt wird, deren Mutation ebenfalls zu einer neurodegenerativen Erkrankung, der Kufs-Krankheit, die eine adulte Neuroid-Lipofuszinose ist, führt (Peters et al. 2015; Smith et al. 2013). Diese Beschreibung von Krankheitsbildern mit Beteiligung von Limp-2 oder der β -Glucocerebrosidase zeigt, dass noch nicht alle Funktionen von Limp-2 aufgeklärt sind. Daher wurde vor dieser Arbeit ein *Yeast-Two-Hybrid-Screen* unternommen (s.u.), um mögliche neue Interaktionspartner zu identifizieren. Das Ergebnis zeigt Tab. 6.1 im Anhang (Schwache, unveröffentlichte Ergebnisse). Hierbei ergaben sich unter anderem die zwei ER-residenten SNAREs Use1 und Bnip1 als mögliche neue Interaktoren.

1.4 Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment Protein Receptors (SNAREs)

SNARE-Proteine (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment Protein Receptor) bilden eine Gruppe von Proteinen, die aus 25 Mitgliedern in der Hefe und 36 Mitgliedern im Menschen besteht (Jahn und Scheller, 2006). Es sind meistens Typ-I-Transmembranproteine, das heißt, sie besitzen eine Transmembrandomäne und ihr N-Terminus liegt zytosolisch beziehungsweise extrazellulär, ihr C-Terminus luminal beziehungsweise intrazellulär. Einzigartig an ihrer Struktur ist ein bestimmtes sechzig bis siebenzig Aminosäuren zählendes Motiv, das extrazellulär in der Nähe der Transmembrandomäne liegt und speziesübergreifend stark konserviert ist, das sogenannte SNARE-Motiv. Eine der ersten und fundamentalen Studien identifizierte die SNAREs als wichtige Bestandteile des sekretorischen Weges über temperatursensitive Mutanten in der Hefe (Novick, Field und Schekman, 1980). Unter anderem für ihre Entdeckung und die Aufklärung ihrer Funktionsweise wurde 2013 der Nobelpreis für Medizin und Physiologie an James Rothmann, Randy Schekman und Thomas Südhof verliehen.

Nach der ersten Beschreibung in der Hefe wurde gezeigt, dass SNAREs in der Lage sind, nur mit Hilfe der Faktoren α -SNAP (alpha-soluble NSF attachment protein), NSF (N-Ethylmaleimid-sensitiver Faktor), ATP und Mg^{2+} Fusionen von Vesikeln miteinander oder von Vesikeln mit Akzeptormembranen zu vermitteln. Dies ist auch in artifiziellen, zellfreien Systemen wie Liposomen, die nur aus reinen Zellmembranen bestehen, möglich, in denen keine anderen Vermittlerproteine existieren.

Der erste komplette SNARE-Komplex aus drei SNAREs, der ermittelt wurde, ist der synaptische SNARE-Komplex, der es ermöglicht, dass im Neuron nach Ankunft eines Ak-

tionspotentials und nachfolgendem Ca^{2+} -Influx synaptische, neurotransmitterenthaltende Vesikel mit der Plasmamembran fusionieren (Sollner et al. 1993b). Ein weiteres Beispiel für synaptische Übertragung ist die neuromechanische Kopplung am Nerv-Muskel-Übergang, der neuromotorischen Endplatte. Dort kommt es nach Ankunft des Aktionspotentials zur Fusion acetylcholinhaltiger Vesikel mit der Plasmamembran. Das freigesetzte Acetylcholin bindet nun an Acetylcholin-Rezeptoren der Muskelzelle, was nachfolgend zu Ca^{2+} -Influx und Kontraktion des Muskels führt.

In der Studie zum synaptischen SNARE-Komplex wurde auch der Begriff SNARE zuerst verwendet, der aussagt, dass diese Proteine als Rezeptor für das Protein α -SNAP fungieren, unter dessen Mithilfe Membranfusion vermittelt wird. In dieser Publikation wurden so die SNAREs VAMP/Synaptobrevin, SNAP-25 und Syntaxin identifiziert und das erste einfache Modell SNARE-vermittelter Vesikelfusion aufgestellt. Zuvor war schon gezeigt worden, dass Botulinumtoxin die synaptische Übertragung durch eine Proteolyse des SNAREs VAMP/Synaptobrevin verhindert (Schiavo et al. 1992). Dieses erste Modell besagt, dass Synaptobrevin als sogenanntes v-SNARE oder vesicle-SNARE in der Membran des Vesikels sitzt und sich die anderen beiden SNAREs als t-SNAREs oder target-SNAREs in der Plasmamembran befinden. Annäherung der SNAREs aneinander führt zu ihrer Verbindung und zu sogenanntem *coiling*, das zur Fusion des Vesikels mit der Plasmamembran führt. Der Komplex kann unter ATP-Verbrauch durch NSF-Wirkung und Vermittlung durch α -SNAP wieder aufgelöst werden. NSF fungiert hierbei also als ATPase. Die SNAREs werden nun erneut verwendet, wodurch ein Assembly-Disassembly-Zyklus möglich ist, der es erlaubt, dass SNAREs nicht ständig neu gebildet werden müssen (Sollner et al. 1993a). Die Beschreibung dieses Vorgangs und des Ca^{2+} -Sensors Synaptotagmin ermöglichten die Erklärung für die Fähigkeit des Neurons zu präziser und schneller synaptischer Übertragung und somit elektrochemischer Kopplung.

Die Identifizierung weiterer SNAREs im Verlaufe der nächsten Jahre zeigte, dass dieses Prinzip in der Zelle als universal gelten kann, wenn die Fusion von Vesikeln miteinander oder mit Zielorganellen erreicht werden soll. Die kristallographische Strukturaufklärung des neuronalen SNARE-Komplexes ermöglichte weiteres Verständnis der Funktionsweise und eine neue Systematik aller bisher gefundenen SNAREs. So wurde es auch möglich, die Fusion von gleichen Vesikeln miteinander zu erklären, wo ja nicht von einer Vesikel- und einer Zielseite gesprochen werden kann. Dies ist zum Beispiel bei homotypischer Endosom-Endosomenfusion oder heterotypischer Endosom-Lysosomenfusion der Fall (Sutton et al. 1998).

Nachdem vorher gezeigt worden war, dass der grundsätzliche Mechanismus darin besteht, dass 3-4 SNAREs sich parallel zueinander anordnen, einander umwinden und die Membranen dadurch reißverschlussartig aneinanderbringen, konnte nun erklärt werden, welche

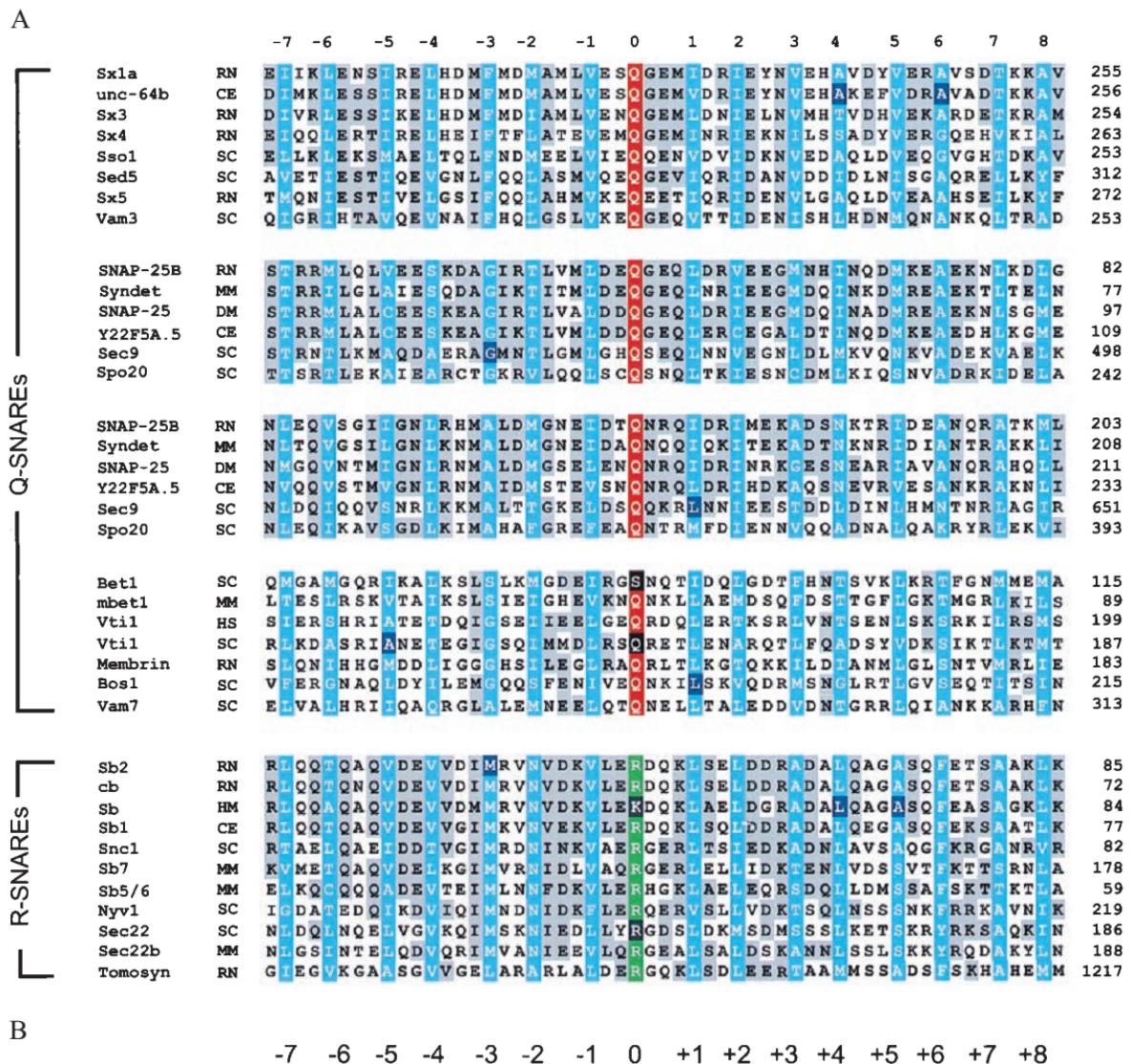


Abbildung 1.3: Sequenzvergleich verschiedener SNARE-Proteine (A) und Architektur der 4 α -Helices (B), die zusammen ein Bündel bilden. Mit den Ziffern sind die jeweiligen Ebenen bezeichnet. Abbildung nach (Fasshauer et al. 1998). SC: *Saccharomyces Cerevisiae*, MM: *Mus musculus*, DM: *Drosophila melanogaster*, CE: *Caenorhabditis elegans*, RN: *Rattus norvegicus*, HS: *Homo sapiens*, HM: *Hirudo medicinalis*, TM: *Torpedo marmorata*

Aminosäuresequenzen hierfür verantwortlich sind.

Hierbei spielt das SNARE-Motiv, das oben genannt wurde, eine entscheidende Rolle. Sequenzvergleiche im SNARE-Motiv wie in der Abb. 1.3 zeigen, dass das SNARE-Motiv jedes SNAREs eine α -Helix darstellt und bestimmte Aminosäuren sehr stark konserviert sind. Das Umeinanderwinden von 4 Helices der SNAREs erzeugt eine neue Superhelix mit 16 verschiedenen Ebenen, wobei die Ebene 0 die sogenannte ionische Ebene darstellt. Hier befindet sich je nach Struktur des SNARE-Motives in den meisten Fällen ein hochkonservierter Rest. Dies ist sowohl innerhalb einer Spezies als auch speziesübergreifend entweder ein Glutamin-Rest (Q) oder ein Arginin-Rest (R). Es zeigt sich, dass in fast allen Fällen drei dieser sogenannten Q-SNAREs und ein R-SNARE einen 4-Helix-Komplex bilden, der im unteren Teil der Abb. 1.3 dargestellt ist. So werden starke Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Carboxylgruppen des Glutamins und der Guanidinogruppe des Arginins möglich, die eine Stabilisierung des Komplexes bewirken. Die Auflösung des Komplexes geschieht über die Vermittlung der ATPase NSF, α -SNAP, Mg^{2+} und ATP. Weitere Struktur- und Sequenzanalysen ermöglichten es, die Q-SNAREs noch weiter in Qa-, Qb- und Qc-SNAREs einzuteilen. Analysen auch in zellfreien Systemen führten zu dem Postulat, dass für jede Vesikelfusion ein Komplex aus Qa-, Qb- und Qc-SNAREs in einer Membran notwendig ist, der sich mit dem R-SNARE der anderen Membran verbindet.

In Abb. 1.4 ist noch einmal das aktualisierte Modell der SNARE-vermittelten Vesikelfusion dargestellt. Hierbei erzeugen die drei Q-SNAREs den Akzeptorkomplex. Dieser bildet mit dem R-SNARE im Vesikel zuerst den vorläufigen, „lockeren“ SNARE-Komplex. Wechselwirkung der SNAREs miteinander führt zum Heranziehen des Vesikels an die Akzeptormembran und schließlich zur Verbindung der Vesikel- mit der Akzeptormembran. Aus dem trans- entsteht ein cis-SNARE-Komplex. Dieser stabile Komplex muss durch die ATPase NSF unter der Mithilfe von α -SNAP aufgelöst werden. Daraufhin werden die SNAREs wieder freigegeben und können erneut den Akzeptorkomplex bilden.

Für die meisten intrazellulären Transportprozesse in der Hefe und in Säugetierzellen sind die zuständigen SNARE-Proteine bereits identifiziert, wie Abb. 1.5 illustriert.

1.5 Das SNARE-Protein USE1/D12

Use1 wurde zuerst in der Hefe als Slt1/Use1p und Qc-SNARE identifiziert, in dessen 0-Ebene sich allerdings ein Aspartatseitenrest (D) anstatt eines Glutamins befindet (Burri et al. 2003), weswegen es auch als ein atypisches Qc-SNARE bezeichnet wird.

Es wurde als ER-residentes Protein beschrieben, das einen Komplex mit den anderen Hefe-SNAREs Ufe1, Sec22 und Sec20 bildet (Dilcher et al. 2003). Hierbei sind Ufe1 und Sec20

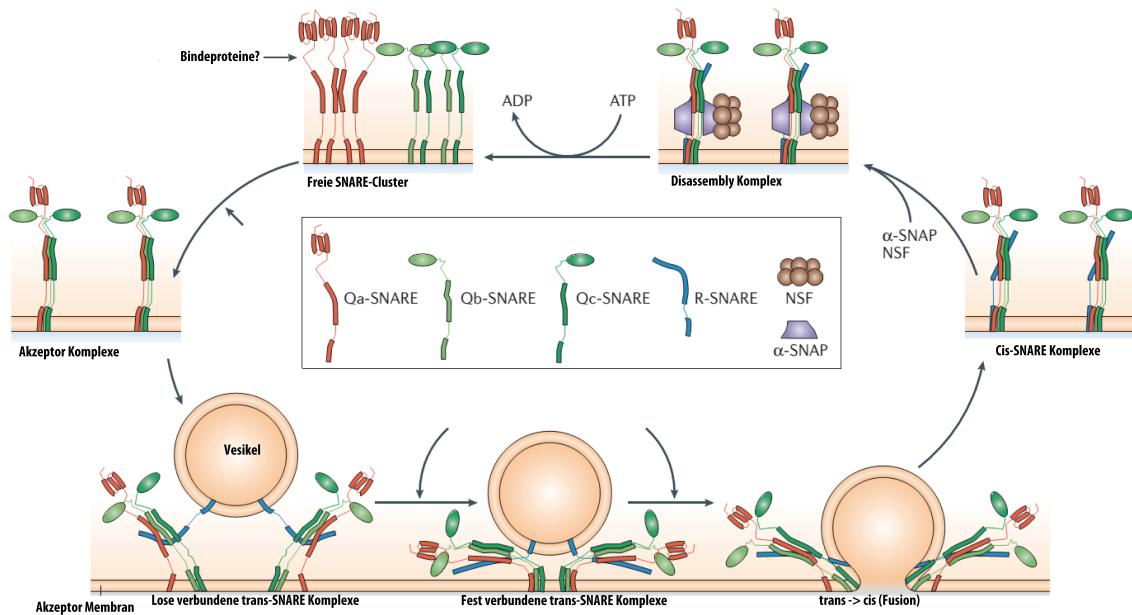


Abbildung 1.4: Zyklus aus SNARE-Assembly und Disassembly, der zur Fusion eines Vesikels mit der Ziellmembran führt. Zuerst kommt es zur Formation des ternären Akzeptorkomplexes aus Qa-, Qb- und Qc-SNAREs. Ein R-SNARE enthaltendes Vesikel wird von dem Akzeptorkomplex gebunden, es kommt zuerst zur Bildung eines schwachen, dann festen quaternären trans-SNARE-Komplexes, der schließlich zur Fusion des Vesikels mit der Membran führt. Dadurch entsteht der Cis-SNARE-Komplex, der unter α-SNAP-Bindung, NSF-Aktivierung und ATP-Verbrauch aufgelöst wird und die einzelnen SNAREs wieder freigibt. Abbildung nach (Jahn und Scheller, 2006).

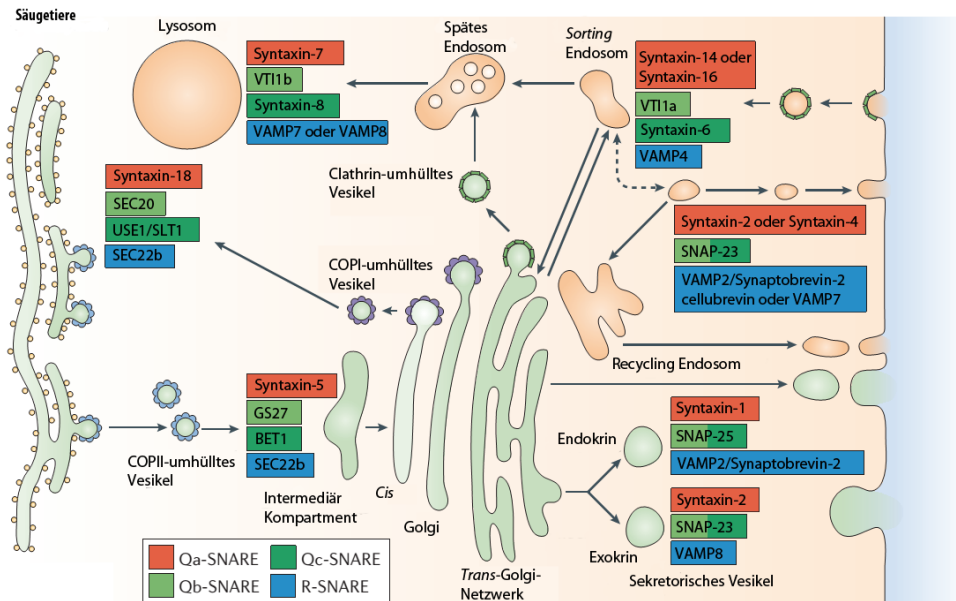


Abbildung 1.5: Überblick über die Transportprozesse der Säugetierzelle und die identifizierten SNARE-Proteine. Abbildung nach (Jahn und Scheller, 2006).

Q-SNAREs und Sec22 ist ein R-SNARE. Dieser Komplex ist zuständig für den retrograden Golgi-ER-Transport, wobei Ufe1, Sec20 und Use1 sich im ER befinden und Sec22 auf Vesikeln, die aus dem Golgi-Apparat abgeschnürt werden und dann mit dem ER verschmelzen. Identifizierbar sind diese Vesikel außerdem noch durch bestimmte Coatome, die auch mit SNAREs interagieren können. Im Fall des retrograden Golgi-ER-Transports stellt das Protein COPIs mit seinen Untereinheiten das Coatomer-Protein dar. In COPI-umhüllten Vesikeln werden unter anderem Proteine, die das sogenannte KDEL-Motiv enthalten, vom Golgi-Apparat zum ER zurücktransportiert. Für den umgekehrten Weg vom ER zum Golgi-Apparat konnte COPII als Hüllprotein identifiziert werden.

2006 wurde das murine Homolog von Use1 entdeckt, das als D12 bezeichnet wurde, welches ebenfalls einen Komplex mit den humanen/murinen SNAREs Syntaxin18/Ufe1, BNIP1/Sec20 und Sec22b/Sec22 bildet (Okumura et al. 2006). Dieser Komplex wurde durch Koimmunpräzipitation nachgewiesen. Ein siRNA-vermittelter Knockdown von D12/Use1 bewirkte in kultivierten Zellen das Auftreten von Lipofuscin und eine gestörte Reifung lysosomaler Hydrolasen. Außerdem trat vermehrt Apoptose auf. Lipofuscin entsteht typischerweise durch eine fehlerhafte Degradation von Mitochondrien in Lysosomen, so dass spekuliert wurde, D12 könne hier eine Rolle spielen. Dies könnte jedoch auch nur eine indirekte Wirkung sein. Später wurde auch die Relevanz dieses Komplexes mit Life-Cell-Imaging und FRET in lebenden Zellen gezeigt (Verrier et al. 2008). Außerdem wurden direkte Interaktionen mit COPI-Untereinheiten nachgewiesen.

Weitere Interaktionspartner, die über Immunpräzipitationsstudien identifiziert wurden, sind ZW10, das auch ein Checkpoint-Protein bei der Mitose ist, RINT-1 (Hirose et al. 2004) und NAG (Aoki et al. 2009). Ihre Funktion scheint es zu sein, Vesikel, die COPI-Untereinheiten enthalten, in die Nähe der SNARE-Komplexe zu bringen. Dies wird darüber erreicht, dass das n-terminale Ende „lassoartig“ bewegt werden kann, wie links in Abb. 1.6 im Komplex aus der Hefe dargestellt ist. Sie werden deshalb als Tethering-Faktoren bezeichnet (Schmitt, 2010).

Rechts in Abb. 1.6 ist der entsprechende Komplex aus Säugetierzellen dargestellt, bestehend aus den SNAREs Use1 und BNIP1 und dem Tethering-Komplex, bestehend aus NAG, RINT-1 und ZW10.

In einer weiteren Studie wurde eine Knockout-Maus für D12/p31 gezüchtet (Uemura et al. 2009). Die Mäuse starben jedoch schon während der frühen embryonalen Entwicklung. Mäuse, in denen das Gen nur im zentralen Nervensystem ausgeknockt war, starben am Tag ihrer Geburt, und ein Purkinje-Zell spezifischer Knockout zeigte Ataxie. Der konditionale Knockout über ein cre-Promoter-System erlaubte es jedoch, embryonale Fibroblasten mit einem Cre-Recombinase-enthaltenden Adenovirus zu infizieren. Die so erzeugten Knockout-Zellen zeigten eine zunehmende Auflösung des Netzwerkes des ER

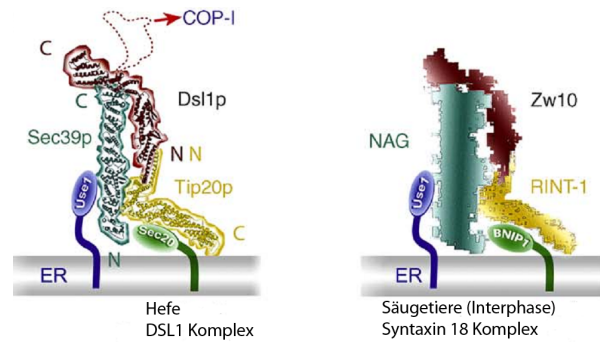


Abbildung 1.6: Modelle zweier Tethering-Komplexe. Abbildung nach (Schmitt, 2010). Links ist der Komplex in der Hefe dargestellt, bestehend aus Dsl1p, Sec39p und Tip20p, die mit den beiden ER-SNAREs Use1 und Sec20 interagieren. Dsl1p ist kristallographisch aufgeklärt worden (Ren et al. 2009). Der n-terminale Teil von Dsl1p ermöglicht das „lassoartige Einfangen“ der COPI-haltigen Vesikel, die sich vom Golgi-Apparat zum ER bewegen. Rechts ist der homologe Komplex aus Säugetierzellen dargestellt, bei denen Sec39p durch NAG, Dsl1p durch ZW10 und Tip20p durch RINT-1 ersetzt wurde. Die beiden SNAREs sind Use1 und Sec20/Bnip1.

bis hin zu großen blasenförmigen Strukturen. Dieser Effekt war beim siRNA-Knockdown wahrscheinlich nicht beobachtet worden, weil der Knockdown nicht vollständig effektiv war. Ebenfalls zeigte sich eine erhöhte Apoptoserate, die wohl durch die sogenannte ER-Stress-Antwort ausgelöst wird. Diese entsteht vor allem bei fehlschlagendem Abbau falschgefalteter Proteine als zelluläre Antwort.

Es gibt bisher noch keine Evidenzen für Mutationen in D12/Use1, die zu Erkrankungen beim Menschen führen könnten.

Kapitel 2

Fragestellung

Das Protein Limp-2/SCARB2 wurde, wie in der Einleitung dargelegt, als Transporter für die β -Glucocerebrosidase in das Lysosom beschrieben. Um weitere mögliche Interaktionspartner von Limp2 zu identifizieren, wurde in Vorexperimenten der Arbeitsgruppe (Schwake, unveröffentlichte Daten siehe Tab. 6.1) ein *Yeast-Two-Hybrid-Screen* mit murinem Limp2 durchgeführt. Als putativen Interaktionspartner ergab dieser Screen das SNARE-Protein D12/Use1, das vor allem im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist. Daraus ließen sich folgende Fragen ableiten, die in dieser Arbeit untersucht werden sollten:

- a) Kann die Interaktion, die in dem Screen gefunden wurde, auch in anderen Zellsystemen bestätigt werden?
- b) Wo spielt sich die Interaktion in der Zelle ab?
- c) Welche Domänen der Proteine sind für die Interaktion verantwortlich?
- d) Was ist die mögliche zelluläre Funktion der Interaktion?

Kapitel 3

Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Tabelle 3.1: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Agarosegeldokumentationsanlage Gel Jet Image	Intas, Göttingen, D
Agarosegelelektrophoresekammer Modell H5	Bethesda Research Laboratories Gaithersburg, USA
Analysenwaage	Kern & Sohn, Dürrewangen
Autoklav, Tecnomara	Integra Bioscience, Fernwald
Chemilumineszenzkamera LAS-4000	Fujifilm, Carrollton, USA
DNA-Photometer, GeneQuant pro	Biochrom Ltd, Cambridge UK
Elektroporationsgerät Gene Pulser™	BioRad, München
Fluoreszenzmikroskop, Axiovert 200	Zeiss, Jena
Horizontalschüttler, RM 5	Assistent, Sondheim, D
Inkubator Zell- und Gewebekulturen HERAcell 150	Heraeus, Hanau
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop FluoView 1000 Olympus	Hamburg, D

Fortsetzung von Tabelle 3.1	
Bezeichnung	Hersteller
Lichtmikroskop, T1-SNCP	Nikon Corporation Instrument Company Japan
Mikropipetten	Gilson, Middleton, USA Eppendorf, Hamburg, D
96-Loch-Mikrotiterplattenleser, Gen5	Biotek Instruments, Bad Friedrichshall, D
Multipipette	Eppendorf, Hamburg, D
PCR-Cycler, GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA
pH-Elektrode	Krick, Langenselbold, D
Pipetboy	Integra Bioscience, Fernwald, D
Rollator	Assistent, Sondheim, D
SDS-PAGE-Elektrophoresekammer Mini-Protean 3-Elektrophorese-System	BioRad, München, D
Semi-Dry-Blot-Gerät	BioRad, München, D
Sterilbank	Laminar Flow Bioflow Clan LAF, Meckenheim, D
Sonifier	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, D
Tank-Blot-Gerät	BioRad, München, D
Thermoblock Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, D
Ultrazentrifuge Optima TLX, TLA 55 Rotor	Beckman, Fullerton, USA
Ultrazentrifuge, J2-HS	Beckman, Fullerton, USA
Vortex-Gerät	Heidolph, Schwabach, D
Wasserbad	GFL, Burgwedel, D
Zentrifuge, Multifuge 3SR+	Heraeus, Hanau, D
Zentrifuge, Universal 32	Hettich, Tuttlingen, D

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.2: Verbrauchsmaterialien

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

3.1.3 Chemikalien, Reagenzien

Tabelle 3.3: Chemikalien, Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe, D
Agarose	Lonza, Köln, D
Ampicillin	Melford Laboratories, Chelworth, UK
Ammoniumperoxodisulfat (APS p.a.)	Roth, Karlsruhe, D
Bromphenolblau	Canalco, Bethesda, MD, USA
BSA	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt, D
Complete Protease-Inhibitor	Roche, Mannheim, D
DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
DTT (Dithiothreitol)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
DMEM High Glucose	PAA, Laboratories, Linz, A
DMSO (Dimethyl-Sulfoxid)	Serva, Heidelberg, D
DNA-Ladder, 100bp, 1 kb	Roche, Mannheim, D
DNA-Polymerasen Pfu und Taq	Fermentas St. Leon-Rot, Dr
dNTPs	Fermentas St. Leon-Rot, D
Dynabeads® Protein G	Invitrogen, Karlsruhe, D
EDTA	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol 99,8% p.a.	Roth, Karlsruhe, D
Ethidiumbromidlösung, 1%-ig	Roth, Karlsruhe, D
EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin	Thermo Fisher Scientific Rockford, USA
FCS	PAA, Laboratories, Linz, A
FugeneHD® Transfektions Reagenz	Roche AG, Basel, Schweiz
Glukose 97%	Sigma Aldrich, Steinheim, D

Fortsetzung von Tabelle 3.3	
Bezeichnung	Hersteller
Glycerin (99,9%)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Glycin 99%	Roth, Karlsruhe, D
Isopropanol (p.a.)	Roth, Karlsruhe, D
Kaliumchlorid $\geq 99,5\%$, p.a	Roth, Karlsruhe, D
Kaliumdihydrogenphosphat $\geq 99\%$, p.a.	Roth, Karlsruhe, D
Kanamycin	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Ladepuffer für Agarosegele	Fermentas St. Leon-Rot, D
Lachsspermien-DNA 10mg/ml	Invitrogen, Paisley, UK
Lipofectamin2000®	Invitrogen, Karlsruhe, D
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid-Hexahydrat p.a.	Merck, Darmstadt, D
2-Mercaptoethanol (p.a.)	Roth, Karlsruhe, D
Methanol	Roth, Karlsruhe, D
Mowiol	Calbiochem, LaJolla CA, USA
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, D
Natriumhydroxid $\geq 98,5\%$	Riedel-de-Haën, Seelze, D
N-Glykosidase F (PNGase F)	Roche Diagnostics GmbH Mannheim, D
Paraformaldehyd purum $\geq 95\%$	Fluka, Buchs, Schweiz
Penicillin/Streptomycin	PAA-Laboratories, Linz, A
Proteinmarker Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus	Fermentas, St.Leon-Rot, D
SDS	Roth, Karlsruhe, D
Streptavidin Sepharose Beads	Thermo Fisher Scientific Rockford, USA
TEMED (p.a.)	Roth, Karlsruhe, D

Fortsetzung von Tabelle 3.3	
Bezeichnung	Hersteller
Tris	Roth, Karlsruhe, D
Triton X-100	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Tween-20	Sigma Aldrich, Steinheim, D

3.1.4 Puffer, Lösungen

Tabelle 3.4: Puffer, Lösungen

Name	Inhalt
Biotinlösung	1µg EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin auf 1ml PBS
Biotinylierungspuffer	50mM Tris 150mM NaCl 1% TritonX-100 0,1% SDS 1xcomplete Protase-Inhibitor
Blockierlösung für den Westernblot	5% Milchpulver in TBS-T
Blockierlösung für ProteinG-Beads bei der Koimmunpräzipitation	3% BSA in PBS
DABCO-Stammlösung	1xPBS 200mg/ml Diazobicyclooctan
EBC-Puffer	120mM NaCl 50mM Tris/HCl 1% NP-40 1x complete Proteaseinhibitor pH 7,4

Fortsetzung von Tabelle 3.4	
Name	Inhalt
Einbettungslösung für die Cover-Slips bei der Immunfluoreszenz	17% Mowiol 33% Glycerol 50mg/ml DABCO 1µg/ml DAPI in 1xPBS
10x Elektrodenpuffer für die SDS-Gelelektrophorese	144,13g Glycerin 30,29g Tris 100ml 10% SDS in H ₂ O in 1l ddH ₂ O
Endo-H Puffer	100mM Natriumcitrat 0,1% 2-Mercaptoethanol 1% SDS 1x complete Proteaseinhibitor in ddH ₂ O, ph5,5
LB-Medium	10g Trypton/Pepton aus Casein 5g Hefeextrakt 10g NaCl in 1l ddH ₂ O, ph 7,0
LB-Agarplatten	10g Trypton/Pepton aus Casein 5g Hefeextrakt 10g NaCl 15g Agar-Agar in 1l ddH ₂ O, ph 7,0 Autoklavieren und bei 65°C in 10cm-Schalen gießen

Fortsetzung von Tabelle 3.4	
Name	Inhalt
Lysispuffer	1x PBS 1,0 % Triton X-100 1x complete Proteaseinhibitor pH 7,4
Mowiol-Lösung, Lagerung in 1mL Aliquots bei -20°C	40mL PBS 10g Mowiol 24h bei RT rühren +20ml 10% Glycerol 24h bei RT rühren 6-7 pH Zentrifugation 15min bei 12.000rpm
Mowiol/DABCO/DAPI	1ml Mowiol-Lösung 0,1ml DABCO-Stammlösung 1µl DAPI
4% Paraformaldehyd in PBS	1x PBS 4% Paraformaldehyd
10x PBS-Stammlösung	80g NaCl 11,5g wasserfreies Na ₂ HPO ₄ 2g KCl 2g K ₂ HPO ₄ in 1l H ₂ O ph 7,4
PBS-CM	1xPBS 0,1mM CaCl ₂ 1mM MgCl ₂
PEI (Transfektionsreagenz)	1g/L PEI Max 1L ddH ₂ O Sterilfiltration

Fortsetzung von Tabelle 3.4	
Name	Inhalt
PNGaseF-Puffer 1	50mM Na ₃ PO ₄ 1% SDS 1% 2-Mercaptoethanol 1x complete Proteaseinhibitor ph 7,8
PNGaseF-Puffer 2	50 mM Na ₃ PO ₄ 1 % NP-40 1x complete Proteinaseinhibitor pH 7,5
Quenching-Puffer	50mM Tris PBS-CM ph 8,0
Sammelgel für 4 SDS-Gele des Mini-Protean-Systems	1,35ml Sammelgelpuffer 1,75ml 30%-iges-Acrylamid mit 0,8% Bisacrylamid 6,75ml ddH ₂ O 60µl 10%-iges APS 30µl 100%-iges TEMED
Sammelgelpuffer	30,28g Tris/HCl 2g SDS in 500ml ddH ₂ O ph 6,8

Fortsetzung von Tabelle 3.4	
Name	Inhalt
5x Probenauftragspuffer (Lämmli-Puffer)	2,5ml Tris/HCl ph 6,8 1g SDS 2,5ml ddH ₂ O 0,05g Bromphenolblau 5ml 100%-iges Glycerol
Stripping-Puffer	20ml 10%-iges SDS in ddH ₂ O 6,25ml 1M Tris/HCl ph 6,8 0,83ml 2-Mercaptoethanol 73ml ddH ₂ O
Sucroslösungen für die Tritosomenpräparation	p1.21 Sucrose Lösung (26.98 g + 33.02 g dH ₂ O) p 1.15 Sucrose Lösung (20.09 g + 39.91 g dH ₂ O) p 1.14 Sucrose Lösung (18.88 g + 41.12 g dH ₂ O) p 1.06 Sucrose Lösung (8.59 g + 51.40 g dH ₂ O)
50x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	242g Tris 57,1ml Acetacetat 100ml 0,5M EDTA in 1L ddH ₂ O ph 8,0

Fortsetzung von Tabelle 3.4	
Name	Inhalt
Transferpuffer	20mM Tris 1,6M Glycin 20% Methanol ph 8,3
Trenngel für Mini-Protean-System(12,5%)	2,6ml Trenngelpuffer 4,2ml 30 %-iges Acrylamid mit 0,8 % Bisacrylamid 3,1ml ddH ₂ O 60µl 10 %-iges APS 30µl 100 %-iges Temed
Trenngelpuffer	90,85 g Tris/HCl 2g SDS in 500ml ddH ₂ O pH 8,8
10x TBS-Lösung	48,72g Tris 40ml 0,5M EDTA 163,6g NaCl in 2000ml ddH ₂ O pH 7,5
TBS/T	10ml Tween in 10L TBS
Zellkulturmedium (Standard)	500ml DMEM high Glucose 50ml FCS 5ml Penicillin/Streptomycin

3.1.5 Kits

Tabelle 3.5: Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
DNA-Extraktion	Analytik Jena, Jena, 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

3.1.6 Enzyme

Tabelle 3.6: Enzyme

Enzyme	Hersteller	Schnittstelle bei Restriktions- enzym
BamHI	Fermentas, St. Leon-Rot, D	5'-GGATCC-3' 3'-CCTAGG-5'
EcoRI	Fermentas, St. Leon-Rot, D	5'-GAATTC-3' 3'-CTTAAG-5'
HindIII	Fermentas, St. Leon-Rot, D	5'-AAGCTT-3' 3'-TTCGAA-5'
SfiI	Fermentas, St. Leon-Rot, D	5'-GGCCNNN- NNGGCC-3' 3'-CCGGNNN- NNCCGG-5'
Endoglycosidase H	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D	

Enzyme	Hersteller	Schnittstelle bei Restriktions- enzym
Fortsetzung von Tabelle 3.6		
Fast AP	Fermentas, St. Leon-Rot, D	
N-Glykosidase F (PNGase F)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D	
Pfu Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot, D	
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot, D	
Trypsin/EDTA	PAA-Laboratories, Linz, A	

3.1.7 Proteaseinhibitoren

Tabelle 3.7: Proteaseinhibitoren

Bezeichnung	Wirkweise	Stock-Konzentration	Hersteller
Bafilomycin A1	spezifische Inhibition der V-Typ H ⁺ -ATPase	10µM in DMSO	Sigma Aldrich Steinheim, D
E-64-d (EST)	Inhibition verschiedener Cysteinproteasenr	5,84mM in Ethanol	Enzo Lifescience Lörrach, D
Leupeptin	Inhibition von Serin-/Cystein-/Threoninproteasen	2,16mM in H ₂ O	Sigma Aldrich Steinheim, D
NH ₄ Cl	erhöht pH-Wert in sauren Kompartimenten	1M in H ₂ O	Roth Karlsruhe, D
Pepstatin A	Inhibition von Aspartylproteasen	1,46mM in DMSO	Sigma Aldrich Steinheim, D

3.1.8 Antikörper

3.1.8.1 primäre Antikörper

Tabelle 3.8: primäre Antikörper

Bezeichnung	Herkunft	erkanntes Protein aus Spezies	WB	IF	Hersteller
α -Aktin	Kaninchen	Aktin aus Mensch, Maus	1:2000		Sigma Aldrich, Steinheim, D
α -ERGIC p53	Maus	ERGIC p53 aus Mensch, Maus		1:250	Enzo Lifescience, Lörrach, D
α -GAPDH	Kaninchen	Glycerin-Aldehyd-3-PhosphatDehydrogenase aus Säugetieren	1:500		
α -HA (3F10)	Ratte	Haemagglutinin	1:1000	1:500	Roche, Mannheim
α -KDEL	Maus	ER-Retentionssignal aus Säugern		1:400	Biomol, Hamburg, D
α -L2T2	Kaninchen	LIMP-2 aus Mensch, Maus	1:1000	1:1000	Pineda, Berlin, D
α -mD12	Kaninchen	D12/Use1 aus Maus	1:1000		Abcam, Cambridge, UK
α -myc-9B11	Maus	c-myc	1:500	1:500	Cell Signaling, Boston, USA
α -myc-GTX	Ziege	c-myc		1:500	Genetex, Cambridge, UK
α -TfR	Maus	Transferrin-Rezeptor aus Säugern	1:500		
α -hUse1	Kaninchen	Use1/D12 aus Mensch	1:1000		Sigma Aldrich, Steinheim, D

3.1.8.2 sekundäre Antikörper

Tabelle 3.9: sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Herkunft	erkanntes Protein aus Spezies	WB	IF	Quelle
α -Kaninchen-HRP	Schaf	Kaninchen IgG	1:10000		Dianova GmbH, Hamburg, D
α -Maus-HRP	Schaf	Maus IgG	1:10000		Dianova GmbH, Hamburg, D
α -Ratte-HRP	Kaninchen	Ratte IgG	1:10000		Dianova GmbH, Hamburg, D
α -Kaninchen Alexa Fluor 488	Affe oder Ziege	Kaninchen IgG		1:500	Invitrogen, Karlsruhe, D
α -Kaninchen Alexa Fluor 594	Affe oder Ziege	Kaninchen IgG		1:500	Invitrogen, Karlsruhe, D
α -Maus Alexa Fluor 488	Affe oder Ziege	Maus IgG		1:500	Invitrogen, Karlsruhe, D
α -Maus Alexa Fluor 594	Affe oder Ziege	Maus IgG		1:500	Invitrogen, Karlsruhe, D
α -Ratte Alexa Fluor 594	Affe oder Ziege	Ratte IgG		1:500	Invitrogen, Karlsruhe, D
α -Ratte Alexa Fluor 488	Affe oder Ziege	Ratte IgG		1:500	Invitrogen, Karlsruhe, D

3.1.9 Zelllinien

Tabelle 3.10: verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
COS-7	Nierengewebszellen der grünen Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>)

Fortsetzung von Tabelle 3.10	
Zelllinie	Herkunft
HeLa	Humane Zervix-Karzinom-Zellen
Hek293	Humane Nierengewebszellen,
N2A	Murine Neuroblastomzellen
583-3	Murine embryonale Fibroblasten
LIMP-2-Knockout 583-2	LIMP-2-defiziente murine embryonale Fibroblasten

3.1.10 Mausstämme

Tabelle 3.11: Mausstämme für die Tritosomenpräparation

Wildtyp	CD53S ^{+/+} Wildtyp mit einem gemischten genetischen Hintergrund aus C57 BL/6J x 129SV/J eigene Auszucht
Limp-2 ^{-/-}	Limp-2-defizienter Stamm mit einem gemischten genetischen Hintergrund aus C 57 BL/6Jx 129 SV/J (Gamp et al. 2003)

3.1.11 Software

Tabelle 3.12: Software

Bezeichnung	Hersteller
Adobe Photoshop	Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
Adobe Illustrator	Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
DNASTAR Lasergene 8	Lasergene, Madison, WI, USA
EndNoteX4	Thomson Reuters, Carlsbad, CA
FluoView 1000 ASW 3.0	Olympus, Hamburg, D
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA

Fortsetzung von Tabelle 3.12	
Bezeichnung	Hersteller
Microsoft Powerpoint	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Microsoft Word	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Paint.Net	http://www.getpaint.net/download.html

3.1.12 Plasmide

Tabelle 3.13: Plasmide

Name	Resistenz	Herkunft
pBT3_C_mLimp-2_WT	Ampicillin	AG Schwake, Kiel
pPR3_N_mD12_wt	Ampicillin	AG Schwake, Kiel
pPR3_N_mD12_Δ_TMD	Ampicillin	AG Schwake, Kiel
pPR3_N_mD12_TMD_KCNE4	Ampicillin	AG Schwake, Kiel
pPR3_N_mD12-ΔCT_HA	Ampicillin	eigene Herstellung
56_pFrog-mLimp-2-myc	Ampicillin	AG Schwake, Kiel
pFrog-mLimp-2-HA	Ampicillin	AG Schwake, Kiel
pFrog-mLimp-2-ER-Ret-Myc	Ampicillin	AG Schwake, Kiel
pFrog-mD12_HA	Ampicillin	AG Schwake, Kiel
pFrog-mD12_Δ_TMD_HA	Ampicillin	AG Schwake, Kiel
pFrog-mD12-TM_E4_HA_HA	Ampicillin	eigene Herstellung
pFrog-mD12-ΔCT_HA_HA	Ampicillin	eigene Herstellung
pFrog-mD12_ΔN26_HA	Ampicillin	eigene Herstellung
pFrog-mD12-ΔELLG_HA_HA	Ampicillin	eigene Herstellung
pFrog-mD12-c_terminal_myc	Ampicillin	eigene Herstellung
pFrog-Chimera1_HA	Ampicillin	eigene Herstellung
pFrogChimera2_HA	Ampicillin	eigene Herstellung
pFrog-hGosr2_HA	Ampicillin	AG Schwake, Kiel
pCiNeo-Lamp2a_myc	Ampicillin	AG Blanz, Kiel

Fortsetzung von Tabelle 3.13		
Name	Resistenz	Herkunft
pFrog-hSec22b_myc	Ampicillin	eigene Herstellung
pFrog-hUse1_HA	Ampicillin	eigene Herstellung
pcDNA3.1-tmem192_myc	Ampicillin	AG Schröder, Kiel
peGFP	Kanamycin	AG Schwake, Kiel
pFrog-mLimp-2_I156_D-myc	Ampicillin	AG Schwake, Kiel

3.1.13 siRNA

Tabelle 3.14: verwendete siRNA

Bezeichnung	Hersteller
anti-hUSE1	Sigma Aldrich, Steinheim
anti-Limp-2	Sigma Aldrich, Steinheim

3.1.14 Klonierungsprimer

Tabelle 3.15: Klonierungsprimer für die Erstellung von Plasmiden

Name	Sequenz(5'-3')
mD12-SFI-h	CAGAGTGG CCATTACGGCC
mD12-deltaCT-SFI-r	AGCGAGCGCTAGA TACAGATCATGCTGATGAA
mD12-deltaCT-EcoRI-reverse	TGAATTCTTAGATAAA CAGGATCATGCTGATGAACAC
mD12-TM-E4-EcorI-reverse	TGAATTCTTATTTTCAG CCTGGGCATGATTTCG
mD12-BamHI-hin	AGGATCCGCGCAGGC GGAAGGAGCCTAT
mD12-BamHI-rev	AGGATCCTTTCAGCC TGGGCATGATTTCGGAT

Fortsetzung von Tabelle 3.15	
Name	Sequenz(5'-3')
mD12- Δ -N26-BamHI-hin	AGGATCCCGCTGT GAGTCGATGGCGG
BamHI-hGosr2-hin	AGGATCCGGACGCCT GGAGACGGCAGA
Fusionsprimer_1-h für Chimera_1	GCTTTCCAGGACAA GTGGCTGCTGTGGGCCA
Fusionsprimer_1-r	TGGCCCACAGCAGCCACT TGTCTTGAAAGC
EcoRI-mD12-rev_ vers2	GAATTCTTATTTTCAGCCT GGGCATGATTCGGATAAA
Fusion_Primer_2-h für Chimera_2	CAGAAGTCAGTGAA CTACTTTATGATAGGT
Fusions_Primer_2-r	ACCTATCATAAAGTAGTTC ACTGACTTCTG
EcoRI-hgosr2_rev	TGAATTCTCATGTCAGGTA CTGCACCACGAGG
Fusionsprimer_3-h für mD12- Δ ELLG_HA	AGTGAGATG CGGAGTATGGAACCATCTGGA
Fusionsprimer_3-r	TCCAGATGGTTCCATACTC CGCATCTCACT

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wird für die Vermehrung bestimmter DNA-Abschnitte benötigt (Mullis et al. 1986). Hierfür werden zwei Oligonukleotidprimer bestehend aus 15-25 Basen hergestellt, die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren. Der forward- oder hin-Primer bindet dabei den antisense-DNA-Strang am Anfang des in 5'-3'-Richtung

zu erstellenden Produktes, der reverse- oder rück-Primer an den sense-Strang der DNA am Ende des Produktes. Die eigentliche PCR-Reaktion besteht aus einer bestimmten Anzahl immer gleich ablaufender Zyklen und findet in einem Thermocycler statt, der es ermöglicht die Proben präzise in kurzer Zeit auf bestimmte Temperaturen zu erhitzen oder abzukühlen. Vor Beginn kommt es in einer initialen länger andauernden Denaturierungsphase zur Trennung möglichst vieler DNA-Stränge. Jeder Zyklus besteht nun aus drei Phasen. In der Denaturierungsphase werden die synthetisierten DNA-Abschnitte über Erhitzung auf 95°C voneinander getrennt. In der Annealing-Phase kommt es bei 55-65°C zur Anlagerung der Primer an die jeweiligen DNA-Abschnitte. Die hierfür optimale Temperatur lässt sich aus der Schmelztemperatur der Primer, die bei beiden möglichst ähnlich sein sollte, berechnen. Für gute Ergebnisse sollte die Annealing-Temperatur 2-5°C unterhalb der Schmelztemperatur liegen. In der Elongations-Phase lagert sich die hinzugegebene DNA-Polymerase, hier wird meistens die Pfu-Polymerase verwendet, an die Primer an und sorgt in 3'-5'-Richtung für eine Auffüllung der fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden. Die Dauer der Elongationsphase hängt von der Geschwindigkeit der jeweiligen Polymerase und der Länge des zu amplifizierenden Abschnittes ab. Nach Abschluss von 25-40 Zyklen erfolgt noch eine terminale Elongation und darauffolgend die Herunterkühlung des Ansatzes.

Tabelle 3.16: Standard-PCR mit Protokoll

Substanz	Volumen [µl]	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Wiederholung
ddH ₂ O	30,5	95	300	
dNTP's	5	95	30	35-40
Primer-hin(10µM)	2,5	55-60	30	
Primer-rück(10µM)	2,5	72	90	
Template(0,1µg/µl)	1	72	600	
10xPfu-Puffer	5	10	∞	
DMSO	2,5			
Pfu-Polymerase	1			

3.2.1.2 Klonierungs-PCR

Eine spezielle Form der PCR stellt die Klonierungs-PCR dar, die dazu dient eine DNA-Sequenz zu amplifizieren und gleichzeitig an beiden Enden mit Schnittstellen für Restrikt-

tionsendonukleasen zu versehen. So kann das erzeugte DNA-Fragment später in einen Expressionsvektor kloniert werden. Hierfür werden Primer verwendet, die vor oder nach ihrer jeweiligen Annealing-Sequenz die Schnittstellen für das jeweilige Enzym besitzen. Zusätzlich wird je nach verwendetem Enzym noch eine bestimmte Basenzahl vor der Schnittstelle benötigt. Diese Informationen können über die Website des Herstellers bezogen werden.

3.2.1.3 Fusions-PCR

Um Mutationen an bestimmter Stelle in der Sequenz einzuführen oder Chimären aus zwei Proteinen herzustellen, wird die Fusions-PCR verwendet. Diese verläuft in zwei Abschnitten, gezeigt am Beispiel der Erstellung der Deletionsmutante mD12- Δ ELLG_HA in Abb. 3.1.

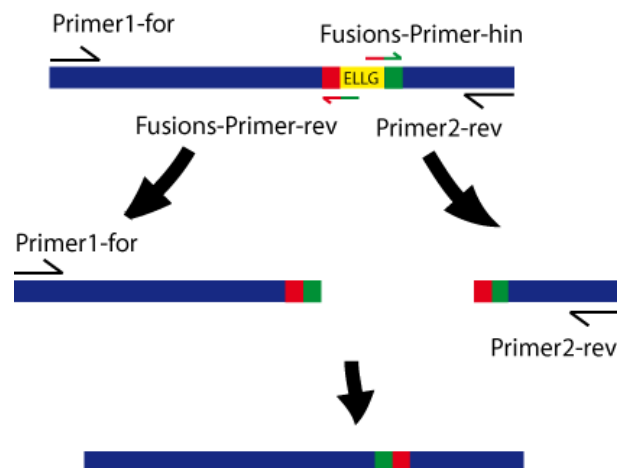


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung einer Fusions-PCR zur Herstellung der Deletionsmutante mD12- Δ ELLG_HA. Schwarze Pfeile zeigen an, dass eine PCR durchgeführt wurde.

- [1] Es werden zwei Primer entworfen (*forward* bzw. *reverse*), die 15 bis 20 Basenpaare Überlappung mit der DNA-Sequenz und die Mutation enthalten. In diesem Fall fehlt die Basenpaarsequenz für die Aminosäuren ELLG. Anschließend folgt ein mit der nachfolgenden Sequenz überlappender Teil. Nun werden 2 parallele PCRs durchgeführt, die einmal die Sequenz vom Anfang bis zur Deletion und von der Deletion bis zum Ende der Sequenz amplifizieren. Diese beiden erzeugten DNA-Fragmente überlappen sich jeweils mit 20-25 Basenpaaren.
- [2] Für die eigentliche Fusions-PCR werden nun diese beiden DNA-Fragmente als *template* verwendet mit den beiden Primern, die vor und hinter der zu deletierenden Sequenz binden, so dass ein zusammenhängendes DNA-Fragment entsteht, das die Mutation

enthält. Wichtig hierfür ist ein relativ langes Überlappungsareal der beiden ursprünglichen DNA-Fragmente, so dass diese hybridisieren können.

3.2.1.4 Agarosegelelektrophorese

Um DNA-Abschnitte bezüglich ihrer Größe aufzutrennen und weiterzuverarbeiten, wurde die Agarosegelelektrophorese verwendet. Hierfür werden 1%-2%w/v Agarose in TAE-Puffer aufgekocht und anschließend mit 1µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Nach dem Auskühlen der Flüssigkeit entsteht ein Gel, welches durch die in ihm enthaltene kleine Poren, die durch die Agarose gebildet werden, in der Lage ist Nukleinsäuren nach ihrer Größe aufzutrennen.

Um dies zu bewerkstelligen, wird die aufzureinigende DNA mit 6x Ladepuffer versetzt und in eine der vorher angelegten Geltaschen gegeben. Nun wird eine Spannung angelegt, die die negativ-geladene DNA in Richtung der Kathode laufen lässt. Die Geschwindigkeit ist abhängig von der Größe der Spannung und der Größe der einzelnen DNA-Fragmente. Je kürzer das Fragment, desto höher ist die Laufstrecke je Zeit. Um einen genaueren Überblick über die Größen zu bekommen, kann parallel ein Marker laufen, der DNA-Stücke definierter Länge besitzt.

Nun werden die Fragmente unter UV-Licht analysiert, da in diesem Wellenbereich das Ethidiumbromid, das in die DNA interkaliert, sichtbar gemacht werden kann. Zur Weiterverarbeitung werden die gewünschten Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem *High Pure PCR Purification Kit* nach Herstelleranweisungen gewonnen.

3.2.1.5 Restriktionsverdau

Um nun das gewonnene DNA-Fragment in einen Expressionsvektor klonieren oder die erfolgte Klonierung überprüfen zu können, bedient man sich spezieller, aus Bakterien gewonnener Restriktionsenzyme.

Diese erkennen, wenn es sich um sogenannte TypII-Restriktionsendonukleasen handelt, bestimmte palindromische DNA-Sequenzen und schneiden als Endonukleasen die DNA so, dass entweder überhängende (*sticky*) oder glatte (*blunt*) Enden (*Ends*) entstehen.

Nach Aufreinigung aus dem Agarosegel werden für einen sogenannten Doppelverdau nach Herstellerangaben 43µl oder 1-2µg des DNA-Fragments mit bestimmten Mengen der zwei Restriktionsenzyme und einem Puffer, der beiden Enzymen gute Bedingungen verschafft, versetzt. Nun wird der Ansatz zwei bis zwölf Stunden bei einer bestimmten für die Enzyme optimalen Temperatur im Thermocycler platziert und anschließend noch einmal über ein Agarosegel aufgereinigt.

3.2.1.6 Dephosphorylierung

Da die Selbstligation zirkulärer DNA in Plasmiden, die ein effektives Einfügen der klonierten Produkte verhindern würde, unerwünscht ist, muss ein Expressionsvektor nach Ende des Restriktionsverdau dephosphoryliert werden. Dies geschieht über die Zugabe einer modifizierten alkalischen Phosphatase (*Fast-AP*) für 15 Min bei 37°C.

3.2.1.7 Ligation

Das Einfügen der verdauten DNA-Fragmente in den von Restriktionsenzymen geschnittenen und dephosphorylierten Vektor geschieht durch Vermittlung einer T4-DNA-Ligase (Fermentas). Hierfür werden 7µl des DNA-Fragments, 1µl des Vektors, 1µl Puffer und 1µl T4-DNA-Ligase zusammengegeben. Im Kontrollansatz verwendet man anstatt des DNA-Fragmentes H₂O. Hierüber kann die Religationseigenschaft des Vektors überprüft werden. Der Ligasepuffer stellt hierbei unter anderem das für die Verknüpfung der 3'-Enden mit den 5'-Enden der DNA benötigte ATP bereit. Die Ligation wird nun nach 2h bei Raumtemperatur oder nach 12h bei 17°C durch Erhitzen auf 65°C deaktiviert.

3.2.1.8 Elektroporation

Mit der Elektroporation ist es möglich bestimmte, elektrokompetente Stämme von *E.coli*, XL1Blue, Plasmide aufnehmen zu lassen, die anschließend vermehrt und gewonnen werden können.

Für einen Ansatz werden 50µl vorgefertigter Bakterienlösung von -80°C aufgetaut. Danach werden 1µl des zu vermehrenden Plasmids hinzugegeben und die Bakterien in eine Elektroporationsküvette pipettiert. Daraufhin wird der Ansatz bei 2,5kV Spannung im *GenePulser* (400Ω Widerstand, 25µF Kapazität) elektroporiert und möglichst schnell in 1mL 37°C warmes LB-Medium überführt. Dort erfolgt eine Inkubation für 30 Min und anschließende Zentrifugation bei 3000rpm für 5 Min. Nach Abnahme des Überstands und Resuspension in 100µl wird die Bakterien suspension steril auf einer mit einem Selektionsantibiotikum versehenen LB-Agarplatte ausplattiert. Auf dem transformierten Plasmid befindet sich eine Genkassette mit dem Resistenzmechanismus für das jeweilige Antibiotikum. So kann gewährleistet werden, dass nur Bakterien auf der Platte wachsen, die das Plasmid aufgenommen haben. Inkubation erfolgt für 12h bei 37°C, Lagerung bei 4°C. Erfolgreiches Wachstum ist an der Bildung von Kolonien auf der Platte sichtbar, wovon jede einzelne aus einem einzelnen transformierten Bakterium hervorgegangen sein sollte.

3.2.1.9 Vermehrung und Aufreinigung von Plasmiden

Die Basis für die Vermehrung der Plasmide sind einzelne Kolonien, die auf den Agarplatten gewachsen sind und die monoklonal sein sollten. Für die massenhafte, monoklonale Vermehrung eines Plasmids werden einzelne Kolonien mit einem durch Hitze sterilisierten Zahnstocher gepickt und in 3ml antibiotikumhaltiges LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C im Horizontalschüttler inkubiert.

Retransformationen von Plasmiden, die bereits sequenziert worden waren, werden für das Wachstum in 200ml LB-Medium gegeben, um die Ausbeute zu erhöhen. Die Aufreinigung der reinen Plasmide erfolgt mit dem *Plasmid Miniprep Kit* bei kleinen Mengen, mit dem *PureYield Plasmid Midiprep System* nach Herstellerangaben. Die Konzentrationsbestimmung wird nachfolgend beschrieben.

3.2.1.10 Konzentrationsbestimmung von DNA

Um die Konzentration und Reinheit von DNA zu messen, macht man sich zu Nutze, dass doppelsträngige DNA ein Licht-Absorptionsmaximum bei 260nm Wellenlänge besitzt. Als Extinktion E wird die Absorptivität eines Materials bei einer bestimmten Wellenlänge bezeichnet, die proportional zur Konzentration ist. Über die Extinktionsmessung bei 260nm im 96-Loch-Mikrotiterplattenleser *Gen5* kann nun die Konzentration der aufgereinigten DNA bestimmt werden. Proteine absorbieren maximal bei 280nm, so dass der Quotient aus beiden Werten als Maß für die Reinheit der Probe gewertet werden kann. Hierbei werden Proben in denen der Quotient $E_{260}/E_{280} \geq 1,8$ ist, als ausreichend rein angesehen.

3.2.1.11 Sequenzierung von Plasmiden

Zur Überprüfung der Sequenz der hergestellten Plasmide werden diese extern bei der Firma GATC in Konstanz sequenziert. Hierfür werden die Proben nach Herstellerangaben auf eine Konzentration von 0,1µg/µl eingestellt und mit zwei maximal 600 Basen voneinander entfernt bindenden Sequenzierprimern eingeschickt. Die Sequenzierung erfolgt über die Kettenabbruchmethode nach Sanger. Das Ergebnis kann im Internet eingesehen und anschließend mit der *SeqMan*-Software von DNA-Star ausgewertet werden.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Kultivation von Zellen

Alle verwendeten Zelllinien werden als adhärenente Zellen in 10cm Schalen bei 37°C im Brutschrank in mit 5% CO₂ gesättigter Wasserdampfathmosphäre gelagert. Das Zellkulturmedium für die Haltung der Zellen besteht aus *DMEM High Glucose*, das mit 10%

fetalem Kälberserum zur Bereitstellung von Wachstumsfaktoren angereichert wird. Zur Vermeidung von Bakterienbesiedlung werden dem Medium außerdem Antibiotika in Form von 100U/ml Penicillin und 0,1mg/ml Streptomycin beigelegt. Für jede 10cm Schale werden 10ml Medium verwendet.

Alle Arbeiten werden unter der Sterilbank mit entweder steril verpackten oder autoklavierten Materialien durchgeführt. Nach jeder Benutzung wird der Arbeitsplatz gründlich mit *Pursept-A* desinfiziert.

Die Lagerung der Medien erfolgt bei 4°C.

3.2.2.2 Zellpassagierung

Die Zellen werden bei einer Konfluenz von 80-100% passagiert, solange sie nicht anderweitig verwendet werden. Hierfür wird das alte Medium mit einer sterilen Glaspipette abgesaugt und die Zellen werden zweimal vorsichtig mit sterilem PBS, das bei Raumtemperatur gelagert wird, gewaschen. Anschließend wird pro 10cm Schale 1ml einer bei 4°C gelagerten Lösung hinzugegeben, die Trypsin (0,5mg/ml) und EDTA (0,22mg/ml) in PBS enthält. Nun wird die Schale bei 37°C für etwa 10min inkubiert, so dass die Zellen durch die Wirkung des Trypsins ihre Adhärenz verlieren. Die Reaktion wird durch Zugabe von 4ml Zellkulturmedium gestoppt. Anschließend werden die 5ml Gesamtvolumen in ein 15ml *Falcon*-Röhrchen überführt und für 5min bei Raumtemperatur mit 230g zentrifugiert. Daraufhin wird der Überstand abgenommen und die Zellen werden in 5-10ml neuem Medium resuspendiert. Normalerweise werden für die Weiterhaltung der Zellen hiervon 10% in eine neue 10cm Schale überführt und mit frischem Zellkulturmedium auf 10ml aufgefüllt.

3.2.2.3 Transiente Transfektion von Zellen

Das Verfahren, mit dem fremde DNA oder RNA in eukaryotische Zellen über chemische, also nicht virale Vermittlung, eingebracht wird, bezeichnet man als Transfektion. Hierbei bildet das verwendete Transfektionsreagenz *FuGene* polykationische Polymerkomplexe mit der DNA, die von den Zellen aufgenommen werden. Die Transfektion von Zellen wird bei nach Verwendung der Zellen unterschiedlichen Konfluenzen durchgeführt.

20 Minuten vor der Transfektion werden pro Ansatz für jede 10cm Schale 3µg Plasmid-DNA und 9µl *FuGene HD* zu 100µl reinem *DMEM High Glucose Medium* gegeben und vermischt. Für 6cm Schalen werden 2µg DNA, für 6-Well-Schalen 1µg DNA verwendet. Anschließend wird das Gemisch auf die Zellen pipettiert. Das Medium kann nach etwa 4 Stunden gewechselt werden, da ab hier die Aufnahme der Plasmide in die Zelle erfolgt sein sollte. Nach einer Inkubationszeit von 24-48h im Brutschrank können die Zellen

weiterverarbeitet werden.

3.2.2.4 siRNA Behandlung der Zellen

Für die Versuche mit siRNA werden HeLa-Zellen im 1:10 Verhältnis von 10cm auf 6cm Schalen ausplattiert. Am nächsten Tag werden sie mit siRNA transfiziert, so dass von jeder der drei käuflich erworbenen anti-hUse₁-siRNA 6,67µl verwendet werden. Diese 20µl siRNA werden zu 100µl *DMEM High Glucose* hinzugegeben. Als Transfektionsreagenz dient hier *Lipofectamine*, das die siRNA in Liposomen aufnimmt, die mit der Plasmamembran der Zellen fusionieren können. Für 20µl siRNA werden 20µl *Lipofectamine* verwendet. Der Ansatz wird bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert und dann vorsichtig auf die Zellen gegeben. Im Falle der hier verwendeten siRNA wurden die Zellen nach 4 Tagen weiter verarbeitet.

3.2.2.5 Zellernte

Um Expressionsanalysen oder Immunpräzipitationen durchführen zu können, müssen Zellysate aus den kultivierten Zellen hergestellt werden.

Hierfür werden zur Inhibition der in der Zelle ablaufenden Vorgänge die Kulturschalen zuerst 5 Min auf Eis gestellt. Dann werden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach Zugabe von 1ml eiskaltem PBS, das mit dem Proteaseinhibitor *complete* versetzt ist, werden die Zellen mit einem Zellschaber von der Platte abgekratzt. Die Suspension wird für 10 Minuten bei 4°C mit 3000rpm zentrifugiert und der Überstand danach abgenommen. So können die Zellen bei -20°C eingefroren oder weiterverarbeitet werden.

3.2.2.6 Zellfixierung

Für die Immunfluoreszenzen werden die Zellen auf Deckgläschen in 6-Well-Platten ausplattiert und gegebenenfalls transfiziert. Die Transfektion wird aufgrund der besseren Übersichtlichkeit bei einer Konfluenz von 30-50% durchgeführt.

24-48h nach der Transfektion wird das Medium abgenommen und die Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen.

Daraufhin wird eine Fixierung mit 4%PFA/PBS durchgeführt. Hierbei kommt es zu einer Quervernetzung der Proteine über das PFA. Je 1ml dieser Lösung wird pro 6-Well verwendet. Nach 20 Minuten Inkubationszeit wird die Lösung abgesaugt und die Deckgläschen werden dreimal mit PBS gewaschen. Jetzt können die Zellen bei 4°C gelagert oder weiter verarbeitet werden.

3.2.2.7 Zellysatherstellung

Nach der Zellernte wird das Zellpellet zur Zellysatherstellung in 50-200µl Lysispuffer aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wird die Zellyse per Ultraschall bei 4°C durchgeführt, wobei zuerst 30 Sekunden mit maximaler Intensität sonifiziert, eine Stunde gewartet und dann nochmals sonifiziert wird. Anschließend werden die Zelltrümmer für 10 Minuten bei 4°C mit 140000rpm zentrifugiert. Der Überstand enthält die Proteinbestandteile der Zelle und wird als Totallysat bezeichnet.

3.2.2.8 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgt mittels des *BCA Protein Assay Kits* nach der BCA-Methode, bei der Bicinchoninsäure als Reagenz bei einer modifizierten Biuret-Methode eingesetzt wird.

10µl der 1:10 verdünnten Proben werden in Doppelwerten in zwei Wells einer 96-Well-Platte gegeben. Außerdem wird ein Proteinstandard auf BSA-Basis zur Erstellung der Eichkurve in Doppelwerten pipettiert. Anschließend werden in jedes Well 200µl des BCA-Reagenz gegeben und die Platte für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit kommt es zu einer Farbreaktion, die in ihrer Ausprägung von der Proteinkonzentration abhängig ist.

Die Auswertung erfolgt im 96-Loch-Mikrotiterplattenleser über eine Extinktionsmessung bei 562nm. Die von der Firma bereitgestellte Software ermöglicht es aus der Standardreihe per linearer Regression eine Eichgerade zu erstellen, anhand derer die Proteinkonzentration der Proben bestimmt werden kann.

3.2.2.9 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Um die Proben für die Beladung des Gels vorzubereiten, werden sie mit 5x Probenauftragspuffer versetzt und für 20 Minuten bei 60°C erhitzt und somit denaturiert. Der Probenauftragspuffer enthält DTT um die Disulfidbrücken der Proteine zu reduzieren, so dass es zum Verlust der Sekundär- und Tertiärstrukturen kommt. Das SDS dient der Maskierung der Eigenladung der Proteine.

Währenddessen werden die Gele je nach gewünschtem Auftrennungsverhalten selbst gegossen. Für die meisten Analysen wird ein 12,5%iges Polyacrylamidgel verwendet. Das Polyacrylamid bildet nach dem Auskristallisieren kleine Poren, in denen die Laufgeschwindigkeit je nach Molekulargewicht des Proteins unterschiedlich ist.

Dann werden die Gele in die SDS-PAGE-Kammer eingesetzt und die Kammer mit Laufpuffer gefüllt. Anschließend werden die Proben in die Sammelgeltaschen pipettiert und

eine Spannung von 100-150V angelegt. Um die Auftrennung zu kontrollieren und rechtzeitig stoppen zu können wird immer auch ein Marker pipettiert, *Page Ruler Prestained Plus*.

Anschließend werden die Proteine mit einem Westernblotverfahren auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert.

3.2.2.10 Membranpräparation

Für die Analyse der Membranverankerung von Proteinen wird aus Zelllysaten eine Membranpräparation durchgeführt.

Nach der Zelllysatherstellung in 300µl Complete-haltigem PBS werden 50µl der Suspensionslösung mit 1% Triton X versetzt, erneut sonifiziert und als Totallysat (TL) bezeichnet. Die restlichen 250µl werden für 10 Minuten bei 4°C mit 3000rpm zentrifugiert. Vom Überstand werden 50µl abgenommen, mit 1% Triton X versetzt, sonifiziert und als post-nukleärer Überstand (PN) weiterverarbeitet. Die verbliebenen 200µl werden nun in einer Ultrazentrifuge mit 500000rpm bei 4°C für 1h zentrifugiert. Der Überstand enthält die lösliche, zytosolische Fraktion (CF), die nach Zugabe 1% Triton X weiterverwendet wird. Das bei der Ultrazentrifugation entstandene Pellet enthält die Membranfraktion (MF), die in 50µl Lysispuffer aufgenommen und sonifiziert wird.

Anschließend wird in allen Fraktionen eine Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt und gleiche Proteinmengen werden auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und analysiert.

3.2.2.11 Tritosomenpräparation

Tritosomen sind Lysosomen aus mit TritonWR1339 behandelten Mäusen, deren Inhalt jedoch ansonsten im Wesentlichen mit dem unbehandelter Lysosomen übereinstimmt (Gersten, Kimmerer und Bosmann, 1974). Für die Präparation injiziert man Mäusen 3-4 Tage vor der Präparation 4µl 17% Tyloxapol/Gramm Körpergewicht intraperitoneal. Am Tag der Präparation werden die Mäuse mit Ether betäubt, dekapitiert und die Leber wird präpariert. Daraufhin wird die Leber in 5ml 0,25M eiskalter Sucrose homogenisiert und für 10 Minuten bei 4°C mit 2300rpm zentrifugiert. Der Überstand (=E1) wird abgenommen, das Pellet in 3,5ml Sucrose rehomogenisiert, ein erneuter Zentrifugationsschritt durchgeführt und die beiden Überstände werden zusammengeführt (E=E1+E2). E wird nun mit 0,25M Sucrose auf 9ml gebracht und bei 4°C für 7 Minuten mit 24500rpm im Vakuum zentrifugiert.

Der Überstand wird abgenommen und das Pellet wird mit einem Glasstab in 8,5ml 0,25M Sucrose resuspendiert und erneut bei 4°C für 7 Minuten mit 24500rpm unter Vakuumver-

schluss zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen. Im Pellet befinden sich jetzt nur noch Mitochondrien und Lysosomen. Zur Trennung beider wird eine isopyknische Dichtegradientenzentrifugation in einem Gradienten aus unterschiedlich dichten Sucroslösungen durchgeführt. Hierfür wird das Pellet zunächst in p 1.21 Sucrose-Lösung resuspendiert, so dass ein Endvolumen von 3ml entsteht. Daraufhin werden vorsichtig die nächste Schicht bestehend aus 3ml p 1.15 Sucrose-Lösung und die nächste Schicht bestehend aus 3ml 1.14 Sucroslösung mit einer 1000ml Pipette aufgeschichtet. Als letztes folgen 1,5ml der p 1.06 Sucroslösung. Dieser Dichtegradient wird nun unter Vakuumverschluss bei 4°C für 150 Minuten mit 25.500rpm zentrifugiert.

Nachher finden sich die Tritosomen in der Interphase der obersten und der nächstfolgenden Schicht und können vorsichtig abgenommen und im Westernblot weiter untersucht werden.

Mit dieser Methode lässt sich eine starke Anreicherung lysosomaler Proteine für die Detektion aber auch für proteomische Auswertungen erreichen.

3.2.2.12 Oberflächenbiotinylierung

Um die Proteine, die sich zu einem gegebenen Zeitpunkt an der Zelloberfläche befinden analysieren zu können, wendet man unter anderem die Methode der Oberflächenbiotinylierung an.

Hierfür werden Zellen, die vorher auf 10cm Schalen ausplattiert und gegebenenfalls transfiziert worden waren, zuerst für 5 Minuten auf Eis gestellt um Endozytosevorgänge zu stoppen. Dann werden pro 10cm Schale 5ml Biotinlösung auf die Zellen gegeben. Kontrollschalen werden nur mit PBS-CM behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten auf Eis wird die Biotinlösung durch Quenchingpuffer ersetzt, der überschüssige Biotinmoleküle absättigt. Nach erneuter Inkubation für 10 Minuten werden die Zellen dreimal mit PBS-CM gewaschen. Anschließend werden Zellernte und Zellyse wie oben beschrieben durchgeführt. 10% des Lysats werden als Totallysat beiseite gestellt.

Aus den restlichen 90% Lysat soll die biotinylierte Oberflächenfraktion gewonnen werden. Dies geschieht über Präzipitation mit Hilfe von Streptavidin gekoppelter Sepharosebeads. Pro Ansatz werden 50µl Beads verwendet. Das Lysat wird auf die dreimal mit Biotinylierungspuffer gewaschenen Beads gegeben und für 60 Minuten im Überkopfschüttler bei Raumtemperatur inkubiert.

Darauf folgen 5 Waschschrte mit 5 Minuten Inkubation im Überkopfschüttler, Zentrifugation der Beads bei 2000rpm, Abnahme des Überstands und Zugabe von 400µl Biotinylierungspuffer. Nach dem letzten Waschschrte werden die Beads mit 50µl 1x Probenauftragungspuffer bei 60°C für 20 Minuten aufgeköcht und können dann auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen werden.

3.2.2.13 EndoH-/ und PNGaseF-Verdau

Endo-N-acetyl- β -glucosaminidase H- (EndoH-) und Peptide-N4-(N-acetyl- β -glucosaminyl)-asparagineamidase- (PNGaseF-) Verdau werden zur Analyse von Glykosylierungen durchgeführt. Glykosylierungen sind posttranslationale Modifikationen, bei denen Zuckerreste an Asparagin-, Threonin, Tyrosin oder Serin-Seitenketten angefügt werden.

Zur Analyse muss zuerst ein Zelllysate mit möglichst hoher Proteinkonzentration gewonnen werden. 40 μ g Protein werden entweder mit EndoH-Puffer oder mit PNGase-Puffer 1 versetzt und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Die Menge an Puffer wird so gewählt, dass nach Zugabe aller verwendeten Puffer eine Endproteinkonzentration von 1-2 μ g/ μ l besteht.

Nach Abkühlung der Probe wird für den PNGase-Verdau PNGase-Puffer 2 in gleicher Menge wie PNGase-Puffer 1 hinzugegeben. Anschließend werden 1-2 μ l der jeweiligen Enzyme in die Ansätze pipettiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wird die Reaktion durch Zugabe von 5x Probenauftragspuffer und Erhitzen auf 60°C für 20 Minuten gestoppt.

3.2.3 Hefe-System

3.2.3.1 Funktionsweise des *Split-Ubiquitin Yeast-Two-Hybrid-Systems*

Mit Hilfe des *Split-Ubiquitin-Yeast-Two-Hybrid-Systems* ist es in einem Screening-Ansatz möglich für ein Zielprotein viele mögliche Interaktionspartner herauszufinden. Im Gegensatz zu dem traditionellen *Yeast-Two-Hybrid-System* können hier auch Interaktionen, die außerhalb des Zellkernes und vor allem zwischen zwei Membranproteinen stattfinden, beschrieben werden (Thaminy, Miller und Stagljar, 2004).

Hierfür wird das n-terminale Ende des zu untersuchenden Proteins, auch *bait* genannt, mit der c-terminalen Hälfte von Ubiquitin, *Cub*, fusioniert. Zusätzlich befindet sich am n-terminalen Ende des *bait*-Proteins der Transkriptionsfaktor LexA und das Protein Vp16, das aus den Herpes-Simplex-Viren stammt und die RNA-Polymerase aktivieren kann.

Am potentiellen Interaktor, dem *prey*-Protein, das in einem *screening*-Ansatz auch eine gesamte Bibliothek von Proteinen sein kann, befindet sich die n-terminale Hälfte von Ubiquitin, *Nub*. Kommt es nun zu einer Annäherung und Wechselwirkung von *bait* und *prey*, so verbinden sich beide Teile des Ubiquitins und können von ubiquitin-spezifischen Proteasen (*USPs*) erkannt und geschnitten werden. Daraufhin translozieren LexA und Vp16 in den Zellkern und aktivieren Gene, die es den Hefen mit den interagierenden Konstrukten ermöglichen, auf Histidin-freiem Medium zu wachsen. In einem *Screening*-Ansatz mit Hilfe einer cDNA-Datenbank können nun gewachsene Kolonien „gepickt“ und

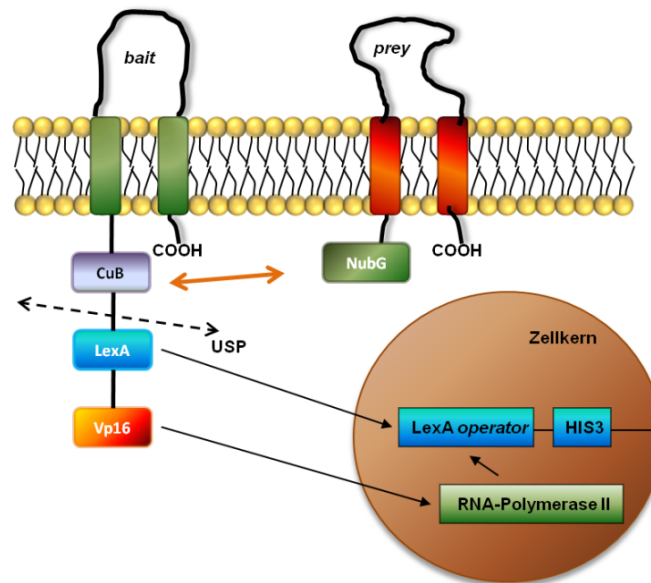


Abbildung 3.2: Modell des *Split-Ubiquitin-Yeast-Two-Hybrid-Systems*. Abbildung aus (Oelbe, 2012)

die darin enthaltenen putativen Interaktionspartner mit Hilfe der DNA-Sequenzierung analysiert werden.

3.2.3.2 Herstellung kompetenter Hefestämme

Aus einem bei -80°C gelagerten Hefezellaliquot werden $50\mu\text{l}$ der Hefe mit einer sterilen Pipettenspitze entnommen und auf einer Yeast Extract Peptone Dextrose plus Adenine medium (YPAD)-Platte ausgestrichen. Daraufhin erfolgt eine zweitägige Inkubation bei 30°C bis Kolonien sichtbar werden.

Eine dieser Kolonien wird mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und für die Animpfung einer Kultur in einem mit flüssigem YPAD-Medium gefüllten Erlenmeyerkolben verwendet, die über Nacht bei 30°C im Horizontalschüttler belassen wird.

Am nächsten Tag wird zur Wachstumsüberprüfung die optische Dichte der Kultur über die Extinktion bei 600nm im Vergleich zu unbeimpftem Medium bestimmt (OD_{600}). Dann wird das Volumen bestimmt, das benötigt wird um 100ml Medium mit einer OD_{600} von $0,4$ zu versehen (benötigtes Volumen = $(100\text{ml} \cdot 0,4) / (\text{bestimmte } \text{OD}_{600})$).

Nach Herstellung dieser 100ml umfassenden Kultur werden die Hefen $2-4\text{h}$ bei 30°C inkubiert bis sie eine OD_{600} von $0,6-0,8$ erreicht haben. Daraufhin werden zweimal 50ml in dasselbe Sarstedt-Röhrchen umgefüllt und mit 3200rpm und 4°C für 2 Minuten zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand verworfen und das Pellet in 10ml ddH_2O resuspendiert, erneut zentrifugiert und der Überstand wiederum abgenommen.

Nun erfolgt die Aufnahme des Pellets in 10ml LiSorb-Puffer, erneute Zentrifugation und Überstandsverwerfung. Jetzt wird das Pellet in $600\mu\text{l}$ LiSorb-Puffer aufgenommen. Dazu

werden 600µl denaturierte Lachs-Sperma-DNA pipettiert, die vorher 10 Minuten bei 95°C erhitzt und danach auf Eis gelagert wurde.

Diese Suspension wird nun in 50µl Aliquots aufgeteilt, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und kann bei -80°C gelagert werden.

3.2.3.3 Transformation der Hefen

Kompetente Hefezellen werden von -80°C aufgetaut. Zu je 50µl werden 300µl LiPEG und 2µl des zu transformierenden Plasmides pipettiert. Es folgt eine Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Zur besseren Aufnahme des Plasmids werden die Hefen für 15 Minuten im Wasserbad bei 42°C gelagert. Anschließend werden die Proben mit 3000rpm für 1 Minute zentrifugiert und der Überstand wird abgenommen. Das Hefe-Pellet wird in 75µl ddH₂O resuspendiert und die Hefen werden auf SC-Platten (*synthetic complete media*), die bestimmte Aminosäuren nicht enthalten, ausgestrichen. Jedes der Plasmide enthält Gene, die es der Hefe ermöglichen auf diesen Selektionsplatten zu wachsen.

Wachstum erfolgt bei 30°C für 2-3 Tage. Anschließend können, wie oben beschrieben, 50µl Aliquots hergestellt werden, die bei -80°C gelagert werden können.

3.2.3.4 Ausplattieren der Hefen zur Interaktionstestung und Verdünnungsreihe

Hefen, die mit beiden auf Interaktion zu testenden Plasmiden transformiert sind, *bait* und *prey*, wachsen in Kolonien auf SC-Leu/Trp-Platten, die kein Leucin und Tryptophan enthalten. Hiervon wird je eine Kolonie mit einer Pipettenspitze gepickt und über Nacht für eine Vorkultur bei 30°C in flüssiges SC-Leu/Trp-Medium gegeben.

Am nächsten Morgen wird die OD₆₀₀ von jeder Probe bestimmt und errechnet wieviel entnommen werden muss um die gleiche Anzahl an Hefen in 1ml ddH₂O zu erhalten (Menge an Hefen in µl = 1000/OD₆₀₀). Von dieser unverdünnten Ausgangslösung werden Verdünnungen hergestellt mit 1:10, 1:100 und 1:1000.

Mit Hilfe einer Schablone werden dann je 4µl jeder Verdünnungsstufe auf die Selektionsplatten pipettiert und nach 2-3 Tagen Wachstum bei 30°C in einem Flachbett-Scanner eingescannt.

3.2.4 Immunologische Methoden

3.2.4.1 Western Blot (WB)

Nach Durchführung einer SDS-PAGE werden die aufgetrennten Proteine zur weiteren Analyse auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Dieses Verfahren wird als Western

Blot bezeichnet. Hierbei werden die Proteine durch ein senkrecht zum Gel gerichtetes elektrisches Feld auf die Membran überführt, an der sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften bleiben. Zwei Methoden werden verwendet, das *Semidry-Blot*- und das *Tank-Blot*-Verfahren. Anschließend sind die Proteine auf der Membran der Immundetektion zugänglich.

3.2.4.2 *Semi-Dry-Blot*

Pro SDS-PAGE-Gel werden 4 *Whatman*-Papiere und eine Nitrocellulose-Membran auf die Größe des Polyacrylamidgels zugeschnitten und in Transferpuffer getränkt. Anschließend werden 2 *Whatman*-Papiere auf die *Semi-Dry-Blot*-Apparatur gelegt und darauf die Nitrocellulose-Membran. Das Gel wird nun auf der Membran platziert und mittels eines *Blotting Rollers* von Luftblasen befreit. Das Auflegen 2 weiterer *Whatman*-Papiere komplettiert die Schichtung. Nun wird die Apparatur verschlossen und eine Spannung von 20V für 60 Minuten angelegt.

3.2.4.3 *Tank Blot*

Bei der *Tank-Blot* Methode findet das Blotten in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer bei 4°C unter ständigem Umrühren des Puffers statt. Weitere Kühlung wird durch die Verwendung eines Kühlelementes erreicht. Ansonsten erfolgt der Zusammenbau des Membran-Gel-Paketes gleich, außer dass die äußerste Schicht des *Whatman*-Papiers durch Schwämme ersetzt wird. Der Transfer wird entweder mit 100V für 60 Minuten, mit 0,8 A für 120 Minuten oder mit 20 V über Nacht durchgeführt. Im letzteren Fall wird am nächsten Morgen noch einmal 70V Spannung für 30 Minuten angelegt.

3.2.4.4 Proteindetektion

Die Immundetektion dient der Darstellung bestimmter, auf der Nitrocellulosemembran gebundener Proteine. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermeiden wird die Membran auf einem Horizontalschüttler für 60 Minuten mit einer Lösung aus 5% Milchpulver in TBS/T (*Blotto*) blockiert.

Danach erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper in gewünschter Konzentration in *Blotto* in einem 50ml Sarstedt-Röhrchen für 1h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Anschließend wird die Membran je dreimal 10 Minuten in TBS/T gewaschen. Die Inkubation im HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper (horseradish peroxidase = Meerrettichperoxidase), der an den jeweiligen Primärantikörper bindet, geschieht für 1h bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgen 5 Waschschrte für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit TBS/T.

Durch Zugabe von *ECL Advanced* wird die HRP-katalysierte Chemilumineszenzreaktion gestartet.

Die Auswertung erfolgt mit einer Chemolumineszenzkamera (*LAS-4000 mini*) und Software des Herstellers.

3.2.4.5 Koimmunpräzipitation

Die Koimmunpräzipitation dient dem Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Zuerst wird ein Lysat je einer 10cm Schale der transfizierten Zellen in EBC-Puffer erstellt und eine Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt. Dann werden, soweit nicht anders beschrieben, 500µg Protein mit EBC-Puffer auf ein Volumen von 500µl aufgefüllt und 1µl des präzipitierenden Antikörpers hinzugefügt. Danach werden die Proben bei 4°C über Nacht im Überkopfschüttler inkubiert. Parallel dazu werden pro Probe 50µl der Protein G gekoppelten Sepharose-Beads mit 3% BSA/PBS Lösung blockiert.

Am nächsten Tag werden die Proben auf die Beads gegeben und bei Raumtemperatur für 30 Minuten im Überkopfschüttler vermischt. Hier kommt es zur Bindung des Protein G an den Fc-Teil des Antikörpers.

Daraufhin werden 5 Waschschriffe durchgeführt, bestehend aus Zentrifugation der Beads bei 4°C mit 7000rpm für 2 Minuten, vorsichtiger Abnahme des Überstands mit einer dünnen Kanüle, Hinzugabe von 400µl EBC-Puffer und Über-Kopf-Schütteln für 5 Minuten bei 4°C. Nach dem letzten Waschschriff werden 50µl 1x Probenauftragspuffer auf die Beads gegeben und diese bei 60°C für 20 Minuten erhitzt.

3.2.5 Mikroskopische Methoden

3.2.5.1 Immunfluoreszenz

Bei der Immunfluoreszenz werden Strukturen in der Zelle zuerst von einem Primäran-tikörper gebunden. Anschließend wird dieser wiederum von einem Sekundäran-tikörper erkannt, der an ein Fluophor gekoppelt ist, das bei geeigneter Anregung mit einer bestimmten Wellenlänge Licht einer anderen Wellenlänge emittiert, welches dann detektiert wird.

Zu Anfang werden die Zellen, die vorher fixiert worden sind, 5 Minuten mit 0,2% Saponin in PBS permeabilisiert, so dass die Antikörper in das Zellinnere gelangen können.

Dann werden im nächsten Schritt freie Aldehydgruppen mit 0,12% Glycin in 0,2% Saponin/PBS für 10 Minuten abgesättigt. Anschließend folgt ein Waschschriff mit 0,2% Saponin/PBS.

Daraufhin werden die Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 10% FCS in 0,2% Saponin/PBS zur Verhinderung unspezifischer Bindung der Antikörper blockiert.

Die weiteren Schritte werden in einer mit feuchten Cellophantüchern ausgelegten, dunklen Kammer durchgeführt. Vorher wird der Primärantikörper in gewünschter Konzentration in 10% FCS in 0,2% Saponin/PBS vorgelegt. Dann werden 50µl der Antikörperlösung pro Deckglas auf Parafilm pipettiert, der in der Kammer ausgelegt ist. Darauf werden die Deckgläser mit der zellhaltigen Seite nach unten gelegt. Die Inkubation dauert 60 Minuten. Es folgen 5 Waschschrte in 0,2% Saponin in PBS und die Inkubation mit dem fluophor-gekoppelten Zweitantikörper in 10% FCS in 0,2% Saponin/PBS. Nach erneuten 5 Waschschrten in 0,2% Saponin/PBS und zweimaligem Waschen in ddH₂O werden die Deckgläser mit DABCO- und DAPI-haltigem Mowiol auf Objektträgern immobilisiert. DAPI färbt hierbei die Kerne und DABCO dient der Verhinderung des Ausbleichens der Farbstoffe.

3.2.5.2 Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur Betrachtung der immunfluoreszenztechnisch angefärbten Zellen wird das konfokale Laserscanning-Mikroskop *Fluoview 1000* verwendet.

Die Anregung erfolgt mit nachfolgenden Lasern. Die Standardvergrößerung ist 100-fach mit 1-3fachem optischem Zoom. Zur Vermeidung des Überlappens werden einzelne Farbkäle im *sequential* Modus aufgenommen. Die Verweildauer der Laser auf jedem Pixel beträgt 40-100µs.

Die Auswertung erfolgt mit der *FV1000-ASW 3.0 Viewer* Software des Mikroskopherstellers und *Adobe Photoshop*.

Tabelle 3.17: Verwendete Laser im konfokalen Laserscanning-Mikroskop

Bezeichnung	Anregungswellenlänge	Darstellungsfarbe
DAPI	405	blau
Alexa Fluor 488	488	grün
Alexa Fluor 594	594	rot

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Validierung der Ergebnisse des Hefescreens

4.1.1 Interaktion von murinem Limp-2 mit murinem D12 in der Hefe

Zuerst sollte das Ergebnis des vorher durchgeführten *Split-Ubiquitin-Yeast-Two-Hybrid-Screens* Tab. 6.1 in Bezug auf die Interaktion von murinem Limp-2 (mLimp-2) und dem murinen SNARE D12 (mD12) validiert werden. Hierfür wurden kompetente Hefen mit dem in dem oben erwähnten Screen verwendeten mLimp-2-Konstrukt und einer Positiv-Kontrolle NubG, einer Negativ-Kontrolle, NubI, und dem unveränderten mD12₋HA transformiert.

Die Positiv-Kontrolle NubG ist hierbei die n-terminale Hälfte von Ubiquitin, die auf jeden Fall mit der c-terminalen Hälfte, welche mit mLimp-2 fusioniert ist, interagiert. Die Negativ-Kontrolle NubI, bei der an einer bestimmten Stelle des n-terminalen Teils von Ubiquitin eine Punktmutation zu einem Isoleucin eingefügt ist, interagiert nicht mit dem c-terminalen Teil von Ubiquitin, so dass kein Wachstum auf der histidinfreien Platte stattfinden sollte. Der linke Teil der Abb. 4.1 zeigt das Wachstum der mit je zwei Konstrukten transformierten Hefen auf Leucin und Tryptophan-freien Platten in absteigender Verdünnung von 1:1 bis 1:1000. Fotografiert wurden die Kolonien nach 48 Stunden Wachstum. Sichtbares Wachstum bedeutet, dass die jeweiligen Hefen beide Konstrukte aufgenommen haben, das Ergebnis der Interaktionsuntersuchung also valide sein sollte.

Die Interaktion zweier Proteine wird auf Histidin-freien Platten auf der rechten Seite der Abb. 1.1 sichtbar. Nur in Hefen, in denen die beiden exprimierten Konstrukte miteinander interagieren, bildet der c-terminale Teil mit dem n-terminalen Teil des Ubiquitins ein vollständiges Ubiquitinmolekül. Daraufhin kommt es zur Freisetzung des Ubiquitins

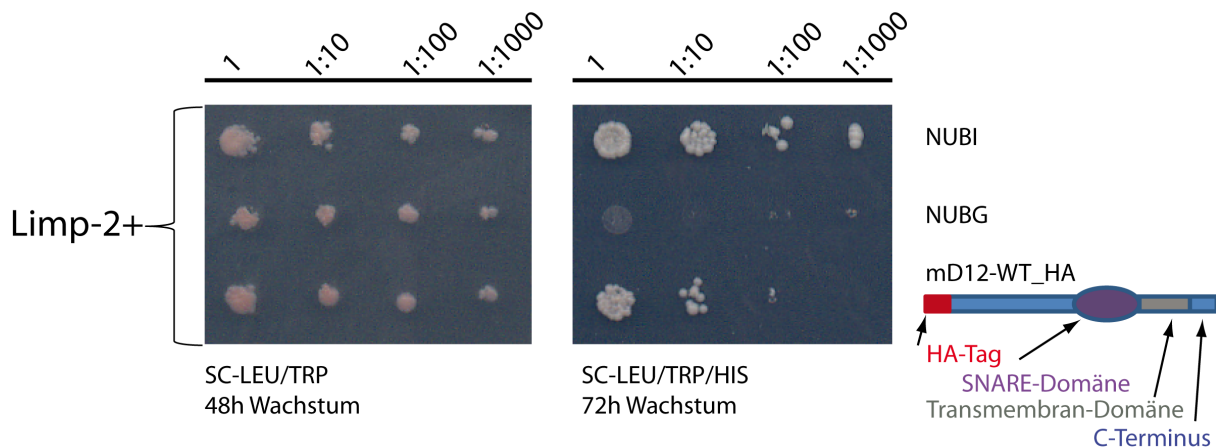


Abbildung 4.1: Validierung des Ergebnisses aus dem Hefe-Screen: Hefen wurden mit mLim-2 und der Positivkontrolle NubG oder der Negativkontrolle NubI oder mD12_HA transformiert und in einer Verdünnungsreihe auf Leu/Trp-Medium oder Leu/Trp/His-Medium gegeben. Nach 48h Stunden wurde das Wachstum auf der Leu/Trp-Platte untersucht, nach 72h auf der Leu/Trp/His-Platte.

durch in der Hefe vorhandene Proteasen. An das Ubiquitin angehängt ist der Transkriptionsfaktor LexA-VP15, der es der jeweiligen Hefe erlaubt, auf der Histidin-freien Platte zu wachsen, wie auch im Methodenteil beschrieben. Wie zu sehen ist, kommt es nach 72 Stunden sowohl zum Wachstum der Hefen, die mit der Positiv-Kontrolle und mLim-2, als auch der Hefen, die mit mLim-2 und mD12_HA transformiert wurden. Die Negativkontrolle zeigt kein Wachstum und lässt somit die Aussage zu, dass jegliche gefundene Interaktion im System valide ist, da ohne funktionierende Ubiquitinkomplettierung kein Wachstum vorhanden ist. Um eine Aussage über die Stärke der Interaktion zu erhalten, werden die Hefen in einer Verdünnungsreihe von 1:1, 1:10, 1:100 und 1:1000 auf die Platte aufgetragen. Hier zeigt sich eine Interaktion sowohl in der unverdünnten als auch in der 1:10 verdünnten Probe.

Somit lässt sich das Ergebnis des Hefe-Screens bestätigen.

4.1.2 Konstruktion verschiedener Deletionsmutanten von murinem D12

Um Hinweise auf die mögliche Interaktionsstelle auf Seiten von mD12 zu bekommen, wurden in der Hefe drei Konstrukte von mD12 verwendet. Hierbei handelt es sich um das Konstrukt mD12- Δ TM_HA, bei dem die Transmembrandomäne von mD12 entfernt wurde, das also in löslicher Form im Zytosol vorliegt und um ein weiteres Konstrukt mD12-TM_E4_HA, bei dem über eine Fusions-PCR die Transmembrandomäne von mD12 durch die Transmembrandomäne des Proteins KCNE4 ersetzt wurde, von dem bekannt ist, dass es nicht mit mLim-2 interagiert. In dem dritten Konstrukt, mD12- Δ CT_HA, wurde der

C-Terminus des Proteins nach der vorhergesagten Transmembrandomäne entfernt. Alle Konstrukte besitzen ein n-terminales HA-Tag zur Detektion im Westernblot.

4.1.3 Testung verschiedener Mutanten von D12 auf Interaktion mit Limp-2 in der Hefe

Nach Transformation kompetenter Hefen mit den oben beschriebenen Konstrukten mD12_HA, mD12- Δ CT_HA, mD12- Δ TM_HA, mD12-TM_E4_HA und mLimp-2 wurde nach 48h zuerst die Koexpression der jeweiligen Konstrukte auf der SC-Leu/Trp-Platte überprüft. Wie in Abb. 4.2 zeigt sich überall regelmäßiges Wachstum mit nach Verdün-

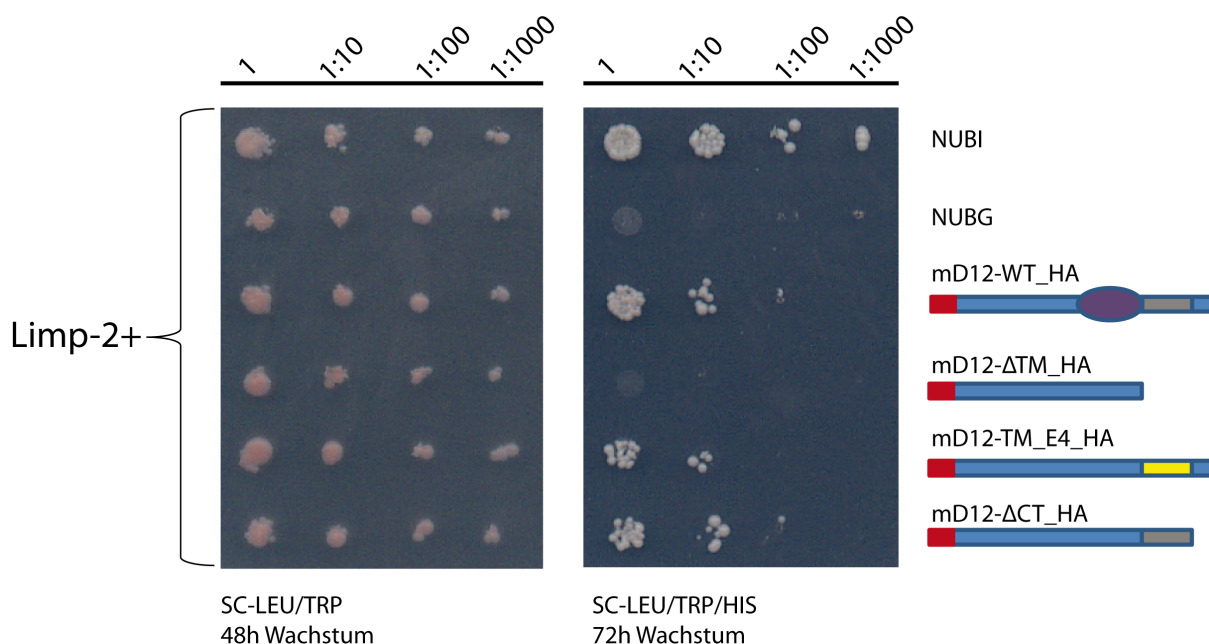


Abbildung 4.2: Untersuchung verschiedener Konstrukte von mD12 auf Interaktion: Kompetente Hefen wurden mit mLimp-2 und der Positivkontrolle NubG oder der Negativkontrolle NubI oder mD12_HA oder mD12-TM_E4_HA oder mD12- Δ CT_HA oder mD12- Δ TM_HA transformiert und in einer Verdünnungsreihe auf Leu/Trp-Medium oder Leu/Trp/His-Medium gegeben. Nach 48h Stunden wurde das Wachstum auf der Leu/Trp-Platte untersucht, nach 72h auf der Leu/Trp/His-Platte. Zur besseren Verdeutlichung der Proteinstruktur findet sich wie in Abb. 4.1 eine symbolhafte Darstellung der jeweiligen Proteine unter der Beschriftung. Das n-terminale HA-Tag ist hierbei in Rot, die Transmembrandomäne von mD12 in grau und die Transmembrandomäne von KCNE4 in gelb dargestellt.

nung abnehmender Kolonienzahl, weshalb das noch auszuwertende Ergebnis der Interaktionsplatte als valide angesehen werden kann. Wären hier bereits Hefen nicht gewachsen, hätte dies als Zeichen dafür gewertet werden können, dass die Transformation nicht erfolgreich war. Dies hätte zur Folge gehabt, dass das Interaktionsergebnis nicht hätte verwertet werden können.

Nach 72h wurde auf der Platte ohne Leucin, Tryptophan und Histidin die Interaktion

ausgewertet. Hier zeigt sich bei der Positiv- und Negativkontrolle das erwartete Ergebnis. Außerdem findet sich, wie oben schon gezeigt, eine Interaktion von mD12_HA und mLimp-2. Der im Zytosol erwartete Teil von mD12, mD12- Δ TM_HA interagiert nicht mehr mit mLimp-2. mD12-TM_E4_HA und mD12- Δ CT_HA interagieren beide. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sich die Interaktionsstelle höchstwahrscheinlich im n-terminalen, zytosolischen Teil von mD12 befindet, dieser jedoch in der Membran verankert sein muss. Eine zweite Möglichkeit wäre, dass die Sensitivität des Systems zu hoch und ein Wachstum trotz fehlender Interaktion sichtbar ist.

4.2 Validierung in Säugerzellen

Die ersten Hinweise auf eine mögliche Interaktion der beiden Proteine wurden im Hefesystem gefunden. Hier bestehen jedoch zum Teil erhebliche Unterschiede zu Säugetierzellen wie zum Beispiel die Glykosylierung von Proteinen wie Limp-2 betrifft. Außerdem existieren in Hefen Vacuolen anstatt des Lysosoms. Weiterhin ist bekannt, dass der *Yeast-Two-Hybrid-Screen* sehr anfällig für falsch-positive Ergebnisse ist. Aus diesem Grund sind die gewonnenen Erkenntnisse nur ein erstes Indiz für eine möglicherweise in tierischen Zellen stattfindende Interaktion. Daher wurden die nächsten Experimente in Säugerzellen durchgeführt, um die Sicherheit der Aussagen über die Interaktion zu erhöhen.

4.2.1 Umklonierung der Hefe-Konstrukte in den Säugerexpressionsvektor pFrog

Um die jeweiligen Konstrukte in Säugerzellen zu exprimieren, wurden sie zuerst in einen anderen Vektor mit einem geeigneten Promotor umkloniert. Hierfür wurde der Vektor pFrog gewählt, der eine starke Expression von Proteinen erlaubt (Gunther et al. 1998). Für die Umklonierung wurden PCR-Primer erstellt, die an das n-terminale Ende der DNA-Sequenz des Proteins eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease BamHI und an das c-terminale Ende eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym EcoRI anfügten. Dies ermöglichte es, die Konstrukte so in die Multiple Cloning Site des modifizierten Vektors pFrog einzufügen, dass das n-terminal gelegene Hämagglutinin-Tag (HA) und das Startcodon mit überführt werden konnten. So ist es möglich, das jeweilige Protein, für das noch kein endogener Antikörper etabliert ist, und veränderte Konstrukte dieses Proteins später im Westernblot und der Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen das Tag zu detektieren. Alle umklonierten Konstrukte wurden sequenziert, um Mutationen, die zur Sequenzveränderung führen könnten, auszuschließen.

4.2.2 Expression und Lokalisation des mit einem HA-Tag versehenen Konstruktes von D12 in Cos7-Zellen

Zur Testung der umklonierten Konstrukte wurden mD12_HA und mD12- Δ TM_HA in Cos7-Zellen, die einen Säugetierursprung haben, exprimiert und eine Membranfraktionierung durchgeführt. Hierbei zeigt sich in Abb. 4.3, dass die Expression mit dem pFrog-

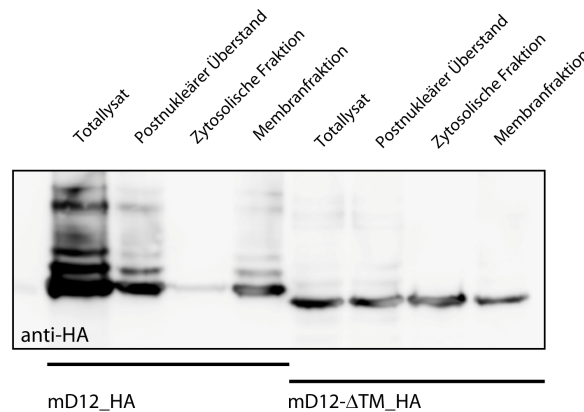


Abbildung 4.3: Membranfraktionierung von mD12 und mD12- Δ TM_HA: Cos7-Zellen wurden mit mD12_HA und mD12- Δ TM_HA transfiziert. Anschließend wurde eine Membranfraktionierung durchgeführt. Totallysat, postnukleäre Fraktion, zytosolische Fraktion und Membranfraktion wurden auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und mit dem anti-HA-Antikörper in 1:500-Verdünnung gefärbt.

Vektor gut funktioniert. Außerdem sieht man, dass das überexprimierte Protein mD12_HA vor allem in Membranen lokalisiert ist und sehr wenig zytosolisch, wie es die Funktion als SNARE-Protein erwarten lässt. Das Konstrukt mit der deletierten Transmembrandomäne, mD12- Δ TM_HA, verteilt sich gleichmäßig auf zytosolische und Membranfraktion, wobei es hier wahrscheinlich an andere Proteine wie zum Beispiel SNARE-Proteine gebunden wird, da es selbst keine Membranverankerungsmöglichkeit besitzt.

4.2.3 Koimmunpräzipitation von D12 nach Immunpräzipitation von Limp-2

Um nun die Interaktion, die in der Hefe gefunden wurde, auch in Cos7-Zellen zu zeigen, wurde die Methode der Immunpräzipitation angewandt. Hierbei werden die beiden auf mögliche Interaktion zu untersuchenden Proteine in Cos7-Zellen koexprimiert und nach 2 Tagen ein Zelllysate angefertigt. Anschließend wird ein Protein mit dem jeweiligen Antikörper und der Hilfe von Protein-G-gekoppelten Beads aus dem Zelllysate präzipitiert. Besteht nun eine Interaktion der beiden Proteine, wird das nicht-präzipitierte Protein kopräzipitiert. Auf jeweils zwei SDS-PAGE-Gele werden nun die Lysate und das Präzipitat aufgetragen. Das Immunpräzipitat wird mit dem Antikörper gegen das präzipitierte

Protein gefärbt und als IP (Immunpräzipitation) bezeichnet. Außerdem wird es mit dem Antikörper gegen das potentiell interagierende Protein gefärbt und als CoIP (Koimmunpräzipitation) bezeichnet. Für alle Versuche wurde das mit einem myc-Tag versehene

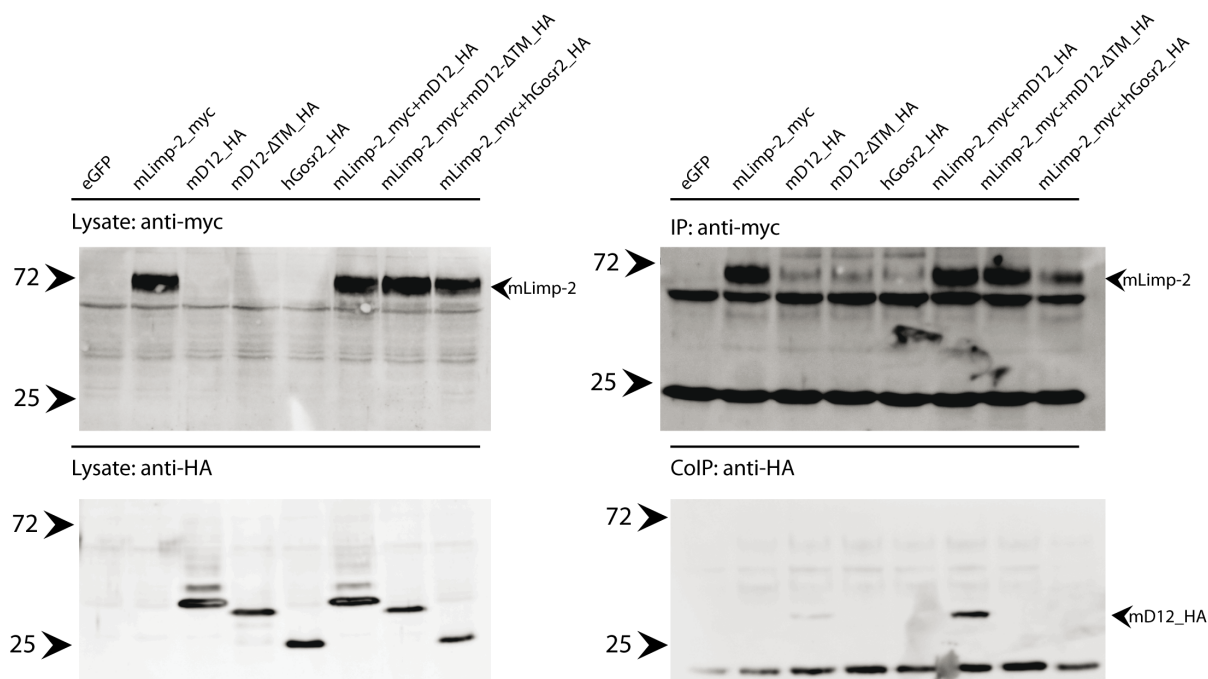


Abbildung 4.4: Koimmunpräzipitation von mD12 und mLimp-2: Cos7-Zellen wurden mit eGFP, mLimp-2_myc, mD12_HA, mD12- Δ TM_HA, hGosr2_HA einzeln transfiziert. Doppeltransfektionen wurden durchgeführt mit mLimp-2_myc und mD12_HA oder mD12- Δ TM_HA oder hGosr2_HA. Die Lysate wurden auf je ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und mit anti-HA oder anti-myc gefärbt.

Die Immunpräzipitation wurde mit dem anti-myc-Antikörper durchgeführt (Gele auf der rechten Seite der Abbildung). Der Blot des Immunpräzipitates wurde für den mit IP beschrifteten Blot mit anti-myc und für den mit CoIP beschrifteten Blot mit anti-HA gefärbt. Die in allen Spuren der IP und CoIP vorhandenen Banden unterhalb von 25kDa und 72kDa sind die schweren und leichten Ketten des Antikörpers, mit dem präzipitiert wurde.

Konstrukt von mLimp-2, mLimp-2_myc verwendet. Um eine unspezifische Bindung des zu untersuchenden Proteins an die Sepharose-G-Beads auszuschließen, wurden Einzeltransfektionen und dann Kotransfektionen der Proteine mit mLimp-2_myc durchgeführt. Eine Einzeltransfektion mit eGFP zeigte unspezifische Antikörperbanden. Wie auf den beiden je mit HA- und myc-Antikörper gefärbten Blots in Abb. 4.4 der Lysate zu sehen ist, haben die jeweiligen Einzel- und Doppeltransfektionen funktioniert. Hier wurden als Konstrukte mD12, mD12- Δ TM_HA und humanes Gosr2 verwendet. Gosr2 ist wie D12 ebenfalls ein SNARE, das sich sowohl im ER als auch im Golgi-Apparat befindet. Es bildet einen Komplex mit den SNAREs Ykt6, Gosr1 und Syntaxin5 und ist hierin zuständig für den anterograden ER-Golgi-Transport (Lowe et al. 1997). Hier wurde es als Kontrolle verwendet, um die Spezifität einer möglichen Interaktion von mLimp-2 mit mD12

zu zeigen. Wie auf dem Immunpräzipitationsblot sichtbar, wurde mLimp-2-myc mit dem Anti-myc-Antikörper erfolgreich präzipitiert, sowohl in der Einzeltransfektion als auch in den Doppeltransfektionen. In der Kotransfektion mit hGosr2 ist die präzipitierte Proteinmenge etwas geringer.

In der Koimmunpräzipitation zeigt sich nur eine starke Signalbande in der Doppeltransfektion von mLimp-2_myc und mD12_HA, was für eine Interaktion der beiden Proteine in Überexpression spricht. Eine sehr schwache Bande ist jedoch auch in der Einzeltransfektion von mD12_HA zu sehen, was auf eine unspezifische Bindung des Proteins an die Sepharose-G-Beads hinweist. Die im Vergleich jedoch sehr viel stärkere Bande in der Doppeltransfektion spricht für eine Interaktion von mD12 mit mLimp-2.

Die anderen beiden Konstrukte, hGosr2_HA und mD12_ΔTM_HA, werden nicht koimmunpräzipitiert, was gegen eine Interaktion spricht und im Falle von hGosr2 die Spezifität der Interaktion von mD12 und mLimp-2 anzeigt. Die fehlende Interaktion von mLimp-2 und mD12_ΔTM_HA ist nun sowohl in der Hefe als auch in der Koimmunpräzipitation in Cos7-Zellen gezeigt worden.

Um auch auf der Seite von mLimp-2 die Spezifität der Interaktion in der Überexpression zu zeigen, wurde ein Koimmunpräzipitationsexperiment mit einem weiteren lysosomalen Membranprotein, mLamp2a, durchgeführt. Hierbei wurden erneut Einzeltransfektionen von mLimp-2_myc, mLamp2a_myc und mD12_HA und Doppeltransfektionen von mLimp-2_myc und mD12_HA und von mLamp2a_myc und mD12_HA durchgeführt. In der Lysatkontrolle in Abb. 4.5 zeigt sich eine gute Expression aller Konstrukte bis auf die Einzeltransfektion von mLamp2a_myc, die infolgedessen auch nicht immunpräzipitiert wird. In den beiden Doppeltransfektionen jedoch kommt es zu einer Immunpräzipitation von mLimp-2_myc und mLamp2a_myc, die etwa gleich stark ist. mD12_HA jedoch wird nur bei Immunpräzipitation von mLimp-2_myc kopräzipitiert, was ein weiteres Indiz für die Spezifität der Interaktion ist. Um die Validität der bisherigen Interaktionsstudien zu erhöhen, wurde versucht, bei Immunpräzipitation von mD12_HA auch mLimp-2_myc zu koimmunpräzipitieren, die Interaktion also von der anderen Seite zu zeigen. Hier jedoch kommt es, wie in Abb. 4.6 zu sehen, bei mittlerer bis guter Immunpräzipitation von mD12_HA mit dem HA-Antikörper nicht zu einer Koimmunpräzipitation von mLimp-2_myc. Diese Versuche wurden noch einige Male mit unterschiedlichen Inkubationszeiten des Antikörpers und unterschiedlich starken Lysispuffern wiederholt und zeigten dasselbe Ergebnis. Auch das Ersetzen des HA-Tags durch das myc-Tag führte nicht zu anderen Ergebnissen.

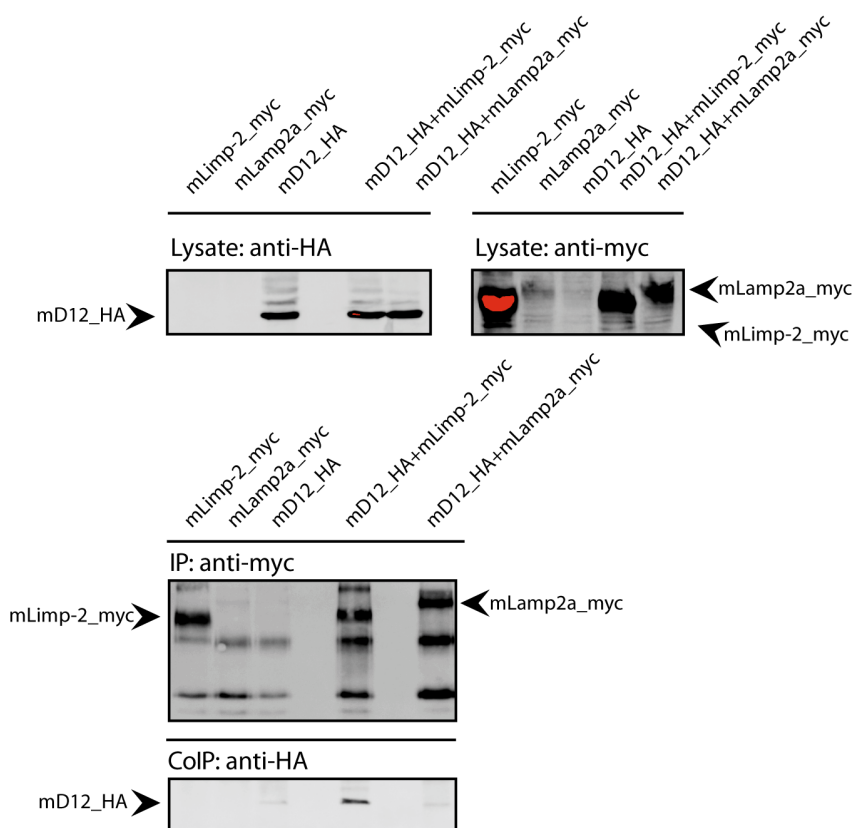


Abbildung 4.5: Koimmunpräzipitation von mD12_HA bei Immunpräzipitation von mLamp2a_myc: Cos7-Zellen wurden mit mLimp-2_myc, mLamp2a_myc und mD12_HA einzeltransfiziert. Außerdem wurde mD12_HA sowohl mit mLimp-2_myc als auch mit mLamp2a_myc kotransfiziert.

Immunpräzipitiert wurde mit dem anti-myc-Antikörper. Die Lysate und das Immunpräzipitat wurden auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und mit anti-HA und anti-myc gefärbt.

4.2.4 Klonierung eines carboxyterminal mit einem myc-Tag markierten Konstruktes von D12

Da es möglich ist, dass die Bindung des HA-Antikörpers an das n-terminal gelegene HA-Tag von mD12 zu einer sterischen Inhibition der Bindung von mLimp-2 an mD12 führt und es deswegen zu keiner Koimmunpräzipitation kommt, wurde ein Konstrukt von mD12 erstellt, das ein myc-Tag am c-terminalen Ende des Proteins besitzt. Hierfür wurde mittels PCR an das n-terminale Ende von mD12 eine BamHI- und an das c-terminale Ende eine HindIII-Schnittstelle angefügt, welche es ermöglichten, das Konstrukt so in den Vektor pFrog einzufügen, dass an das c-terminale Ende des Proteins ein myc-Tag angefügt wurde.

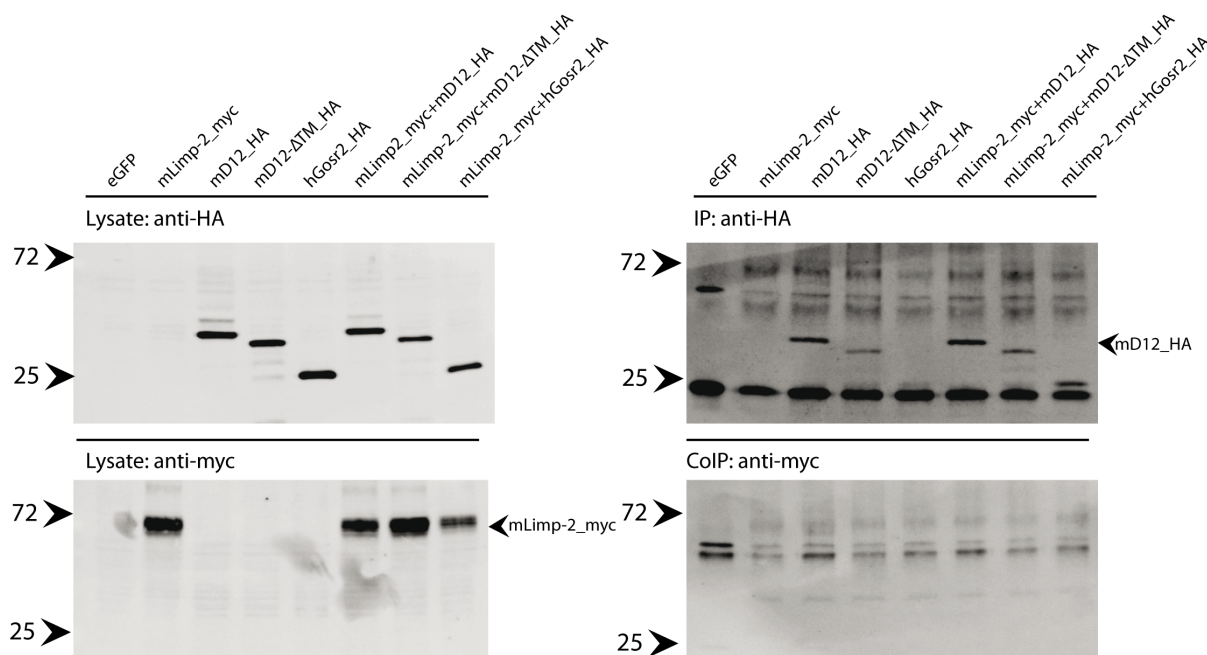


Abbildung 4.6: Koimmunpräzipitation von mLimp-2 bei Immunpräzipitation von mD12_HA: Cos7-Zellen wurden mit eGFP, mLimp-2_myc, mD12_HA, mD12- Δ TM_HA, hGosr2_HA einzeltransfiziert. Doppeltransfektionen wurden durchgeführt mit mLimp-2_myc und mD12_HA oder mD12_ Δ TM_HA oder hGosr2_HA. Die Lysate wurden auf je ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und mit anti-HA oder anti-myc gefärbt.

Die Immunpräzipitation wurde mit dem anti-HA-Antikörper durchgeführt. Der Blot des Immunpräzipitates wurde für den mit IP beschrifteten Blot mit anti-HA und für den mit CoIP beschrifteten Blot mit anti-myc gefärbt. Die in allen Spuren der CoIP unterhalb der 25kDa-Marke vorhandenen Banden sind die Antikörperbanden.

4.2.4.1 Lokalisation des carboxyterminal mit myc-Tag versehenen Konstruktes von murinem D12

Zuerst wurde die Lokalisation von mD12-c_terminal_myc (mD12_ctm) in HeLa-Zellen überprüft. Hierfür wurden Zellen transfiziert und mit dem myc-Antikörper gefärbt. Eine Kofärbung wurde mit dem KDEL-Antikörper durchgeführt, der vor allem das ER, mit dem ERGIC-Antikörper, der das ER-Golgi-Intermediate-Compartment oder mit dem TGN-Antikörper, der das Trans-Golgi-Netzwerk färbt. mD12-c_terminal_myc wird mit Grün gekennzeichnet, mit Rot die jeweiligen Marker der Kompartimente. Kolokalisation zeigt sich durch gelbe Färbung. In Abb. 4.7 sieht man, dass mD12-c_terminal_myc vor allem mit dem KDEL-Antikörper kolokalisiert. Eine geringe Kolokalisation ist auch mit dem ERGIC-Antikörper sichtbar und keine Kolokalisation mit dem TGN-Antikörper. Daraus lässt sich schließen, dass sich mD12-c_terminal_myc, wie auch bereits beschrieben (Verrier et al. 2008), vor allem im ER und ERGIC befindet.

Das Anfügen des c-terminalen myc-Tags hat also keine sichtbaren Auswirkungen auf die Lokalisation des Konstrukts.

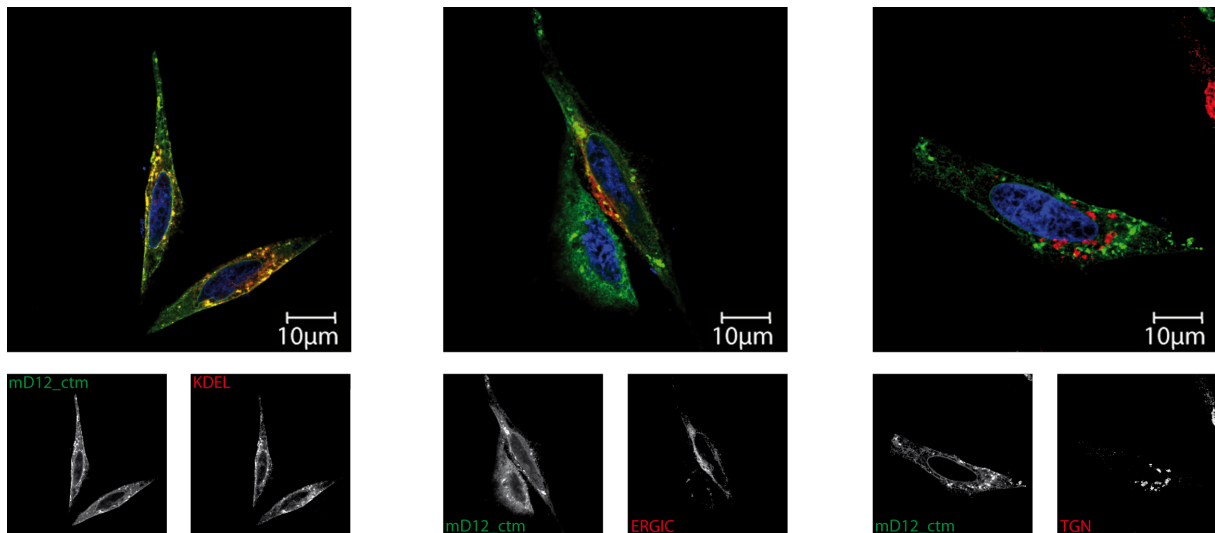


Abbildung 4.7: Immunfluoreszenz von mD12-c_terminal_myc: HeLa-Zellen wurden mit mD12-c_terminal_myc transfiziert. Anschließend wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit anti-myc und anti-KDEL oder anti-ERGIC oder anti-TGN durchgeführt.

4.2.4.2 Interaktion des carboxyterminal mit myc-Tag versehenen Konstruktes von D12 mit murinem Limp-2

Nun wurde eine Koimmunpräzipitation mit dem neu erstellten mD12-c_terminal_myc und einem mit einem HA-Tag versehenem Konstrukt von mLimp-2 durchgeführt. Transfiziert wurden in Einzeltransfektionen hGosr2_HA, tmem192_myc, mLimp-2_HA und mD12-c_terminal_myc. Tmem192_myc ist ebenfalls ein lysosomales Protein (Schröder et al. 2010; Behnke et al. 2011), das als Kontrolle eingesetzt wurde, um die Spezifität einer möglichen Interaktion zwischen mD12-c_terminal_myc und mLimp-2_HA zu erhöhen. Zusammen wurden nun mD12-c_terminal_myc und mLimp-2_HA, mD12-c_terminal_myc und hGosr2_HA und tmem192_myc und mLimp-2_HA transfiziert. In der Koimmunpräzipitation in Abb. 4.8 zeigt sich, dass bei Immunpräzipitation von mD12-c_terminal_myc auch mLimp-2_HA koimmunpräzipitiert wurde. Auch hGosr2_HA wird immunpräzipitiert. Keine Koimmunpräzipitation von mLimp-2_HA findet sich bei Immunpräzipitation von tmem192_myc, was für eine Spezifität der Koimmunpräzipitation von Limp-2 und D12 und Stringenz der experimentellen Bedingungen spricht.

Somit lässt sich also die postulierte Interaktion von mLimp-2 und mD12 auch von der anderen Seite, also durch Immunpräzipitation von mD12 her, zeigen. Auch Gosr2 und D12 scheinen zumindest in der Überexpression zu interagieren.

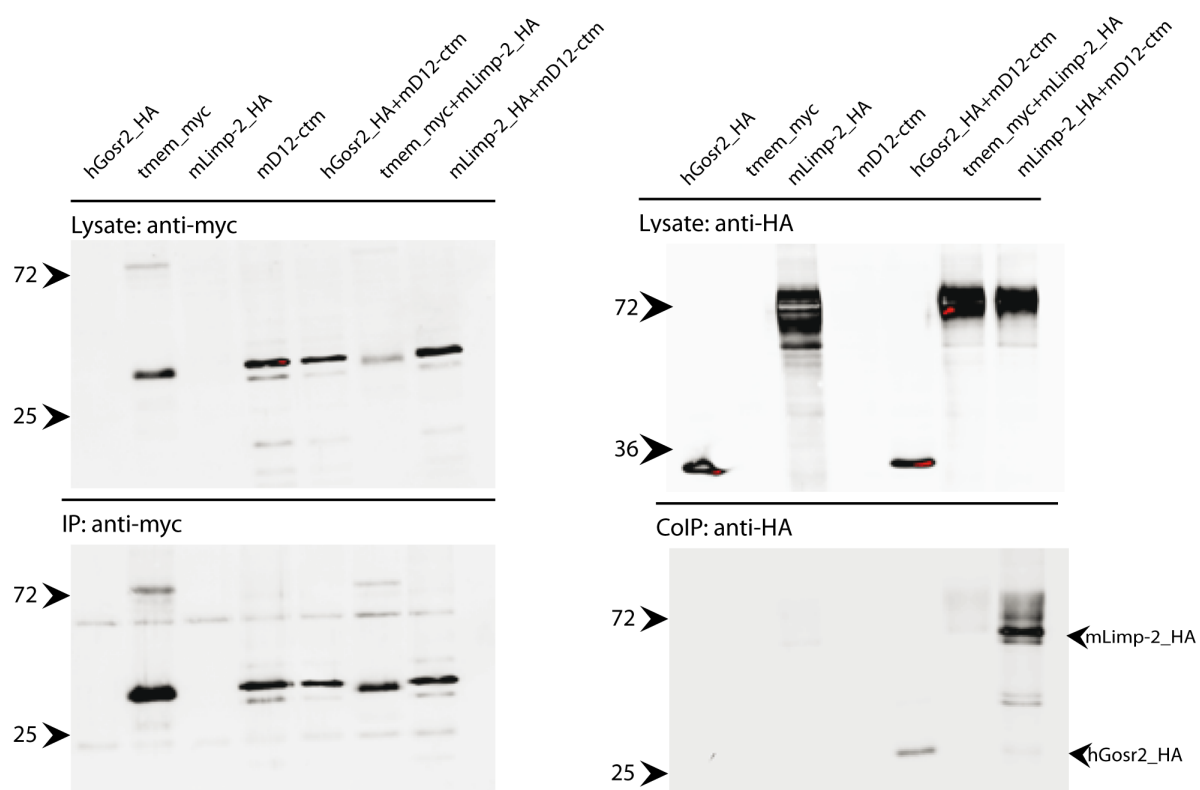


Abbildung 4.8: Immunpräzipitation von mD12-c_terminal_myc und mLim-2: Cos7-Zellen wurden mit hGosr2_HA, tmem192_myc, mLimp-2_HA und mD12-c_terminal_myc einzeltransfiziert. Doppeltransfektionen wurden durchgeführt mit hGosr2_HA und mD12-c_terminal_myc, mLimp-2_HA und tmem192_myc oder mD12-c_terminal_myc. Die Lysate wurden auf je ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und mit anti-HA oder anti-myc gefärbt.

Die Immunpräzipitation wurde mit dem anti-myc-Antikörper durchgeführt. Der Blot des Immunpräzipitates wurde für den mit IP beschrifteten Blot mit anti-myc und für den mit CoIP beschrifteten Blot mit anti-HA gefärbt.

4.2.5 Überprüfung der Validität des Immunpräzipitationssystems

Um die Validität des Immunpräzipitationssystems zu überprüfen, wurde versucht, die Interaktion des humanen D12, hier hUse1 genannt, mit dem humanen SNARE sec22b nachzuweisen. Diese Interaktion wurde bereits bei murinen Proteinen nachgewiesen (Verrier et al. 2008). Dazu wurden Einzeltransfektionen von hUse1_HA, humanem mit myc-Tag versehenem Limp-2, hLimp-2_myc, und mit myc-Tag markiertem humanem sec22b, hsec22b_myc, durchgeführt. Außerdem wurden die Zellen mit hUse1_HA und hLimp-2_myc und hUse1_HA und hsec22b_myc doppelt transfiziert. Hierbei zeigt sich in Abb. 4.9 die erwartete und mit murinen Proteinen beschriebene Interaktion von hsec22b_myc und hUse1_HA als Zeichen für die Validität des Immunpräzipitationssystems. Die erfolgreiche Immunpräzipitation von hsec22b_myc lässt sich allerdings nicht eindeutig darstellen, da das Protein auf der gleichen Höhe wie die untere der beiden Antikörperbanden verläuft. Das humane Limp-2 interagiert hier nicht mit dem humanen D12/hUse1. Dies könnte je-

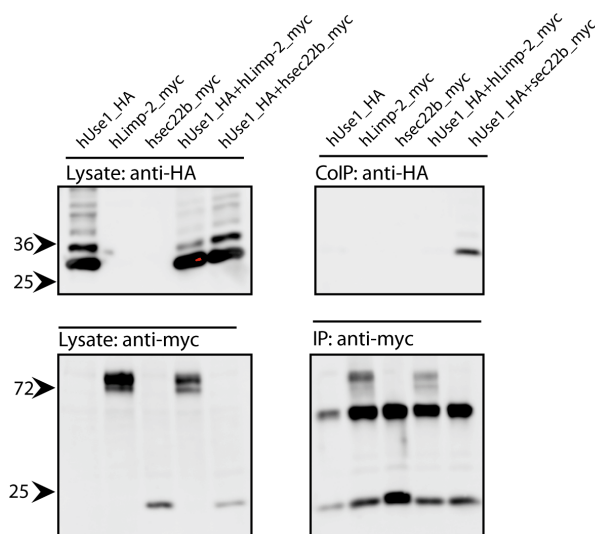


Abbildung 4.9: Überprüfung des Immunpräzipitationssystems: Cos7-Zellen wurden mit hUse1_HA, hLimp-2_myc und hsec22b_myc transfiziert. Außerdem wurden Doppeltransfektionen durchgeführt mit hUse1_HA und hLimp-2_myc oder hsec22b_myc. Die Lysate wurden auf je ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und mit anti-HA oder anti-myc gefärbt. Die Immunpräzipitation wurde mit dem anti-myc-Antikörper durchgeführt. Der Blot des Immunpräzipitates wurde für den mit IP beschrifteten Blot mit anti-myc und für den mit CoIP beschrifteten Blot mit anti-HA gefärbt. Die in allen Spuren der CoIP unterhalb der 25kDa-Marke und unterhalb der 72kDa vorhandenen Banden sind die Antikörperbanden.

doch an der geringen Expression und dementsprechend geringen Immunpräzipitation von hLimp-2_myc in der Doppeltransfektion liegen.

4.2.6 Interaktion von humanem D12 und murinem Limp-2 in der CoIP

Um die Spezifität der Interaktion zu überprüfen, wurden das murine Limp-2_myc und das murine D12_HA koexprimiert. Außerdem wurden das murine Limp-2_myc und das humane D12/hUse1_HA zusammen transfiziert. Wie in der Koimmunpräzipitation in Abb. 4.10 zu sehen ist, interagieren das murine Limp-2_myc und das murine D12_HA. Eine, wenn auch schwächere Interaktion zwischen dem murinen Limp-2_myc und dem humanen D12/hUSE1_HA lässt sich ebenfalls zeigen, die vielleicht aber auch eine unspezifische Bindung sein könnte.

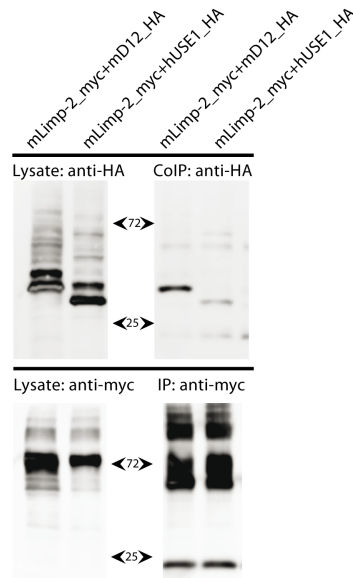


Abbildung 4.10: Speziesspezifität der Interaktion: Cos7-Zellen wurden mit mLimp-2_myc und mD12_HA oder hUse1_HA kotransfiziert. Die Lysate wurden auf je ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und mit anti-HA oder anti-myc gefärbt. Immunpräzipitation wurde mit dem anti-myc-Antikörper durchgeführt. Das Immunpräzipitat wurde für den mit IP beschrifteten Blot mit anti-myc und für den mit CoIP beschrifteten Blot mit anti-HA gefärbt. Die in allen Spuren der CoIP unterhalb der 25kDa-Marke und unterhalb der 72kDa vorhandenen Banden sind die Antikörperbanden.

4.3 Suche nach der Interaktionsstelle von Limp-2 und D12

Nach erfolgreichem Nachweis der Interaktion in der Überexpression in Säugerzellen wurde versucht, die Erkenntnisse bezüglich der möglichen Interaktionsstelle auf Seiten von mD12 weiter zu vertiefen. Aus den Hefe-Experimenten war bereits bekannt, dass sich der Interaktionsort höchstwahrscheinlich im n-terminalen Teil von mD12 befinden müsste, da in den durchgeführten Experimenten, wie oben beschrieben, mD12- Δ CT_HA und mD12-TM_E4_HA immer noch mit mLimp-2_myc wechselwirkten.

4.3.1 Testung verschiedener Mutanten von murinem D12 auf Interaktion mit murinem Limp-2 im Koimmunpräzipitationssystem

Um die Ergebnisse, die bezüglich der Interaktion von mLimp-2_myc mit den Konstrukten mD12- Δ CT_HA und mD12-TM_E4_HA gewonnen wurden, zu validieren, wurden wiederum Immunpräzipitationsexperimente in Cos7-Zellen durchgeführt, wie in Abb. 4.11 dargestellt. Dort wird ersichtlich, dass eine Interaktion der beiden Konstrukte mit mLimp-

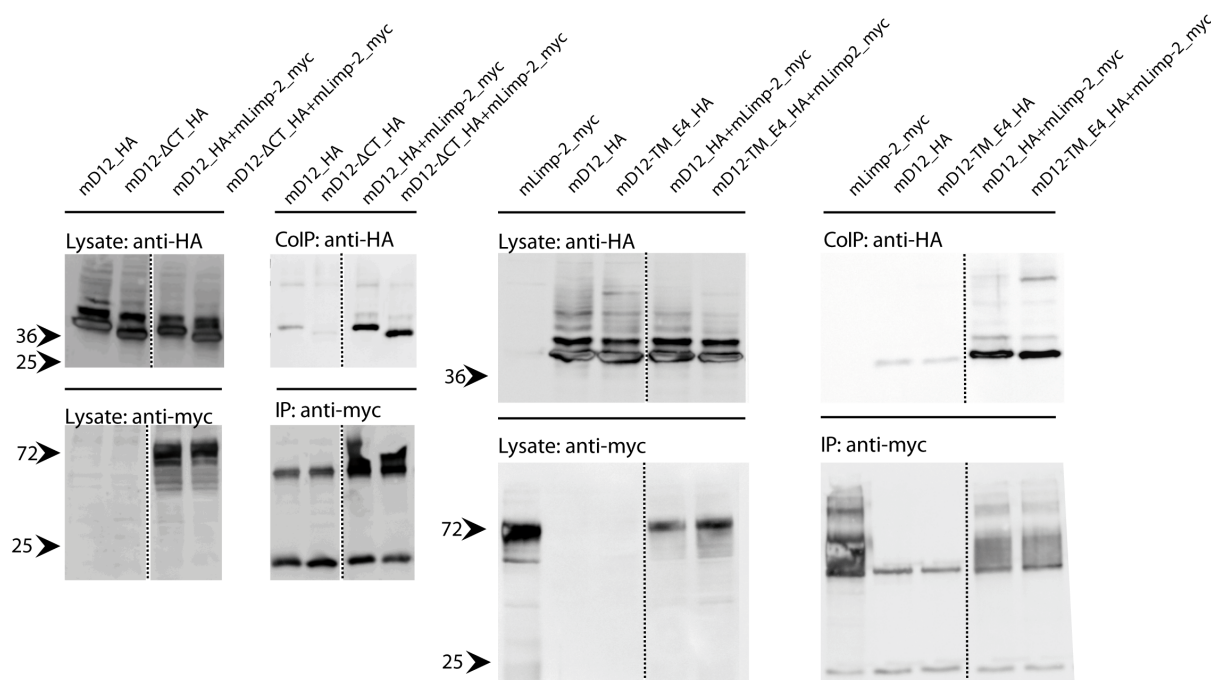


Abbildung 4.11: Immunpräzipitation der Konstrukte mD12- Δ CT_HA und mD12-TM_E4_HA mit mLim2-myc: Links: Cos7-Zellen wurden mit mD12_HA und mD12- Δ CT_HA transfiziert. Doppeltransfektionen wurden durchgeführt mit mLim2-myc und mD12_HA oder mD12- Δ CT_HA. Die Lysate wurden auf je ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und mit anti-HA oder anti-myc gefärbt. Immunpräzipitation wurde mit dem anti-myc-Antikörper durchgeführt. Das Immunpräzipitat wurde für den mit IP beschrifteten Blot mit anti-myc und für den mit CoIP beschrifteten Blot mit anti-HA gefärbt. Die in allen Spuren der IP unterhalb der 25kDa-Marke und unterhalb der 72kDa vorhandenen Banden sind die Antikörperbanden.

Rechts: Cos7-Zellen wurden mit mLim2-myc, mD12_HA und mD12-TM_E4_HA transfiziert. Doppeltransfektionen wurden durchgeführt mit mLim2-myc und mD12_HA oder mD12-TM_E4_HA. Die Lysate wurden auf je ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und mit anti-HA oder anti-myc gefärbt. Immunpräzipitation wurde mit dem anti-myc-Antikörper durchgeführt. Das Immunpräzipitat wurde für den mit IP beschrifteten Blot mit anti-myc und für den mit CoIP beschrifteten Blot mit anti-HA gefärbt. Die in allen Spuren der IP unterhalb der 25kDa-Marke und unterhalb der 72kDa vorhandenen Banden sind die Antikörperbanden.

2_myc stattfindet. Es ist jedoch auch immer eine schwache Bande in der Immunpräzipitation der Einzeltransfektion von mD12_HA, mD12- Δ CT_HA_HA und mD12-TM_E4_HA zu sehen. Dies ließe sich am ehesten als unspezifische Bindung dieser Proteine an die Protein-G-Beads interpretieren.

4.3.2 Konstruktion eines aminoterminal deletierten D12

In einer 2009 veröffentlichten Publikation (Aoki et al. 2009) unternahmen die Autoren den Versuch, neue Interaktionspartner von Use1/p31, dem humanen Gegenpart zu mD12, zu identifizieren. Hierzu führten sie eine Immunpräzipitation von großen Mengen des Proteins aus Hek293T-Zellen durch und konnten durch die Methode der Massenspektrometrie neue

mögliche Interaktionspartner ausfindig machen. Als eines der potentiellen Partner stellte sich das Protein NAG heraus, das später als Homolog des Tethering-Komplexes Sec39p der Hefe beschrieben wurde (Schmitt, 2010). Die Autoren konnten zeigen, dass die Interaktion von NAG mit p31/Use1 über die ersten zehn n-terminalen Aminosäuren von p31 vermittelt wird. Um zu untersuchen, ob dies auch der Ort möglicher Interaktion von mD12 mit mLimp-2 sein könnte, wurde per PCR ein Konstrukt von mD12 erstellt, bei dem die ersten 26 Aminosäuren des Proteins entfernt wurden. Zur Kontrolle wurde das Plasmid sequenziert.

4.3.2.1 Interaktion von aminoterminal deletierten D12 und Limp-2

Zur Überprüfung der Interaktion wurde wieder ein Immunpräzipitationsexperiment durchgeführt. Hierfür wurden mD12_HA und mD12- Δ N26_HA zuerst einzeln und dann zusammen mit mLimp-2_myc kotransfiziert. Danach wurde mit dem myc-Antikörper immunpräzipitiert. Bei der Auswertung von Abb. 4.12 zeigte sich zuerst in den anti-HA-gefärbten Lysaten, dass das neue Konstrukt gut exprimiert. In der Immunpräzipitation zeigt sich eine ausreichende Präzipitation von mLimp-2_myc, sodass die Auswertung der Koimmunpräzipitation als valide anzusehen ist.

Der Koimmunpräzipitationsblot lässt nun eine Kopräzipitation sowohl von mD12_HA als auch von mD12- Δ N26_HA erkennen. So kann sowohl die schon beschriebene Interaktion noch einmal bestätigt als auch neu gezeigt werden, dass die Interaktionsstelle sich im übrig gebliebenen N-Terminalen Teil von mD12 befinden muss.

4.3.3 Konstruktion einer D12 Mutante, der das ELLG-Motiv fehlt

Bei Analyse der weiteren möglichen Interaktionspartner von mLimp-2, welche der Hefescreen ergab, fiel ein anderes SNARE-Protein auf, das sich ebenfalls im Komplex bestehend aus Use1, Syntaxin18 und sec22b befindet, sec20b/Bnip1 (Nakajima et al. 2004; Verrier et al. 2008). Ein Alignment von mD12 und mBnip1 zeigte, dass es im n-terminalen, zytosolischen Teil beider SNAREs eine Region, bestehend aus den Aminosäuren ELL (Glutamat Lysin Lysin) gibt, die sowohl in mD12 als auch in mBnip1 zwischen Mensch, Maus und Drosophila konserviert ist. Zusätzlich wurde diese Region für Bnip1 als Bindungsort anti-apoptotischer Moleküle wie Bcl2 beschrieben (Zhang, Heim und Meyhack, 1999; Yasuda und Chinnadurai, 2000), scheint also Eigenschaften zu besitzen, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. Um zu überprüfen, ob diese Region für die postulierte Interaktion von mD12 und mLimp-2 wichtig sein könnte, wurde über eine Fusions-PCR eine Version von mD12 konstruiert, bei der dieses Motiv und das anschließende Glycin entfernt wurden: mD12- Δ ELLG_HA.

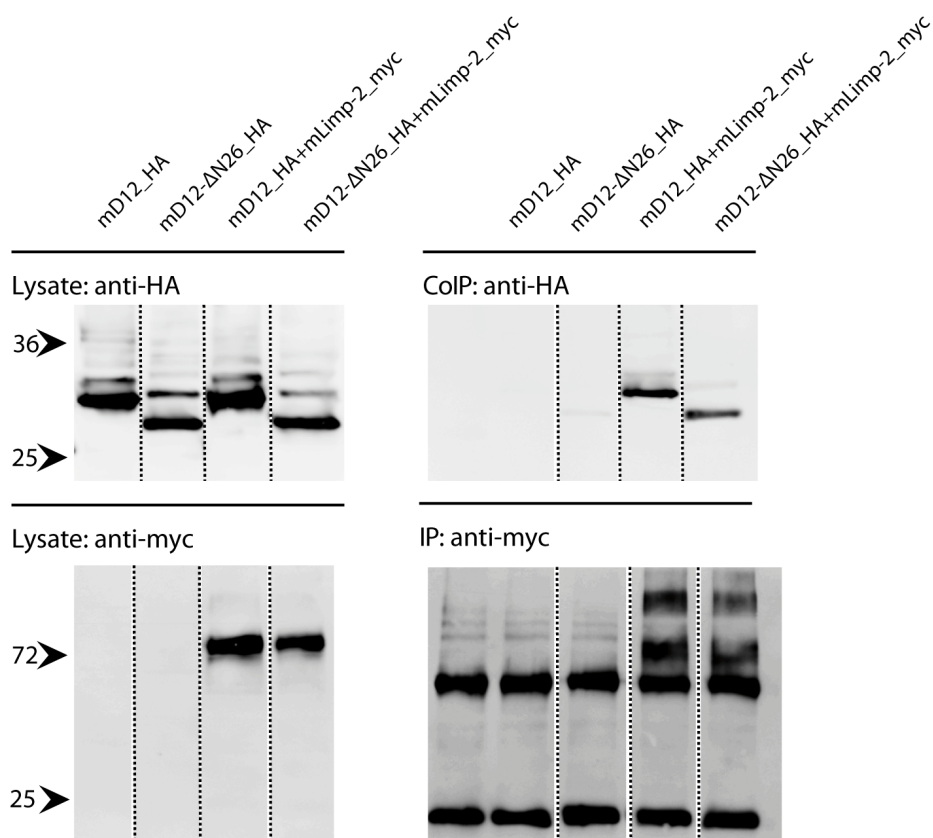


Abbildung 4.12: Koimmunpräzipitation von mD12- Δ N26_HA und mLimp-2_myc: Cos7-Zellen wurden mit mD12_HA und mD12- Δ N26_HA transfiziert. Doppeltransfektionen wurden durchgeführt mit mLimp-2_myc und mD12_HA oder mD12- Δ N26_HA. Die Lysate wurden auf je ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und mit anti-HA oder anti-myc gefärbt. Immunpräzipitation wurde mit dem anti-myc-Antikörper durchgeführt. Das Immunpräzipitat wurde für den mit IP beschrifteten Blot mit anti-myc und für den mit CoIP beschrifteten Blot mit anti-HA gefärbt. Die in allen Spuren der IP unterhalb der 25kDa-Marke und unterhalb der 72kDa vorhandenen Banden sind die Antikörperbanden.

4.3.3.1 Fehlende Interaktion der ELLG-Mutante von D12 und Limp-2

Um die Hypothese zu untersuchen, dass das ELLG-Motiv wichtig für die Interaktion ist, wurde eine Immunpräzipitation aus Hek-Zellen unternommen. Transfiziert wurden mD12_HA und mD12- Δ ELLG_HA einzeln. Außerdem mD12_HA und mD12- Δ ELLG_HA mit mLimp-2_myc. Die Immunpräzipitation von mLimp-2_myc in Abb. 4.13 ist in beiden Doppeltransfektionen vergleichbar hoch, vielleicht sogar etwas höher in der Transfektion mD12- Δ ELLG_HA. In der Koimmunpräzipitation zeigt sich eine starke Bande in der Doppeltransfektion mit mD12_HA. Eine sehr schwache Bande ist auch in der Doppeltransfektion mit mD12- Δ ELLG_HA zu sehen, die jedoch wahrscheinlich eine unspezifische Bindung darstellt.

So lässt sich die Aussage treffen, dass dieses Motiv eine wichtige Rolle bei der Interaktion

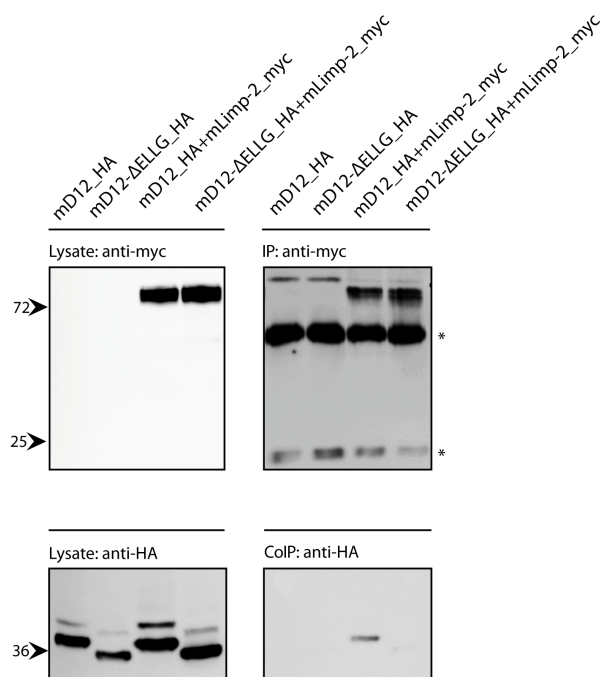


Abbildung 4.13: Koimmunpräzipitation von mD12- Δ ELLG_HA und mLimp-2_myc: Hek293T-Zellen wurden mit mD12_HA und mD12- Δ ELLG_HA transfiziert. Doppeltransfektionen wurden durchgeführt mit mLimp-2_myc und mD12_HA oder mD12- Δ ELLG_HA. Die Lysate wurden auf je ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und mit anti-HA oder anti-myc gefärbt. Die Immunpräzipitation wurde mit dem anti-myc-Antikörper durchgeführt. Der Blot des Immunpräzipitates wurde für den mit IP beschrifteten Blot mit anti-myc und für den mit CoIP beschrifteten Blot mit anti-HA gefärbt. Die in allen Spuren der IP unterhalb der 25kDa-Marke und unterhalb der 72kDa vorhandenen, mit * beschrifteten Banden, sind die Antikörperbanden.

zu spielen scheint, sei es, dass es die direkte Interaktion vermittelt oder die Bindungsstelle für ein weiteres Protein darstellt, welches entscheidend für die Interaktion ist. Weiter lässt sich sagen, dass die Interaktion sich auch in einer anderen Zelllinie nachweisen lässt.

4.3.3.2 Lokalisation der ELLG-Mutante von D12

Um auszuschließen, dass die verringerte oder verloren gegangene Interaktion von mD12- Δ ELLG mit mLimp-2 aus einer veränderten Lokalisation von mD12 resultiert, wurden Immunfluoreszenzen von mit mD12- Δ ELLG_HA und mLimp-2_myc transfizierten Cos7-Zellen angefertigt. Hier zeigt sich in Abb. 4.14 ein ähnliches Bild wie in Abb. 4.7, in dem größtenteils ER zur Darstellung kommt. Auch im Vergleich mit mD12 und mLimp-2 kotransfizierten Zellen in Abb. 4.15 lässt sich kein Unterschied feststellen, so dass die fehlende Interaktion von mD12- Δ ELLG_HA und mLimp-2_myc wohl nicht Folge einer unterschiedlichen Lokalisation von mD12 ist, sondern eher auf einen Einfluss des ELLG-Motivs auf die Wechselwirkung hinweist.

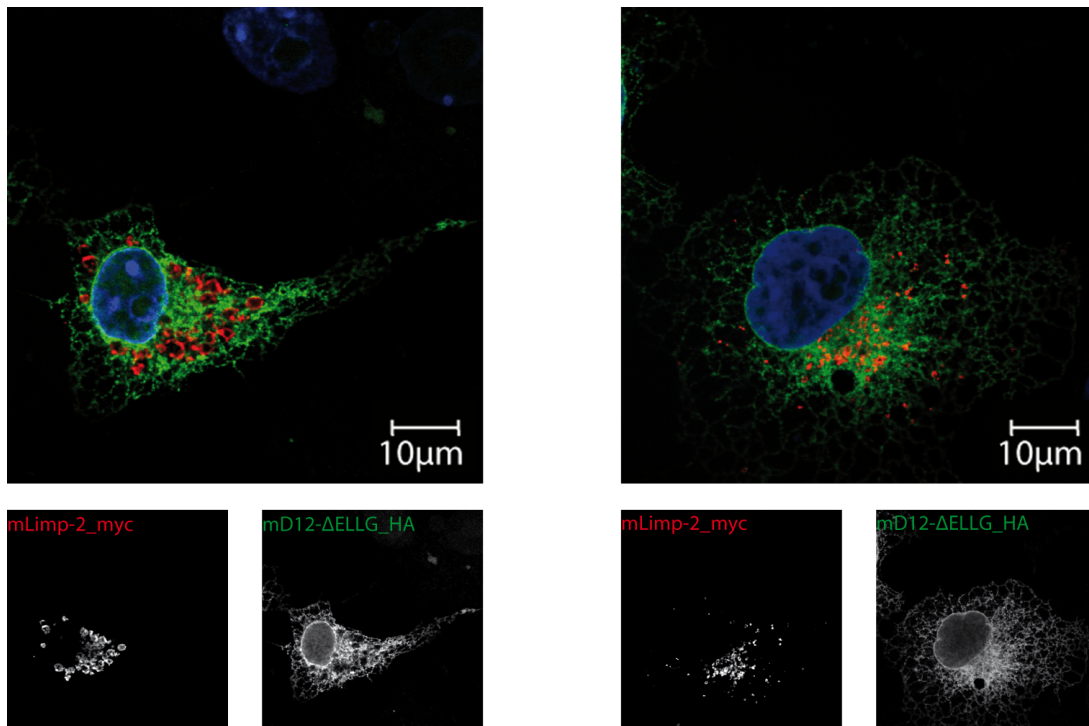


Abbildung 4.14: Immunfluoreszenz von mLimp-2_myc und mD12- Δ ELLG_HA: Cos7-Zellen wurden mit mLimp-2_myc und mD12- Δ ELLG_HA transfiziert und per Immunfluoreszenz mit anti-HA und anti-myc gefärbt.

4.4 Suche nach dem subzellulären Interaktionsort von Limp-2 und D12

4.4.1 Kolokalisation von Limp-2 und D12 im ER

Limp-2 wird im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Dort kommt es zur Bindung an die β -Glucocerebrosidase (Zachos et al. 2012; Reczek et al. 2007). Von dort werden in dieser Reihenfolge zuerst Cis-, dann Trans-Golgi-Netzwerk, passiert. Daraufhin führt der Weg weiter über das frühe und das späte Endosom in das Lysosom (Braulke und Bonifacio, 2009). D12 befindet sich vor allem im ER, jedoch finden sich Hinweise auf Interaktionen mit dem lysosomalen SNARE Vamp7 (Okumura et al. 2006). Außerdem führt seine Herunterregulation zur veränderten Maturation von lysosomalen Proteinen wie Cathepsin D.

Die nächste Frage, die beantwortet werden sollte, war, an welchem Ort sich die Interaktion hauptsächlich abspielt. Um dies zu beantworten, wurden Doppeltransfektionen von mLimp-2_myc und mD12_HA in HeLa-Zellen durchgeführt und in der Immunfluoreszenz analysiert. Wie in Abb. 4.15 zu sehen, findet sich eine weitgehend punktförmige Verteilung von mLimp-2 in Grün, die die Lysosomen darstellt. Bei mD12 sieht man ei-

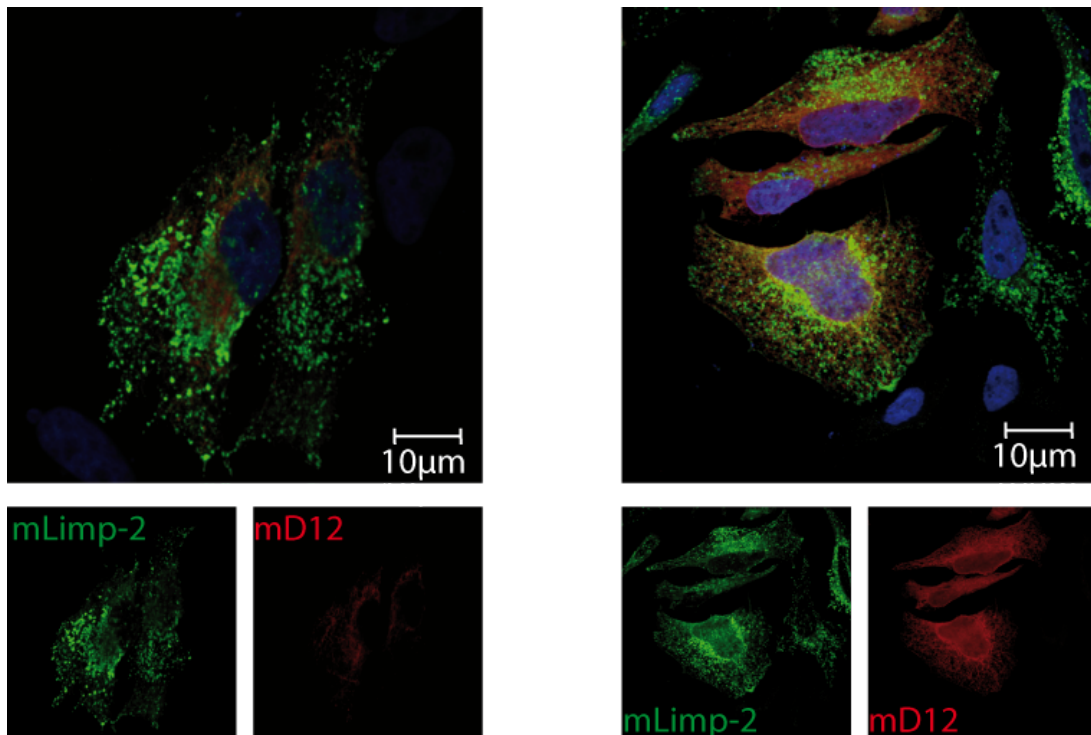


Abbildung 4.15: Immunfluoreszenz von mLimp-2_myc und mD12_HA: HeLa-Zellen wurden mit mLimp-2_myc und mD12_HA transfiziert. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit anti-myc und anti-HA-Antikörpern durchgeführt.

ne netzförmige, die Zelle durchmessende, an das endoplasmatische Retikulum erinnernde Verteilung in Rot, die zu der Lokalisation von mD12-c_terminal_myc passt. Ein geringes Maß an Kolokalisation in Gelb kann im ER gesehen werden, da sich immer ein kleiner Teil der Limp-2-Moleküle nach ihrer Produktion in den Ribosomen oder nach Recycling aus dem Lysosom befindet. Um den oben erhobenen Befund des endoplasmatischen Retikulums als möglicher Interaktionsort zu validieren, wurde ein Konstrukt von mLimp-2 mit mD12 kotransfiziert, das eine spezielle Sequenz enthält, welche es ihm nicht ermöglicht, das endoplasmatische Retikulum zu verlassen. In der Analyse dieser Zellen in Abb. 4.16 zeigte sich ein hohes Maß an Kolokalisation der ER-Retentionsmutante von mLimp-2 und mD12_HA.

4.4.2 Koimmunpräzipitation von D12 bei Immunpräzipitation der ER-Retentionsmutante von Limp-2

Die in der Immunfluoreszenz gewonnene Erkenntnis bezüglich des Interaktionsortes sollte nun in einem Immunpräzipitationsexperiment bestätigt werden. Hierfür sollte insbesondere eine mögliche Interaktion zwischen mD12_HA und der ER-Retentionsmutante von mLimp-2, mLimp-2-ER_Ret_myc, überprüft werden. Dafür wurden wieder Einzel-

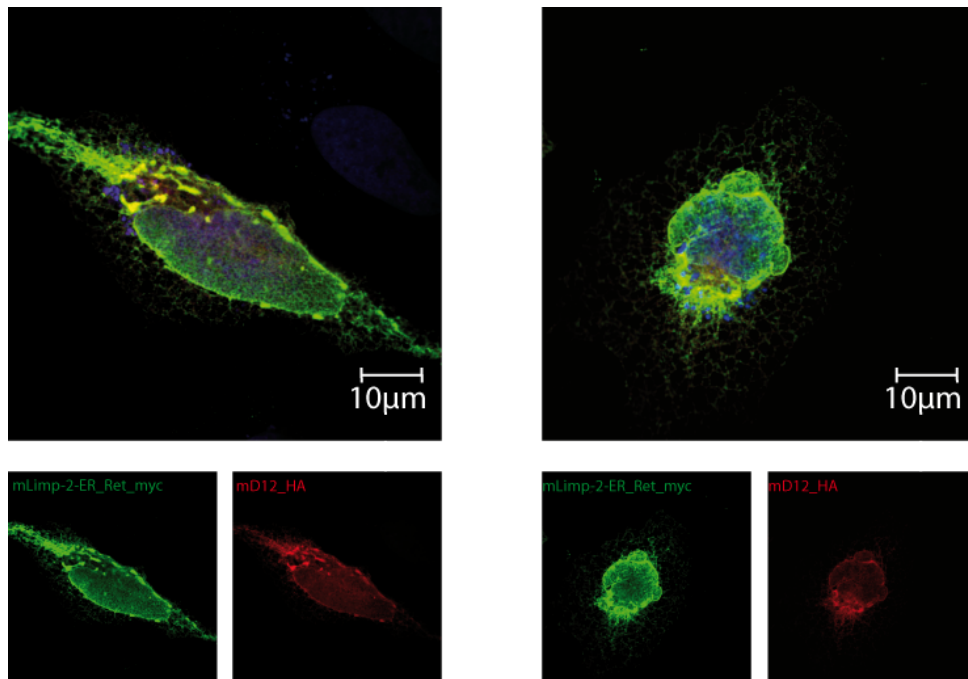


Abbildung 4.16: Immunfluoreszenz der ER-Retentionsmutante von mLimp-2 und mD12: HeLa-Zellen wurden mit der ER-Retentionsmutante von mLimp-2, mLimp-2-ER_Ret_myc und mD12_HA transfiziert. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit anti-myc und anti-HA-Antikörpern durchgeführt.

transfektionen mit mD12_HA und hGosr2_HA als Kontrolle durchgeführt. Zusammen transfiziert wurden mLimp-2_myc und mD12_HA, mLimp-2_myc und hGosr2_HA und mD12_HA und mLimp-2-ER_Ret_myc. In der Koimmunpräzipitation in Abb. 4.17 ergab sich wieder erneut Interaktion von hGosr2_HA und mLimp-2_myc. Wie nach den Ergebnissen der Immunfluoreszenz erwartet, interagiert mD12_HA sowohl mit der ER-Retentionsmutante schwach, als auch mit dem Wildtyp von mLimp-2, sodass die Aussage bezüglich des endoplasmatischen Retikulums als möglicher Interaktionsort gestützt werden konnte.

4.4.3 Konstruktion von Chimären aus D12 und Gosr2

Nachdem nun gezeigt wurde, dass sich das für die Interaktion zuständige Motiv im n-terminalen Teil von mD12 befindet, stellte sich die Frage, ob der n-terminale, zytosolische, oder der c-terminale Teil bestehend aus Transmembrandomäne und kurzem luminalen Ende für die Lokalisation von mD12 im endoplasmatischen Retikulum zuständig ist. Hierfür wurden zwei Chimären über eine Fusions-PCR aus hGosr2 und mD12 konstruiert, wobei die erste Chimäre aus dem n-terminalen, luminalen Teil von Gosr2 und der Transmembrandomäne und dem c-terminalen Ende von mD12 besteht. Die zweite Chimäre wurde umgekehrt aus dem n-terminalen Teil von mD12 und dem c-terminalen Ende und der

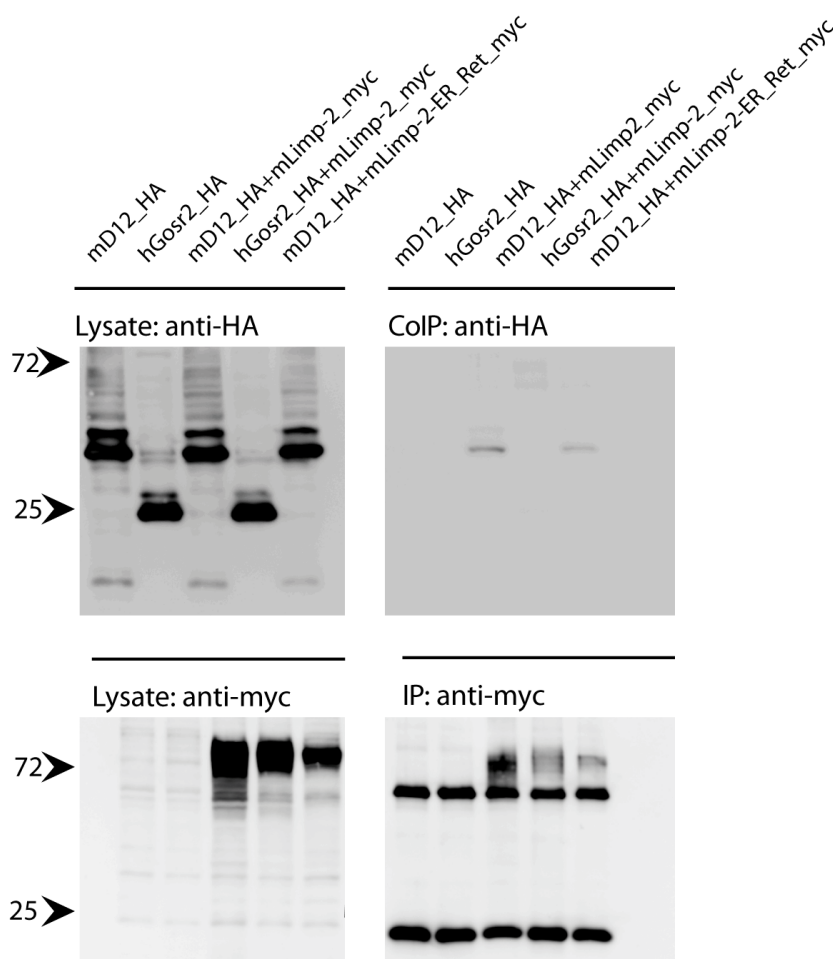


Abbildung 4.17: Immunpräzipitation von mD12 und der ER-Retentionsmutante von mLimp-2_myc: Cos7-Zellen wurden mit mD12_HA, hGosr2_HA einzeltransfiziert. Doppeltransfektionen wurden durchgeführt mit mD12_HA und mLimp-2_myc, hGosr2_HA und mLimp-2_myc und mD12_HA und der ER-Retentionsmutante von mLimp-2, mLimp-2-ER_Ret_myc. Die Lysate wurden auf je ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und mit anti-HA oder anti-myc gefärbt. Die Immunpräzipitation wurde mit dem anti-myc-Antikörper durchgeführt. Der Blot des Immunpräzipitates wurde für den mit IP beschrifteten Blot mit anti-myc und für den mit CoIP beschrifteten Blot mit anti-HA gefärbt.

Transmembrandomäne von hGosr2 erstellt.

4.4.3.1 Bedeutung des n-terminalen Teils von D12 für die Lokalisation im ER

Zur Analyse der Lokalisation wurde eine Immunfluoreszenz nach Koexpression von Chimera1_HA und mLimp-2_myc und Chimera2_HA und mLimp-2_myc in HeLa-Zellen angefertigt. Das Ergebnis ist in Abb. 4.18 zu sehen.

Es zeigt sich, dass sich die Verteilung der ersten Chimäre vor allem in vielen punktuellen Strukturen im Zytoplasma darstellt. Die Verteilung der zweiten Chimäre ähnelt einem

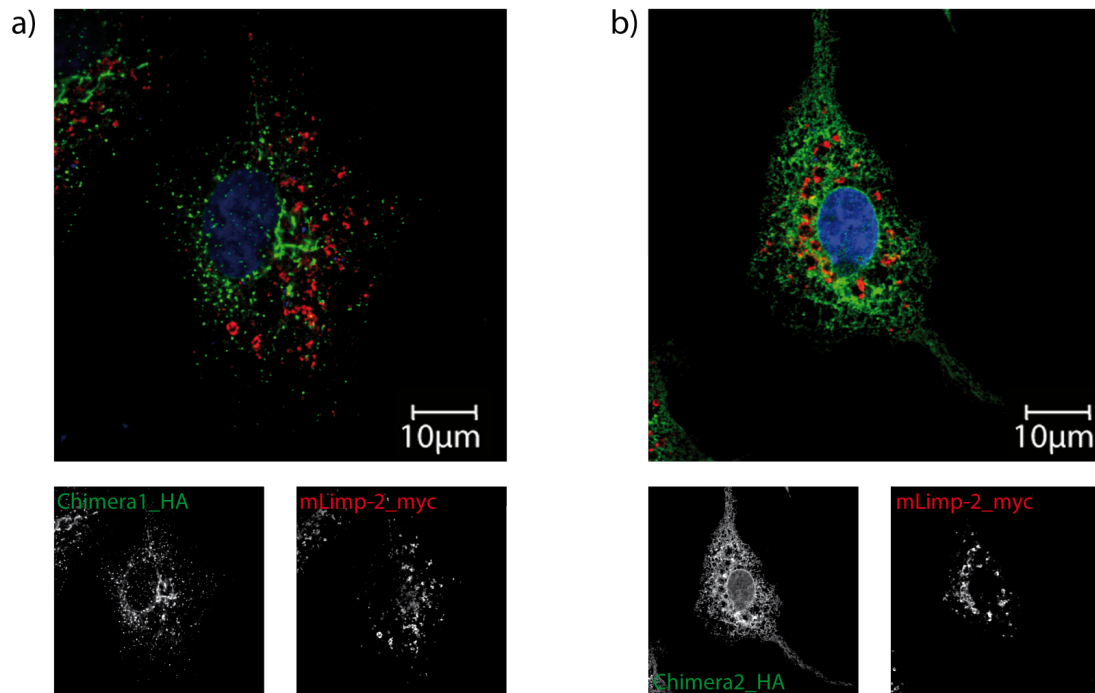


Abbildung 4.18: Analyse der Chimären aus Gosr2 und D12 per Immunfluoreszenz: a) HeLa-Zellen wurden mit Chimera1_HA und mLimp-2_myc kotransfiziert und für die Immunfluoreszenz aufbereitet. Gefärbt wurde mit den Anti-HA- und anti-myc-Antikörpern. b) HeLa-Zellen wurden mit Chimera2_HA und mLimp-2_myc kotransfiziert und in der Immunfluoreszenz analysiert. Gefärbt wurde mit anti-HA und anti-myc.

Netzwerk, das die Zelle ausfüllt, welches an das endoplasmatische Retikulum erinnert. Die Lokalisation der zweiten Chimäre ist derjenigen des unveränderten mD12 sehr ähnlich, so dass sich die Aussage treffen lässt, dass die Lokalisation von mD12 im ER über den n-terminalen Teil reguliert wird.

4.5 Bedeutung der Interaktion von D12 und Limp-2

Nachdem nun in den vorherigen Abschnitten auf mehreren Wegen die Interaktion von mLimp-2 und mD12 gezeigt wurde, sollte nun die Frage bearbeitet werden, inwiefern die beschriebene Zusammenwirkung beider Proteine eine physiologische Rolle in der Zelle spielen könnte.

4.5.1 Vergleich der Lokalisation von D12 in Limp-2-Wildtyp und Knockout-Fibroblasten

Da Limp-2 kürzlich, wie oben beschrieben, als Transporter für das Enzym β -Glucocerebrosidase in das Lysosom beschrieben worden war, bestand die erste Vermutung in Bezug auf die physiologische Rolle der Interaktion darin, dass die intrazelluläre Lokalisation von

mD12 von mLimp-2 abhängig sein könnte, da die Herunterregulation von mD12 nach (Okumura et al. 2006) die endo-lysosomale Reifung von Cathepsin D, einer lysosomalen Hydrolase beeinflusst. Um dies zu überprüfen, wurden Wildtyp- und Limp-2-Knockout-Fibroblasten mit mD12-c_terminal_myc transfiziert und in der Immunfluoreszenz analysiert. Im Vergleich zeigt sich jedoch in Abb. 4.19 keine unterschiedliche Färbung in den

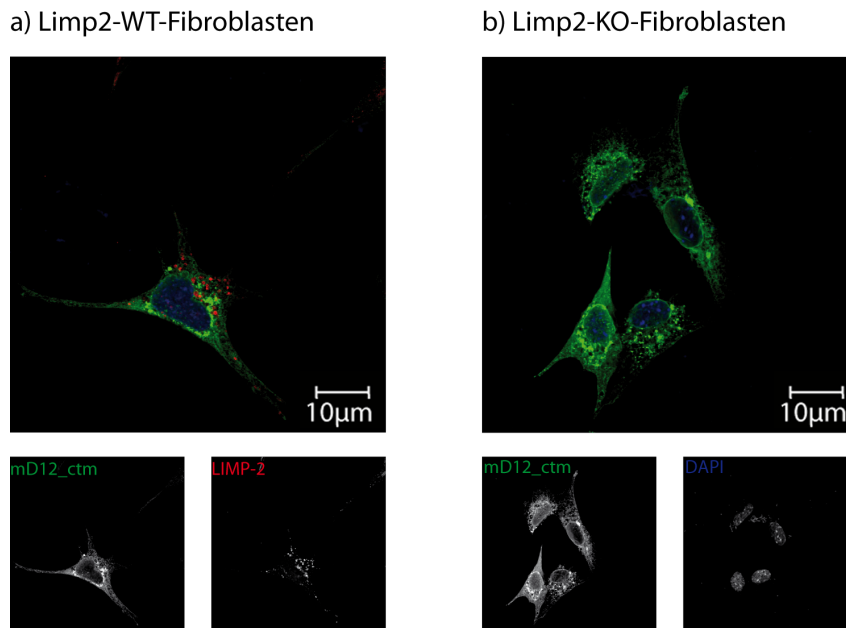


Abbildung 4.19: Untersuchung der Lokalisation von mD12-c_terminal_myc in Wildtyp- und Limp-2-Knockout-Fibroblasten: a) Limp-2-Wildtyp-Fibroblasten, gewonnen aus unveränderten Wildtyp-Mäusen, wurden mit mD12-c_terminal_myc transfiziert. Daraufhin wurde eine Immunfluoreszenz mit dem anti-myc und dem anti-Limp-2-Antikörper durchgeführt. b) Limp-2-Knockout-Fibroblasten, gewonnen aus Limp-2-Knockout-Mäusen, wurden mit mD12-c_terminal_myc transfiziert. Daraufhin wurde eine Immunfluoreszenz mit dem anti-myc-Antikörper durchgeführt. Blau dargestellt ist der Zellkern, der mit der DAPI-Färbung dargestellt wurde.

Wildtyp- oder Knockout-Zellen. Dies könnte jedoch auch damit zusammenhängen, dass möglicherweise das myc-Tag von mD12-c_terminal_myc nach Verlassen des endoplasmatischen Retikulums zum Beispiel in Lysosomen durch lysosomale Enzyme abgetrennt und somit keine Färbung möglich wird.

4.5.2 D12 in Limp-2-Knockout- und Wildtyp-Tritosomen

Um die Lokalisation in Bezug auf Lysosomen in der endogenen Situation noch genauer zu untersuchen, wurden sogenannte Tritosomen aus Limp-2-Wildtyp und Knockout-Mäusen präpariert. Dies sind Lysosomen aus Lebern von Mäusen, die mit Triton behandelt wurden und die sich über eine Dichtezentrifugation konzentrieren und danach analysieren lassen. Hier wurden je ein Knockout- und ein Wildtyp-Tier untersucht. Wie in Abb. 4.20 zu sehen

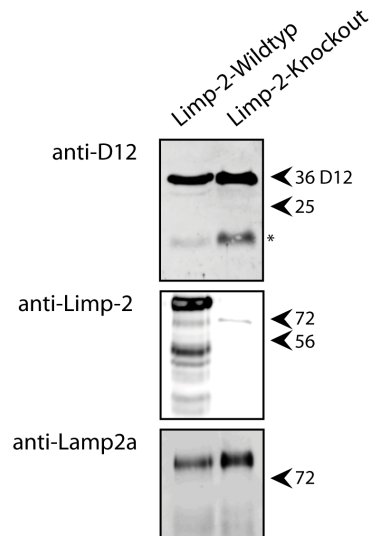


Abbildung 4.20: Tritosomenpräparation aus einer Limp-2-Wildtyp- und einer Limp-2-Knockout-Maus: Es wurden Färbungen mit dem anti-D12, dem anti-Limp-2 und dem anti-Lamp2a-Antikörper durchgeführt. Mit * ist ein mögliches Spaltfragment von mD12 bezeichnet.

ist, lässt sich D12 trotz in der Immunfluoreszenz überwiegender ER-Lokalisation auch lysosomal nachweisen. Dies könnte daran liegen, dass über die Tritosomenpräparation eine starke Aufkonzentration lysosomalen Proteins gelingt. Es scheinen kleine Mengenunterschiede zwischen dem Limp-2-Knockout und dem Wildtyp zu bestehen. Außerdem ist ein mögliches Fragment von mD12 gegenüber dem Wildtyp erhöht. Um zu überprüfen, ob sich die Unterschiede darauf zurückführen lassen, dass unterschiedliche Proteinmengen aufgetragen wurden, wurde derselbe Blot noch einmal mit einem Antikörper gegen das lysosomale Membranprotein Lamp2a gefärbt. Hier lässt sich sehen, dass im Falle des Knockouts auch mehr Protein aufgetragen wurde und der Mengenunterschied von D12 wohl daraus resultiert. Eine andere Interpretation wäre, dass Lamp2a im Limp-2-Knockout hochreguliert ist und der sichtbare Mengenunterschied im Limp-2-Knockout tatsächlich besteht.

4.5.3 Einfluss der Überexpression von D12 auf das Verhältnis von ER- zur post-ER-Form von Limp-2

Um zu überprüfen, ob die Überexpression von mD12 Auswirkung auf das Trafficking von mLimp-2 haben könnte, sollte betrachtet werden, inwieweit sich das Verhältnis der ER-Form von überexprimiertem mLimp-2 zur Post-ER-Form in An- und Abwesenheit von überexprimiertem mD12 darstellt. Hierfür wurde in HeLa-Zellen überexprimiertes mLimp-2 in An- und Abwesenheit von mD12-c_terminal_myc mit den Enzymen EndoH und PNGaseF behandelt. PNGaseF entfernt hierbei alle N-Glykosylierungen eines Pro-

teins, die posttranslational angefügt werden. Einem EndoH-Verdau sind N-glykosylierte Proteine nur bis zum Erreichen des Golgi-Apparates und weiterer Modifikation der Zucker zugänglich. Der Teil der in der Zelle vorhandenen Proteinmenge, der sich nach EndoH-Verdau auf Höhe der Bande des PNGaseF-Verdau befindet, ist noch EndoH-sensitiv und befindet sich im ER, der andere Teil ist in post-ER-Kompartimenten anzutreffen. Wie

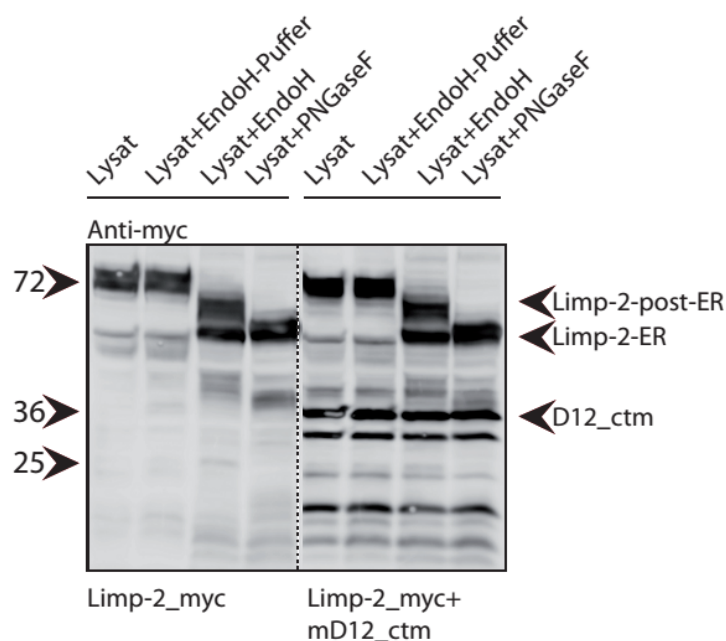


Abbildung 4.21: EndoH- und PNGaseF-Verdau in HeLa-Zellen: HeLa-Zellen wurden entweder mit mLimp-2_myc oder mit mLimp-2_myc und mD12-c_terminal_myc transfiziert. Anschließend wurden gleiche Mengen entweder mit EndoH oder PNGaseF über Nacht behandelt und auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Dann wurde mit anti-myc gefärbt.

auf dem Blot in Abb. 4.21 sichtbar, ist jedoch das Verhältnis des post-ER-Anteils zu dem ER-Anteil von mLimp-2 nicht wesentlich verändert, so dass die Überexpression von mD12 hier keinen Einfluss auf den Verbleib von mLimp-2 in post-ER-Kompartimenten der Zelle zu haben scheint.

4.5.4 Testung von siRNA gegen humanes D12 (hUse1)

Da die Überexpression von mD12 keinen Einfluss auf das Trafficking von mLimp-2 zeigte, sollte untersucht werden, ob die Herunterregulation von D12 in humanen Zellen, Use1 genannt, einen Einfluss haben könnte. Hierfür mussten zuerst sowohl der anti-Use1-Antikörper als auch die siRNA getestet werden. Es wurden HeLa-Zellen unbehandelt gelassen oder mit Kontroll-siRNA transfiziert. Außerdem wurden drei verschiedene siRNAs verwendet, wobei jede einzeln sowie ein Mix aus dreien transfiziert wurde. Nach vier Tagen wurden die Zellen geerntet und Lysate erstellt. Um die Spezifität des Antikörpers zu testen, wurden außerdem Zellen mit dem humanen mit HA-Tag versehenen

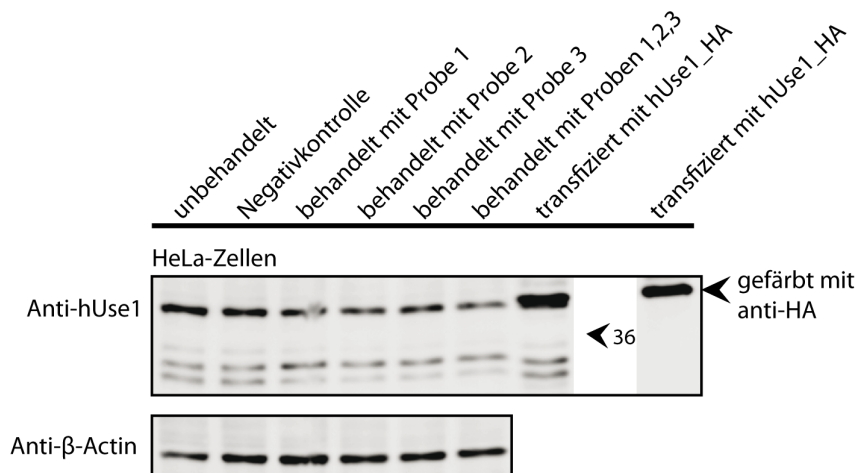


Abbildung 4.22: hUse1-siRNA Test: HeLa Zellen wurden für vier Tage mit entweder mit den einzelnen siRNA-Samples oder einem Mix aus den drei siRNA-Samples transfiziert. Eine weitere Transfektion wurde mit der Kontroll siRNA durchgeführt. Zur Kontrolle der Spezifität des Antikörpers wurden weitere Zellen mit Use1_HA transfiziert. Lysate wurden auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Gefärbt wurde mit dem anti-Use1-Antikörper oder dem anti-HA-Antikörper. Zusätzlich wurde eine Färbung mit dem Aktin-Antikörper vorgenommen, um sicherzustellen, dass gleiche Mengen Proteins aufgetragen worden sind.

D12-Konstrukt Use1_HA transfiziert.

In der Analyse des mit dem anti-Use1 gefärbten Blots in Abb. 4.22 ergibt sich, dass die Transfektion mit dem Mix aus den drei siRNAs am erfolgreichsten ist, da hier die stärkste Verminderung der Bande auf Höhe des transfizierten Konstrukts zu sehen ist. Außerdem erkennt der Antikörper sowohl das transfizierte Konstrukt als auch das endogen vorhandene Protein auf Höhe der vorhergesagten Masse von ungefähr 30kDa, was ein Beweis für die Spezifität ist. Generell lässt sich jedoch sagen, dass die Herunterregulation nicht stark ist, unter anderem sicherlich, weil SNARE-Proteine sehr langlebig sind und sich die siRNA nur auf neu synthetisierte Proteine auswirkt.

4.5.4.1 Einfluss der Herunterregulation von Use1 auf das Verlassen des ER von Limp-2

Nach Testung der siRNA und des Antikörpers sollte untersucht werden, ob die Herunterregulation von Use1 einen Einfluss auf das Verlassen des ER von Limp-2 haben könnte. Hierfür wurden HeLa-Zellen mit Use1-siRNA oder Kontroll-siRNA behandelt und anschließend ein Endoglycosidase H- oder Peptid-N-Glycosidase F-Verdau durchgeführt. Im mit anti-Use1 gefärbten Blot in Abb. 4.23 zeigt sich, dass die Herunterregulation funktioniert hat. Es kann jedoch keine veränderte Verteilung von Limp-2 auf ER- und post-ER-Kompartimente beobachtet werden. Dies mag auch daran liegen, dass die Halbwertszeit von Limp-2 im Vergleich zu anderen Proteinen sehr hoch ist.

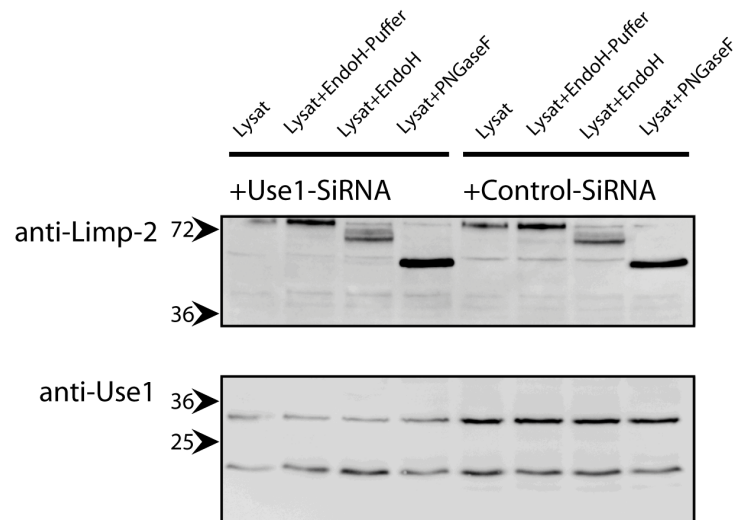


Abbildung 4.23: EndoH- und PNGaseF-Verdau in HeLa-Zellen nach Use1-siRNA-Behandlung: HeLa-Zellen wurden entweder mit Use1-siRNA oder Kontroll-siRNA behandelt. Nach Ernte der Zellen wurde ein EndoH- oder PNGaseF-Verdau der Lysate durchgeführt und auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Anschließend wurden mit anti-Use1- oder anti-Limp-2-Antikörpern gefärbt.

4.5.5 Einfluss von Limp-2 auf D12- und Gosr2-Oberflächenexpression

Limp-2 ist vor kurzem als Rezeptor für den Enterovirus EV71 beschrieben worden, der für die Hand-Fuß-Mundkrankheit verantwortlich ist (Yamayoshi et al. 2009). Außerdem sind Limp-2-Knockout-Makrophagen anfälliger für eine intrazelluläre Listerieninfektion als Limp-2-Wildtyp-Makrophagen (Carrasco-Marin et al. 2011). Auch für eigentlich ER-residente SNAREs wie Syntaxin18 gibt es Evidenzen, dass sie bei Phagozytoseprozessen an der Zelloberfläche beteiligt sind (Hatsuzawa et al. 2006).

Aus diesen Beobachtungen resultierte die Überlegung, dass die Oberflächenlokalisierung von Limp-2 vielleicht abhängig sein könnte von mD12/Use1. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde eine Oberflächenbiotinylierung in N2A-Zellen durchgeführt, die aufgrund ihrer runden Form ein besonders gutes Oberfläche-zu-Zytosol-Verhältnis haben. Hierbei werden alle sich an der Zelloberfläche der Zelle befindenden Proteine über Lysine oder n-terminale NH₃-Endigungen an Biotin gebunden. Dieses Biotin kann nun mit Hilfe von Streptavidin-Beads gebunden werden. So erhält man über den Streptavidin-Pulldown die an der Oberfläche einer Zelle vorkommenden Proteine. Die Biotinylierung wurde in N2A-Zellen durchgeführt, die mit mLimp-2_myc allein, mD12_HA und EGFP, hGosr2_HA und EGFP, mD12_HA und mLimp-2_myc und hGosr2_HA und mLimp-2_myc transfiziert worden waren.

In den mit anti-myc und anti-HA gefärbten Lysaten in Abb. 4.24 konnten die Produkte der transfizierten Plasmide nachgewiesen werden. Der mit anti-GAPDH gefärbte Blot

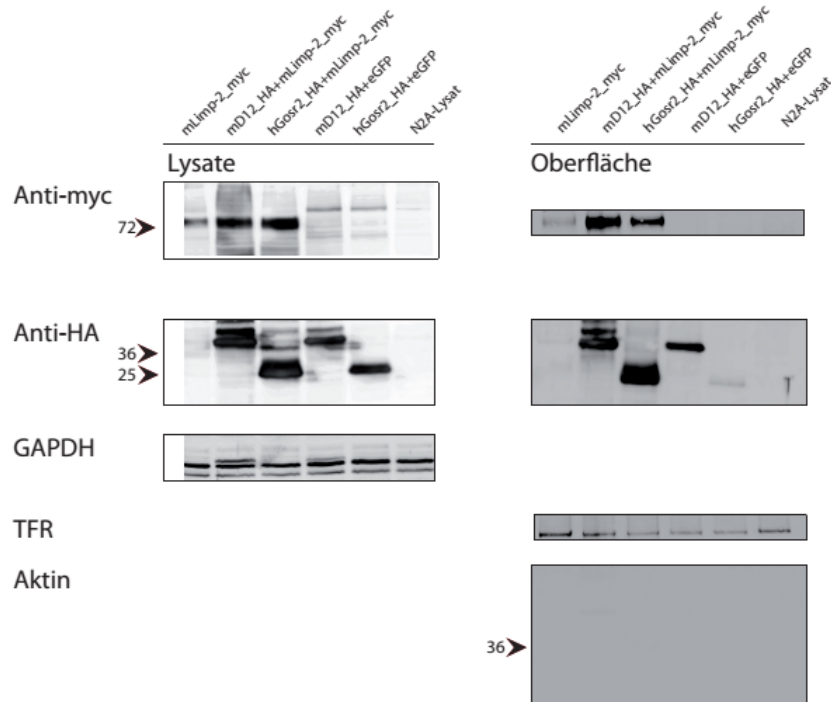


Abbildung 4.24: Oberflächenbiotinylierung in N2A-Zellen: N2A-Zellen wurden mit mLim-p-2_myc, mD12_HA und EGFP, hGosr2 und EGFP, mD12_HA und mLim-p-2_myc und hGosr2_HA und mLim-p-2_myc transfiziert. Außerdem wurden N2A-Zellen nicht behandelt um unspezifische Antikörperbindungen darzustellen. Danach wurden die Zellen mit Biotin behandelt und eine Präzipitation mit Streptavidin-Beads durchgeführt. Oberflächenfraktion und Lysat wurden auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und mit anti-myc, anti-HA, GAPDH, Transferrin-Rezeptor-Antikörper und Aktin gefärbt.

zeigt, dass die gleiche Lysatproteinmenge aufgetragen wurde.

Zur Kontrolle der Präzipitation der Oberflächenfraktion wurde eine Färbung mit dem Transferrin-Rezeptor-Antikörper durchgeführt. Auf der Oberfläche nimmt die Menge an mLim-p-2_myc sowohl bei Kotransfektion mit mD12_HA als auch mit hGosr2_HA zu, so dass ein spezifischer, auf der beschriebenen Interaktion beruhender Effekt unwahrscheinlich ist, da vorher gezeigt wurde, dass hGosr2_HA und mLim-p-2_myc nicht direkt miteinander interagieren. Es zeigt sich auch, dass mD12_HA bei Einzeltransfektion an der Oberfläche zu finden ist. Auch die Menge an mLim-p-2, das sich an der Oberfläche befindet, nimmt zu, etwas stärker in der Kotransfektion mit mD12_HA als bei Kotransfektion mit hGosr2_HA. Zuletzt lässt sich ein starker Effekt der Kotransfektion von mLim-p-2_myc und hGosr2_HA auf die Oberflächenlokalisierung von hGosr2_HA nachweisen, welches in der Doppeltransfektion mit der Kontrolle EGFP nur sehr schwach an der Oberfläche detektierbar ist. Allerdings muss auch gesagt werden, dass, wie in der Lysatkontrolle sichtbar ist, die Gesamtmenge transfizierten hGosr2_HAs in der Kotransfektion mit mLim-p-2_myc höher ist. Dies könnte an einer höheren Transfektionsrate oder auch an einer veränderten Abbaurrate liegen.

Dass gleiche Mengen Oberflächenprotein analysiert wurden, zeigt die Färbung mit dem Transferrin-Rezeptor-Antikörper. Eine zusätzliche Aktinfärbung der Oberflächenfraktion wurde durchgeführt, um Verunreinigungen der Fraktion durch Zytosol auszuschließen, da Aktin normalerweise nicht an der Zelloberfläche zu finden ist.

4.5.5.1 Validierung des Einflusses von Limp-2 auf die Gosr2 Oberflächenexpression

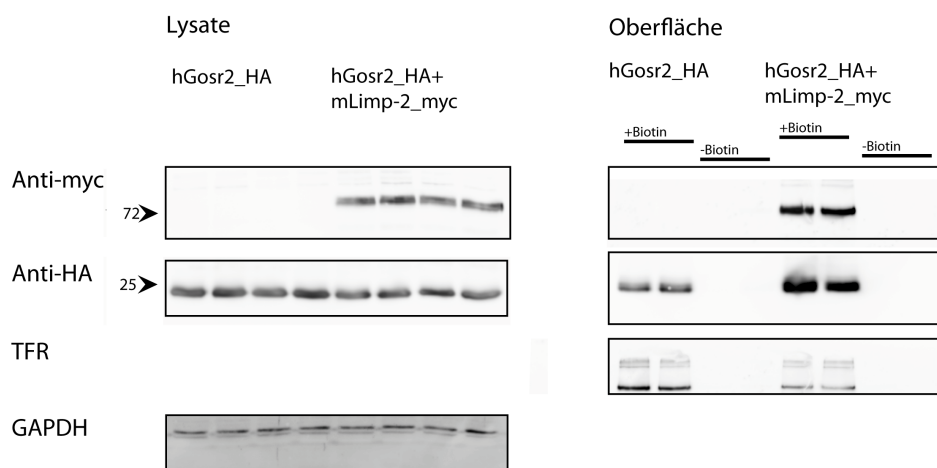


Abbildung 4.25: Oberflächenbiotinylierung in N2A-Zellen: N2A-Zellen wurden mit je viermal hGosr2_HA oder hGosr2_HA und mLimp-2_myc transfiziert. Danach wurden je zwei der Schalen mit Biotin behandelt und eine Präzipitation mit Streptavidin-Beads durchgeführt. Oberflächenfraktion und Lysat wurden auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und mit anti-myc, anti-HA, GAPDH und Transferrin-Rezeptor-Antikörper gefärbt.

Die im vorherigen Experiment gewonnenen Erkenntnisse sollten noch einmal in An- und Abwesenheit von Biotin überprüft werden. Außerdem ist eine mögliche, auch indirekte, Interaktion von hGosr2 und Limp-2 interessant, da bestimmte Mutationen von hGosr2 zu einem ähnlichen Phänotyp wie AMRF-Mutationen von Limp-2 führen, so dass trotz fehlender direkter Wechselwirkung ein Zusammenhang zwischen beiden Proteinen angenommen werden konnte (Corbett et al. 2011). Es wurde erneut eine Oberflächenbiotinylierung durchgeführt. Transfiziert wurden wegen der besseren Vergleichbarkeit je viermal hGosr2_HA allein und je viermal hGosr2_HA und mLimp-2_myc zusammen. Daraufhin wurden je zwei Chargen mit Biotin behandelt und zwei Chargen unbehandelt gelassen. Die Blots der Lysate in Abb. 4.25 zeigen gleiche Proteinmengen. Der mit anti-GAPDH gefärbte Blot unterstützt dies, da mit seiner Hilfe nachgewiesen werden kann, dass gleiche Mengen Proteins aufgetragen wurden.

Auf der Oberfläche sieht man, dass die Menge an hGosr2_HA tatsächlich bei Kotransfektion mit mLimp-2_myc zunimmt. Die nicht mit Biotin behandelten Zellen zeigen kein

Signal. Damit zeigt sich, dass es nicht zu einer unspezifischen Bindung der transfizierten Proteine an die Streptavidin-Beads gekommen ist.

4.5.5.2 Untersuchung in Limp-2-Wildtyp vs Knockout-Fibroblasten

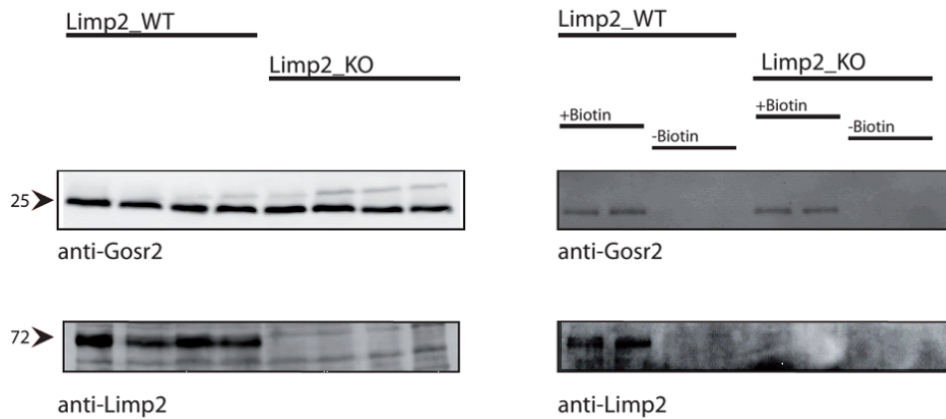


Abbildung 4.26: Oberflächenbiotinylierung in Limp-2-Wildtyp- und Knockout-Fibroblasten: Limp-2-Knockout- und Wildtypfibroblasten wurden mit Biotin behandelt. Anschließend wurde ein Streptavidin-Pulldown durchgeführt. Lysat und Oberflächenfraktion wurden auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Anschließend wurde mit anti-Gosr2 und anti-Limp-2 gefärbt.

Die obigen Versuche haben durch die Überexpression ein teilweise stark verändertes Zellsystem zur Grundlage. Daher sollte nun untersucht werden, ob sich vergleichbare Ergebnisse auch in der endogenen, unveränderten Situation in der Zelle finden.

Zu diesem Zweck wurde eine Oberflächenbiotinylierung in Limp-2-Wildtyp- und Knockout-Fibroblasten durchgeführt und die Oberflächen- und Lysatfraktionen mit anti-Limp-2- und anti-Gosr2-Antikörpern gefärbt. Hierbei zeigt sich, wie in Abb. 4.26 zu sehen, einerseits, dass sowohl Limp-2 als auch Gosr2 in der endogenen Situation auf der Oberfläche der Zelle vorhanden sind. Allerdings findet sich bei Gosr2 kein offensichtlicher Unterschied in der Oberflächenfraktion zwischen den Limp-2-Wildtyp- und Knockout-Zellen, so dass zumindest in dieser Zelllinie kein Einfluss von Limp-2 auf die Oberflächenlokalisierung von Gosr2 sichtbar ist. Allerdings ist auch die Gesamtmenge präzipitierten Proteins sehr gering, so dass mögliche Unterschiede eventuell nicht detektierbar sind.

4.5.6 Kolokalisation von Limp-2 und D12 in durch Limp-2-Überexpression entstandenen Vesikeln

Bei Überexpression von murinem Limp-2 in verschiedenen Zelllinien kommt es nach ungefähr 36 Stunden zur Bildung großer, auch lichtmikroskopisch sichtbarer Vesikel, die aus

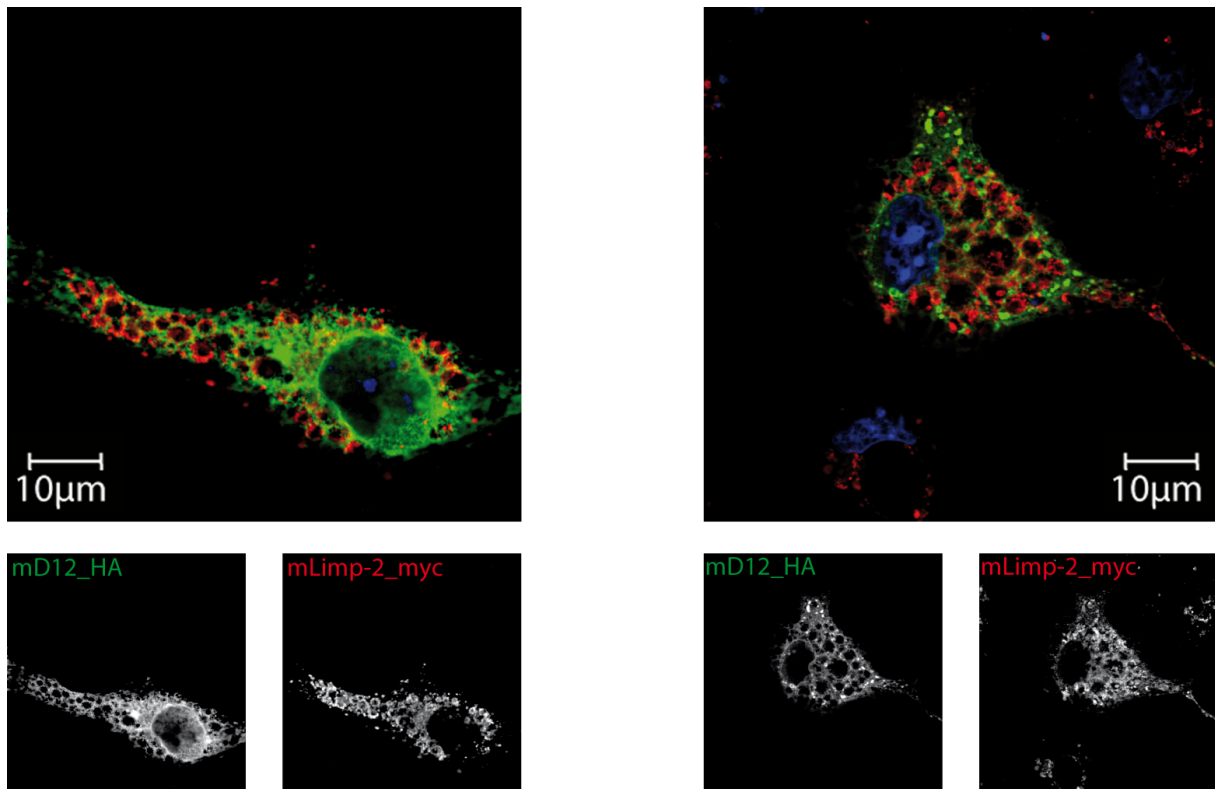


Abbildung 4.27: Kolokalisation von mD12 und mLimp-2 in den großen Vesikeln, die bei Überexpression von mLimp-2 in Cos7-Zellen entstehen: Cos7-Zellen wurden mit mLimp-2_myc und mD12_HA kotransfiziert und nach 36h und dem lichtmikroskopisch beobachteten Auftreten vergrößerter vesikulärer Strukturen mit PFA behandelt. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit anti-myc und anti-HA-Antikörpern durchgeführt.

Material aus frühen und späten Endosomen und Lysosomen zusammengesetzt sind (Kuronita, 2002). Eine weitere Vermutung war, dass die beobachtete Interaktion hierfür entscheidend sein könnte. Um diese Hypothese genauer zu untersuchen, wurden mLimp-2_myc und mD12_HA für 36h in Cos7-Zellen überexprimiert. Die Analyse der Immunfluoreszenz zeigt eine Kolokalisation von mLimp-2_myc und mD12_HA in diesen Vesikeln wie in Abb. 4.27 dargestellt. Dies weist auf eine funktionelle Rolle der Interaktion für diesen Prozess hin.

Kapitel 5

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuer Interaktionspartner des lysosomalen integralen Membranproteins Limp-2 identifiziert, validiert und charakterisiert.

Ein wichtiger Schritt zur Aufklärung der möglichen Rollen von Limp-2 in der Zelle war die Beschreibung des Proteins als Transporter für das lysosomale Enzym β -Glucocerebrosidase, dessen Aufgabe der Abbau von Glycosylceramid ist. Die β -Glucocerebrosidase kann also unabhängig vom Mannose-6-Phosphat-Rezeptor transportiert werden (Reczek et al. 2007), was unüblich für die meisten lysosomalen Hydrolasen ist. Mutationen in der β -Glucocerebrosidase, die entweder die Aktivität oder den Transport des Enzyms betreffen, führen zur häufigsten lysosomalen Speichererkrankung, Morbus Gaucher (Beutler, Demina und Gelbart, 1994).

5.1 *Yeast-Two-Hybrid-System*

Um neue Interaktionspartner zu finden, wurde ein *Split-Ubiquitin-Yeast-Two-Hybrid-Screen* mit dem murinen Limp-2 und einer murinen cerebralen cDNA-Bibliothek durchgeführt. Der Ansatz, das *split-ubiquitin*-System zu verwenden, ermöglicht es auch, putative Interaktionspartner, die eine Membranverankerung besitzen, zu identifizieren. Außerdem werden im Gegensatz zum herkömmlichen *Yeast-Two-Hybrid-System* ebenfalls Interaktionen detektiert, die außerhalb des Zellkerns vorkommen. Ein weiterer Vorteil des Systems ist seine starke Sensitivität, die es erlaubt, auch sehr schwache Interaktionen nachzuweisen (Thaminy, Miller und Stagljar, 2004).

Ein ebenfalls in diesem Screen gefundenes Protein, der (Pro-) Reninrezeptor, war in einer anderen Arbeit schon untersucht worden (Oelbe, 2012; Schmid et al. 2013).

Es gibt verschiedene Hinweise darauf, dass Limp-2 eine Rolle bei endosomal-lysosomalen und endosomal-endosomal Reifungs- und Fusionsprozessen spielt (Kuronita, 2002). Hier

sind unter anderem SNARE-Proteine von besonderer Bedeutung, da nur durch sie eine spezifische Vereinigung von Vesikeln mit anderen Vesikeln oder Zielmembranen möglich ist. Aus diesen Gründen wurde das identifizierte SNARE D12/Use1 als zu untersuchender Interaktionspartner gewählt.

In dem gleichen Screen fand sich ein weiteres SNARE, BNIP1/Sec20, das sich in einem SNARE-Komplex mit D12/Use1 im ER der Zelle befindet (Nakajima et al. 2004). Die bisher publizierten Ergebnisse zu D12/Use1 legen nahe, dass das hauptsächlich im ER residente Protein für die Fusion COPI-haltiger Vesikel, die aus dem Golgi-Apparat kommen, mit der ER-Membran zuständig ist (Verrier et al. 2008). Dies wird dadurch ermöglicht, dass D12 direkt mit dem Tethering-Faktor NAG interagiert (Aoki et al. 2009), der im Zusammenspiel mit ZW10 und RINT-1 COPI-haltige Vesikel einfängt und dadurch der ER-Membran näher bringt. Dies wird weiterhin dadurch unterstützt und erweitert, dass es bei einem totalen Knock-Out von D12 in Zellen zur Degeneration des ERs bis hin zur Bildung von großen blasenartigen Strukturen kommt. Deshalb kann die Theorie aufgestellt werden, dass D12 ein negativer Regulator der homotypischen ER-Fusion ist, die durch Syntaxin18, BNIP1 und Sec22b durchgeführt wird (Uemura et al. 2009).

Weitere Ergebnisse zeigten jedoch auch, dass D12 mit Vamp7, einem lysosomalen SNARE, in Überexpression interagieren kann und dass es bei Herunterregulation von D12 zur Verzögerung der Reifung lysosomaler Hydrolasen wie Cathepsin D kommt (Okumura et al. 2006).

Zur Bestätigung des Screen-Ergebnisses wurde der *Yeast-Two-Hybrid*-Ansatz wiederholt, um ein falsch-positives Ergebnis, das aus einer Selbstaktivierung des zu untersuchenden Proteins resultiert, auszuschließen. Hier zeigte sich, dass keine Selbstaktivierung des Plasmid, welches das murine Limp-2 enthält, vorliegt.

Das Hefe-System ist sehr anfällig für falsch-positive Ergebnisse, wobei deren Anzahl auf bis zu 50% geschätzt wird (Estojak, Brent und Golemis, 1995). Gründe hierfür können fehlende oder anders ablaufende posttranslationale Modifikationen in der Hefe sein, die in Säugetierzellen vielleicht für Interaktionen zentral sind. Dies gilt besonders für Limp-2, das, wie andere lysosomale Transmembranproteine, je nach Spezies 10-11 mögliche N-Glykosylierungsstellen besitzt, die es für seine lysosomale Stabilität benötigt. Diese Glykosylierungen könnten in der Hefe anders durchgeführt werden und somit Möglichkeiten bieten, Interaktionen nachzuweisen, die in tierischen Zellen nicht vorkommen (Wildt und Gerngross, 2005).

Weiterhin besitzt die Hefe-Zelle ein anderes Transport- und Organellensystem, sodass Kompartimente der Säugerzelle hier nicht vorkommen und umgekehrt. Ein Beispiel dafür ist die Vakuole, die in der Hefe unter anderem die Funktion des Lysosoms übernimmt. Solche Unterschiede könnten sich derart auswirken, dass Wechselwirkungen zwar im Hefe-

System nachgewiesen werden, da sich beide Proteine hier in einem Kompartiment und damit in derselben Membran befinden. Diese Wechselwirkungen würden aber nicht in einer Säugetierzelle stattfinden können, da sich dort beide Proteine nicht begegnen. Zusätzlich besteht noch die Möglichkeit, dass in tierischen Zellen Interaktionsdomänen durch Proteine, die in der Hefe nicht vorkommen, maskiert werden. Dies sind einige Gründe dafür, dass in dem Screening-Ansatz gefundene Proteine auf jeden Fall in anderen Modellsystemen validiert werden sollten.

5.2 Koimmunpräzipitationssystem

5.2.1 Interaktion von Limp-2 und D12

Für die Validierung in tierischen Zellen wurde das Koimmunpräzipitationssystem verwendet. In dieser Arbeit wurden dafür entweder Hek293T-, HeLa- oder Cos7-Zelllinien verwendet. Bei stattfindender Interaktion beider überexprimierter Proteine wird durch die Präzipitation des einen auch das andere Protein kopräzipitiert und kann mit Hilfe eines geeigneten Antikörpers im Blot dargestellt werden. Bei diesen Experimenten konnte die in der Hefe gefundene Interaktion bestätigt werden, da die Präzipitation von Limp-2 zur Kopräzipitation von D12 führte.

5.2.2 Kontrollexperimente

Um die Validität der Aussage zu erhöhen, wurden verschiedene Zusatzexperimente durchgeführt. Um die Interaktion auch von der anderen Seite zu zeigen, wurde D12 präzipitiert. Die Immunpräzipitation von D12 mit einem anti-HA-Antikörper führte jedoch nicht zu einer Koimmunpräzipitation von Limp-2. Dies konnte dadurch erklärt werden, dass der anti-HA-Antikörper nur eine geringe Menge von D12 präzipitierte. Um die präzipitierte Proteinmenge zu erhöhen, wurde ein Konstrukt von D12 erstellt, welches das myc-Tag n-terminal besitzt. Doch trotz guter Immunpräzipitation konnte ein mit einem HA-Tag versehenes Limp-2-Konstrukt nicht koimmunpräzipitiert werden. Ein Grund hierfür ließe sich möglicherweise darin finden, dass die Bindung des myc-Antikörpers an das n-terminal liegende myc-Tag die Bindung von Limp-2 an D12 verhindert.

Um dies zu umgehen, wurde ein am C-Terminus mit einem myc-Tag versehenes Konstrukt von D12 konstruiert, das nun bei Immunpräzipitation von D12 das mit einem HA-Tag markierte Limp-2-Konstrukt koimmunpräzipitierte. So konnte die in Hefe gefundene Interaktion von beiden Seiten bestätigt werden.

Um die Spezifität der Interaktion zu überprüfen, wurden in Koimmunpräzitationsexperimenten jeweils Limp-2 oder D12 durch ein äquivalentes Protein ersetzt. Anstatt D12 wurde die Interaktion von Limp-2 und Gosr2 überprüft. Dies ist ein valide Kontrollprotein, da Gosr2 ein Q-SNARE wie D12 ist und sich ebenfalls im ER befindet (Lowe et al. 1997; Honda et al. 2005). Im komplementären Experiment wurde Limp-2 durch Lamp2a ersetzt und eine Immunpräzitation von D12 durchgeführt. Lamp2a ist ebenfalls ein glykosyliertes, lysosomales Transmembranprotein (Hunziker und Geuze, 1996), das in diesem Experiment keine Interaktion mit D12 zeigte.

Bei der Immunpräzitation des c-terminal mit einem myc-Tag markierten Konstruktes von D12 und der Koimmunpräzitation von mLimp-2_HA wurde das mit myc markierte Protein tmem192b als Kontrolle verwendet und ebenfalls mit Limp-2_HA koexprimiert und immunpräzitiert. Tmem192b ist auch ein lysosomales Protein (Schröder et al. 2010; Behnke et al. 2011; Liu et al. 2012). Hier zeigte sich keine Interaktion von Tmem192b und Limp-2.

Weiterhin wurde bei jedem Koimmunpräzitationsexperiment zusätzlich eine alleinige Expression beider Proteine durchgeführt. So konnte ausgeschlossen werden, dass die Proteine in zu hohem Maße eigenständig an die Sepharose-Beads binden, die zur Bindung des verwendeten Antikörpers verwendet werden. Dies hätte zu einer Missinterpretation der Koimmunpräzitationsergebnisse geführt. Abhängig von der Menge des verwendeten Proteins aus dem Zelllysate zeigte sich manchmal eine schwache Bande bei der Einzeltransfektion des koimmunpräzitierten Proteins, die jedoch im Vergleich zur Koimmunpräzitation bei Koexpression beider Proteine sehr gering war. Diese unspezifische Bindung des überexprimierten Proteins kann vielleicht auf coiled-coiled-Domänen im Protein oder auf die sehr bindungsaffine, helixreiche SNARE-Domäne bei den SNAREs zurückgeführt werden (Jahn und Scheller, 2006). Die unspezifische Bindung wurde jedoch, bei gleichbleibender Stärke der beobachteten Interaktion, bei Verringerung der verwendeten Proteinmenge reduziert. So konnte bei einer verwendeten Menge von 200µg Zelllysate immer noch eine starke Interaktion von Limp-2 und D12 festgestellt werden.

Um generell die Validität des verwendeten Immunpräzitationssystems zu überprüfen, wurde eine bereits bekannte und publizierte Interaktion des R-SNAREs Sec22b und des humanen D12/Use1 mit diesem System nachgewiesen.

Ein Problem bestand auch noch darin, dass in den Überexpressionsstudien immer mit murinen Konstrukten gearbeitet wurde, so dass unklar war, ob die getroffenen Aussagen auch auf humane Proteine zutreffen. Hier konnte zumindest eine Interaktion des humanen D12 mit dem murinen Limp-2 gezeigt werden. Für die human-human Interaktion jedoch zeigte sich eine zu geringe Expression und Präzitation des humanen Limp-2, was jedoch ein bekanntes Problem ist.

Allerdings muss ebenfalls gesagt werden, dass alle Ergebnisse durch die Überexpression beider Proteine gewonnen wurden, so dass dieser Ansatz immer noch als artifiziell gesehen werden muss. Sicherlich erlaubt dieses System zuverlässigere Aussagen in Bezug auf die Interaktion als das Hefe-System, da hier vor allem posttranslationale Modifikationen und gleiche Kompartimente vorhanden sind wie im Ursprungsorganismus beider Proteine. Jedoch lässt sich immer noch nicht mit Sicherheit ausschließen, dass die beobachtete Interaktion künstlich ist und zum Beispiel Membrancluster präzipitiert werden, die aufgrund der starken Expression beide Proteine in hohem Maße enthalten, ohne dass eine direkte Interaktion besteht. Dagegen spricht allerdings wiederum die beobachtete Interaktion in der Hefe, die auf eine räumlich sehr enge Beziehung beider Proteine hinweist, ohne dass die Expression übermäßig stark sein muss.

Um beiderseitige Überexpression zu umgehen, wäre es nötig gewesen eine endogene Koimmunpräzipitation aus Zellen oder Organlysaten durchzuführen, was jedoch nicht gelang. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die verwendeten Proteinnengen aus Zelllysaten zu gering waren oder dass sich beide Proteine im normal verlaufenden Zellzyklus der untersuchten Proben nicht begegnen und die Interaktion nur nach einem Triggersignal wichtig wird. Um die Präzipitation aus Mäuseorganen durchzuführen, könnte man auch versuchen, Tritosomen als Ausgangsmaterial zu verwenden, in denen, wie gezeigt, sowohl Limp-2 als auch D12 stark angereichert sind.

5.3 Identifikation der Interaktionsdomäne in D12

Nachdem nun in zwei verschiedenen Systemen die Interaktion gezeigt worden war, sollte die für die Interaktion zuständige Region auf Seiten von D12 gefunden werden. Hinweise auf die Interaktionsstelle wurden sowohl in der Hefe als auch durch Koimmunpräzipitation gewonnen.

Durch die Erstellung veränderter Konstrukte von D12 und die Überprüfung auf Interaktion konnten Schlüsse gezogen werden über die möglichen beteiligten Proteinabschnitte. Da D12 einen linearen Aufbau mit einer Transmembrandomäne, einem langen n-terminalen, zytosolischen und einem kurzen c-terminalen, luminalen Teil hat, ließen sich verschiedene Varianten erstellen. Bei Testung auf Interaktion in der Hefe und in der Immunpräzipitation zeigte sich, dass die Konstrukte mit veränderter Transmembrandomäne und ohne c-terminalen Teil immer noch mit Limp-2 interagierten. Der alleinige n-terminale Teil ohne Transmembrandomäne interagierte nicht mehr, woraus geschlossen werden konnte, dass die Interaktion zwar im n-terminalen Teil stattfindet, dieser aber membrangebunden sein muss.

Um die Region noch weiter einzugrenzen, wurde eine Version von D12, der die ersten 26

Aminosäuren fehlen, erstellt und auf Interaktion geprüft, da es Hinweise gibt, dass hier die Domäne liegt, mit der D12 und das Protein NAG miteinander interagieren (Aoki et al. 2009). Dieses Konstrukt ließ sich immer noch mit Limp-2 koimmunpräzipitieren.

Wie bereits erwähnt, war ein zweites SNARE aus dem D12/Use1-SNARE-Komplex als potentieller Interaktionspartner von Limp-2 gefunden worden, BNIP1/Sec20. Dieses SNARE besitzt neben einer SNARE-Domäne eine sogenannte BH3-ähnliche Domäne, an die zum Beispiel antiapoptotische Moleküle wie Bcl2 binden können, so dass Überexpression von BNIP1 einen leichten proapoptotischen Effekt hat (Yasuda und Chinnadurai, 2000; Nakajima et al. 2004). Ein Alignment von D12 und BNIP1 ergab, dass ein zentrales Motiv dieser BH3-ähnlichen Domäne auch in D12 vorhanden und dort stark konserviert ist, nämlich die Aminosäureabfolge ELL (Leucin Leucin Glutamat).

Um nachzuprüfen, ob dieses Motiv wichtig sein könnte für die Interaktion, wurde wiederum ein Konstrukt von D12 erstellt, dem diese vier Aminosäuren, ELLG, fehlten. Es zeigte sich im direkten Vergleich eine starke Interaktion von Limp-2 und D12 aber eine nur sehr schwache Interaktion von Limp-2 und dem Konstrukt von D12 ohne ELLG. Daher kann die Aussage getroffen werden, dass diese Domäne zumindest eine sehr wichtige Rolle für die Interaktion zu spielen scheint. Zusätzlich wurde die intrazelluläre Lokalisation dieses Konstruktes in der Immunfluoreszenz überprüft. Nachgeprüft wurde hiermit, ob das Nicht-Vorhandensein der Interaktion auf eine geänderte Lokalisation zurückzuführen sein könnte. Dieser Verdacht erwies sich jedoch als unbegründet.

Was in zukünftigen Experimenten noch untersucht werden könnte, wäre die Interaktionsstelle auf Seiten von Limp-2 mit D12. Würde sich der Verdacht bestätigen, dass die Interaktion verantwortlich ist für die Entstehung großer Vesikel bei Überexpression von Limp-2, so müsste sich die Interaktionsstelle in der n-terminalen Transmembrandomäne oder der luminalen Domäne von Limp-2 befinden (Kuronita et al. 2005). Zusätzlich wäre es möglich die Interaktion trunkierter Limp-2-Mutanten mit D12 untersuchen, die zu dem Krankheitsbild AMRF führt. Möglicherweise wäre hier eine verminderte Wechselwirkung darstellbar, was einen Hinweis auf die Genese von AMRF geben könnte.

5.4 Suche nach dem subzellulären Interaktionsort von Limp-2 und D12

Eine weitere Frage, die untersucht werden sollte, befasst sich mit dem möglichen Interaktionsort von Limp-2 und D12 in der Zelle. Hier sind mehrere Möglichkeiten im sekretorischen Weg denkbar. Als Rezeptor für verschiedene Viren wie Enterovirus 71 ist Limp-2 auch an der Zelloberfläche vorhanden (Lin et al. 2013). Von D12 ist bekannt, dass es sich

hauptsächlich im ER befindet. Allerdings gibt es auch Hinweise auf lysosomale Lokalisation und es konnte auch endogen in Tritosomen, d.h. in aus der Leber angereicherten Lysosomen, nachgewiesen werden.

Es gibt Hinweise auf ER-vermittelte Phagozytosevorgänge, bei denen ER-residente SNAREs wie Syntaxin 18 eine Rolle spielen (Hatsuzawa et al. 2006) und es ist nicht auszuschließen, dass auch D12 an der Zelloberfläche spezialisierter Zellen wie Makrophagen zu finden ist. Eine Beteiligung von Limp-2 bei Phagozytosevorgängen wurde ebenfalls demonstriert (Carrasco-Marin et al. 2011).

Um erste Hinweise auf die Lokalisation der verwendeten Konstrukte zu bekommen, wurde eine Kofärbung von D12 mit verschiedenen Markerproteinen angefertigt und auf Kollokalisierung hin analysiert. Hier zeigte sich, dass sich der überwiegende Teil von D12 im ER, ein kleiner Teil im ERGIC befindet. Allerdings muss gesagt werden, dass die Experimente in HeLa-Zellen, also in menschlichen Karzinomzellen, durchgeführt wurden und das verwendete D12-Konstrukt aus der Maus stammt. Im Falle des murinen Limp-2 stimmt die Lokalisation in menschlichen Zellen jedoch mit der in murinen Zellen überein.

Der nächste Schritt bestand in der Doppelfärbung von überexprimiertem D12 und Limp-2. Hier zeigte sich eine schwache Kollokalisierung beider Proteine im ER. Diese Kollokalisierung konnte dadurch erhöht werden, dass eine ER-Retentionsmutante von Limp-2, die ein Motiv zur Bindung an den KDEL-Rezeptor besitzt, mit D12 kotransfiziert wurde. Um noch größere Aussagekraft zu erzeugen, wurde auch eine Immunpräzipitation dieser ER-Retentionsmutante durchgeführt, die D12 kopräzipitierte, so dass die Aussage getroffen werden kann, dass bei beiderseitiger Überexpression die Interaktion höchstwahrscheinlich im ER stattfindet. Dies muss jedoch nicht für die physiologische Interaktion der Proteine in unveränderten Zellen gelten. Für die Überprüfung der endogenen Situation wurde aufgrund eines fehlenden in der Immunfluoreszenz funktionierenden Antikörpers gegen D12 das mit myc markierte Konstrukt in murine Fibroblasten transfiziert und mit dem endogenen Antikörper gegen Limp-2 gegengefärbt. Dabei zeigte sich jedoch keine offensichtliche Kollokalisierung beider Proteine, da hier der verschwindend geringe ER-Anteil von Limp-2 nicht angefärbt wurde, der jedoch nichtsdestotrotz vorhanden und im Westernblot nachweisbar ist.

5.5 Untersuchung der physiologischen Rolle der Interaktion von D12 und Limp-2

5.5.1 Bekannte Interaktionspartner von SNARE-Proteinen und ihre Funktionen

Der letzte Teil der Arbeit sollte sich der möglichen physiologischen Rolle der Interaktion widmen. Zu schon bekannten und beschriebenen Interaktionen von SNAREs und anderen Proteinen lässt sich sagen, dass seit der Entdeckung und Aufklärung der SNARE-Komplexe die Forschung immer mehr in Richtung von SNARE-Lokalisationen und Funktionalität fortgeschritten ist. Hierbei wurden verschiedene mögliche Aufgaben für interagierende Nicht-SNARE-Proteine gefunden. NSF und α -SNAP wurden zuerst entdeckt, ihr Zweck ist das Disassemblieren des quarternären cis-SNARE-Komplexes. Synaptophysin ist ein Transmembranprotein, das mit dem SNARE Synaptobrevin/VAMP interagiert und auf diese Weise für die richtige Sortierung von VAMP in synaptische Vesikel in Nervenzellen sorgt (Pennuto et al. 2003). Weiterhin wurde in der Hefe gezeigt, dass die ER-SNAREs Bet1, Sed5 und Sec22 an Untereinheiten der COP-II-Coatomere binden und so in die entsprechenden umhüllten Vesikel rekrutiert werden können (Mossessova, Bickford und Goldberg, 2003).

Ähnliches ist auch für den Komplex aus Use1/D12, Bnip1/Sec20, Syntaxin18 und Sec22 in der Ratte gezeigt worden. Hier interagieren alle Proteine mit dem KDEL-Rezeptor ERD2, und Use1 und Sec22 können auch mit COPI-Untereinheiten kopräzipitiert werden, so dass über diese Interaktion die genannten SNAREs vom Golgi-Apparat in das ER zurücktransportiert werden können. Weiterhin konnten auch in verschiedenen SNAREs Sortiermotive gefunden werden, die zum Beispiel für die Bindung an Adapterproteine wichtig sind (Peden, Park und Scheller, 2001). Eine andere Rolle, die interagierende Proteine spielen können, ist die der Docking-Komplexe, die dazu beitragen, beladene Vesikel einzufangen und in die Nähe der SNARE-Akzeptorkomplexe zu bringen. Für Use1/D12 ist dies der Dsl1p-Komplex in der Hefe (Meiringer et al. 2011) beziehungsweise ZW10 und NAG in Säugerzellen (Schmitt, 2010); ein weiterer bekannter Komplex ist der HOPS-Komplex, der in der Hefe die Fusion von Autophagosomen oder späten Endosomen mit der Vakuole vermittelt (Collins et al. 2005).

Weiterhin könnten potentielle Interaktoren von SNARE-Proteinen zur Aktivierung der SNAREs beitragen. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist wiederum VAMP/synaptobrevin, das als singuläres Protein ohne zusätzliches Aktivatorprotein nicht in der Lage ist, SNARE-Komplexe auszubilden, da ein Teil seines SNARE-Motives sich in der Membran befindet (Hu et al. 2002).

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass interagierende Proteine SNAREs spezifisch vor Degradation beschützen. Ein Beispiel hierfür ist das SNARE Ufe1 in der Hefe, dessen Analog Syntaxin18 in Säugerzellen ist. Interaktion mit dem Protein Sly1 führt zur Verhinderung der Degradation des SNAREs über den sogenannten ERAD-Pathway (ER-associated Degradation) (Braun und Jentsch, 2007). Ein weiteres SNARE, Sed5 jedoch, das nicht mit Sly1 interagiert, wird degradiert. Interessanterweise lässt sich Sly1 auch in einem Interaktionsscreen als potentieller Interaktor von Use1/D12 finden (Supplemental Material aus: (Uemura et al. 2009)).

5.5.1.1 Experimente zur physiologischen Rolle der Interaktion von Limp-2 und D12

Grundsätzlich lässt sich sagen, dass es viele mögliche Prozesse gibt, in denen ein lysosomales Protein und ein SNARE, das sich hauptsächlich im ER befindet, zusammenwirken könnten. Eine Beeinflussung autophagozytotischer genauso wie phagozytotischer Prozesse ist möglich. Vielleicht spielt die Interaktion auch bei der Degradation von D12 eine Rolle. Ein Hinweis darauf ist, dass sich in den aufgereinigten Lysosomen aus den Limp-2-Knockout-Mäusen eine Akkumulation eines möglichen Spaltfragmentes von D12 findet. Die Möglichkeit der Ubiquitylierung von D12 als Vorstufe zur Degradation ist auch schon in (Aoki et al. 2009) beschrieben.

Da Limp-2 zuerst als Transportmolekül identifiziert worden war, stellte sich die Frage, ob D12 vielleicht in Abhängigkeit von Limp-2 sortiert oder durch Limp-2 transportiert werden könnte. Um dies zu überprüfen, wurde mit dem myc-Tag versehenes D12 in Limp-2-Wildtyp- und Knockout-Fibroblasten transfiziert und mit Limp-2 und D12-Antikörpern gefärbt. Die Analyse vieler Zellen wie in Abb. 4.19 zeigte jedoch keine augenscheinlichen Lokalisationsunterschiede zwischen den Wildtyp- und Knockout-Fibroblasten. Um dies auch noch endogen zu testen und der Gefahr zu entgehen, dass Tags durch Hydrolasen entfernt werden, wurden Tritosomen von Knockout und Wildtyp-Mäusen analysiert, dargestellt in Abb. 4.20. Hier zeigte sich einerseits, dass D12 endogen in Lysosomen vorhanden ist, was bisher noch nicht bekannt war. Andererseits zeigten sich in den untersuchten Proben keine starken Mengenunterschiede in Tritosomen von Limp-2-Wildtyp- und Knockout-Mäusen. Wie oben erwähnt, zeigte sich jedoch ein putatives Spaltfragment von D12 vermehrt in den Präparationen von den Knockout-Mäusen.

Eine weitere Möglichkeit könnte sein, dass D12 das Verlassen des ER von Limp-2 beeinflusst. Um dies zu testen, wurde D12 überexprimiert oder mittels siRNA in HeLa-Zellen herunterreguliert. Das Verlassen des ERs von Limp-2 kann nun nach einer Behandlung der Zelllysate mit dem Enzym Endoglykosidase H abgeschätzt werden, da hier ER-Form

und post-ER-Form von Limp-2 auf einem Blot voneinander unterschieden werden können. Hier, in Abb. 4.21 und Abb. 4.23, zeigte sich jedoch auch keine Beeinflussung dieses Prozesses durch D12. Dies steht im Widerspruch zu den publizierten Ergebnissen, dass die Herunterregulation von D12 die Reifung von Cathepsin D, einer lysosomalen Hydrolase, verzögert (Okumura et al. 2006). Dieser Befund könnte aber auch an der sehr hohen Halbwertszeit der Limp-2-Moleküle liegen, die es nicht erlaubt, neu-synthetisiertes Limp-2 alleinig zu untersuchen.

Ein nächster Ansatz bestand darin, zu untersuchen, ob Limp-2 einen Einfluss auf die D12-Oberflächenexpression haben könnte. Der Grund für diese Überlegung war, dass sich D12 nach Phagozytose durch Makrophagen in phagosomalen Membranen darstellen lässt und auch Limp-2 eine Rolle bei der Phagozytose spielt (Hatsuzawa et al. 2006; Carrasco-Marin et al. 2011). Für diesen Versuch wurde in Abb. 4.23 die Methode der Oberflächenbiotinylierung angewandt, bei der alle zu einem bestimmten Zeitpunkt an der Oberfläche vorhandenen, lysinhaltigen Proteine markiert und auf einem Blot dargestellt werden können. Es zeigte sich hier, dass sowohl Limp-2 und D12 als auch Gosr2, das als Kontrolle verwendet worden war, bei Überexpression an der Zelloberfläche vorhanden sind. Die Beeinflussung der Oberflächenlokalisierung von Limp-2 durch D12 war etwas größer als die durch Gosr2, doch interessanterweise war die Oberflächenlokalisierung von Gosr2 zusammen mit Limp-2 gegenüber der Oberflächenlokalisierung von Gosr2 allein massiv gesteigert. Da es progressive myoklonische Epilepsien mit Mutationen in Gosr2 gibt, die AMRF ähneln (Boisse Lomax et al. 2013), sollte dieser mögliche Zusammenhang weiter untersucht werden. Es wurde in Limp-2-Knockout- und Wildtypfibroblasten ebenfalls eine Oberflächenbiotinylierung durchgeführt, die einerseits zeigte, dass endogen sowohl Limp-2 als auch Gosr2 in geringem Maße an der Oberfläche vorhanden sind. Andererseits aber konnte kein Unterschied der Mengen von Gosr2 gesehen werden, wie es nach den vorherigen Ergebnissen zu erwarten gewesen wäre.

Die ursprüngliche Überlegung, D12 als potentiellen Interaktionspartner aus dem Hefe-Screen auszuwählen, resultierte aus der Beobachtung, dass die Überexpression von murinem Limp-2 in verschiedenen Zelllinien für 36h eine Vergrößerung endosomal-lysosomaler Vesikel zur Folge hat. Ein ähnliches Muster an Veränderung, also Vesikulation und Vakuolisierung, allerdings des ERs, findet sich bei Herunterregulation von D12 (Uemura et al. 2009). Die n-terminale Transmembrandomäne und die luminaire Domäne von Limp-2 konnten als hierfür verantwortlich identifiziert werden. Um die Rolle von D12 bei diesen Vorgängen zu überprüfen, wurden Limp-2 und D12 für 36h überexprimiert und eine Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt, die, wie in Abb. 4.27 dargestellt, zeigte, dass beide Proteine in den großen vesikulären Strukturen kolokalisieren. Dies ist jedoch nur ein indirekter Hinweis auf die Rolle der Interaktion für diesen Prozess, da die starke Überex-

pression von Limp-2 in viele andere zelluläre Vorgänge eingreift.

Um sicher zu gehen, dass die Interaktion ursächlich für die Entstehung großer Vesikel ist, könnte zum Beispiel eine D12-Variante erstellt werden, die nicht mehr die Fähigkeit besitzt, Limp-2 zu binden, aber immer noch als SNARE-Protein fungieren kann. Überexpression von Limp-2 und dieser Mutante sollte nun zumindest in doppelt-transfizierten Zellen zur verminderten Bildung der Vesikel führen. Eventuell wäre hierfür die mD12_ Δ -ELLG-Mutante verwendbar.

Grundsätzlich sind aus den Ergebnissen der Arbeit zahlreiche medizinisch nutzbare Konsequenzen denkbar.

Beispielsweise könnte man versuchen, die neuronalen Ablagerungen, die beim AMRF-Syndrom entstehen, mit einer verminderten Degradation intrazellulärer Bestandteile zu erklären. Es zeigte sich ja auch, dass Knockdown von D12 in Zellkultur zu Lipofuszinakkumulation führt. Dies kann als ein Zeichen eines beeinträchtigten Abbaus von Mitochondrien und anderen Organellen gewertet werden. Die Beeinflussung der Interaktion könnte hier möglicherweise zur Besserung einiger Symptome oder der Aufschiebung des ersten Auftretens führen. Ein erstes mögliches Experiment in diese Richtung wäre die Untersuchung der AMRF-Mutanten auf Interaktion mit Use1/D12.

Sollte Autophagozytose ein Prozess sein, in dem die beschriebene Interaktion eine Rolle spielt, so wären viele Krankheitsbilder denkbar, in denen dieser elementare Vorgang wichtig ist. Verschiedene neurodegenerative Erkrankungen sind von einer Beeinträchtigung der Autophagozytose sicherlich am ehesten betroffen. Eventuell ließen sich dann genetische Untersuchungen Betroffener durchführen und Mutationen im Use1-Gen nachweisen.

5.6 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die untersuchte Interaktion mehrfach validiert und die Interaktionsstelle auf Seiten von D12 gefunden wurde. Eine Modellgrafik der möglicherweise ablaufenden Interaktion ist in Abb. 5.1 dargestellt. In A) ist die Topologie von D12 mit der Transmembrandomäne, dem SNARE-Motiv und dem für die Interaktion verantwortlichen ELLG-Motiv gezeigt. Aus dieser Struktur resultieren die Abbildungen B) und C), in denen die beiden Möglichkeiten der Interaktion gezeigt sind. In B) wird davon ausgegangen, dass Limp-2 und D12 sich in unterschiedlichen Membranen befinden, zum Beispiel im Lysosom und im ER. In C) ist dargestellt, wie die Interaktion aussähe, falls D12 und Limp-2 sich in der gleichen Membran befänden. Sollte die Verteilung derjenigen in B) entsprechen, so wäre ein möglicher Prozess, bei dem die Interaktion eine Rolle spielen könnte die Phagozytose. Wie publiziert (Hatsuzawa et al. 2006) findet sich D12/Use1 in phagosomalen Membranen und ist direkt an der Phagozytose betei-

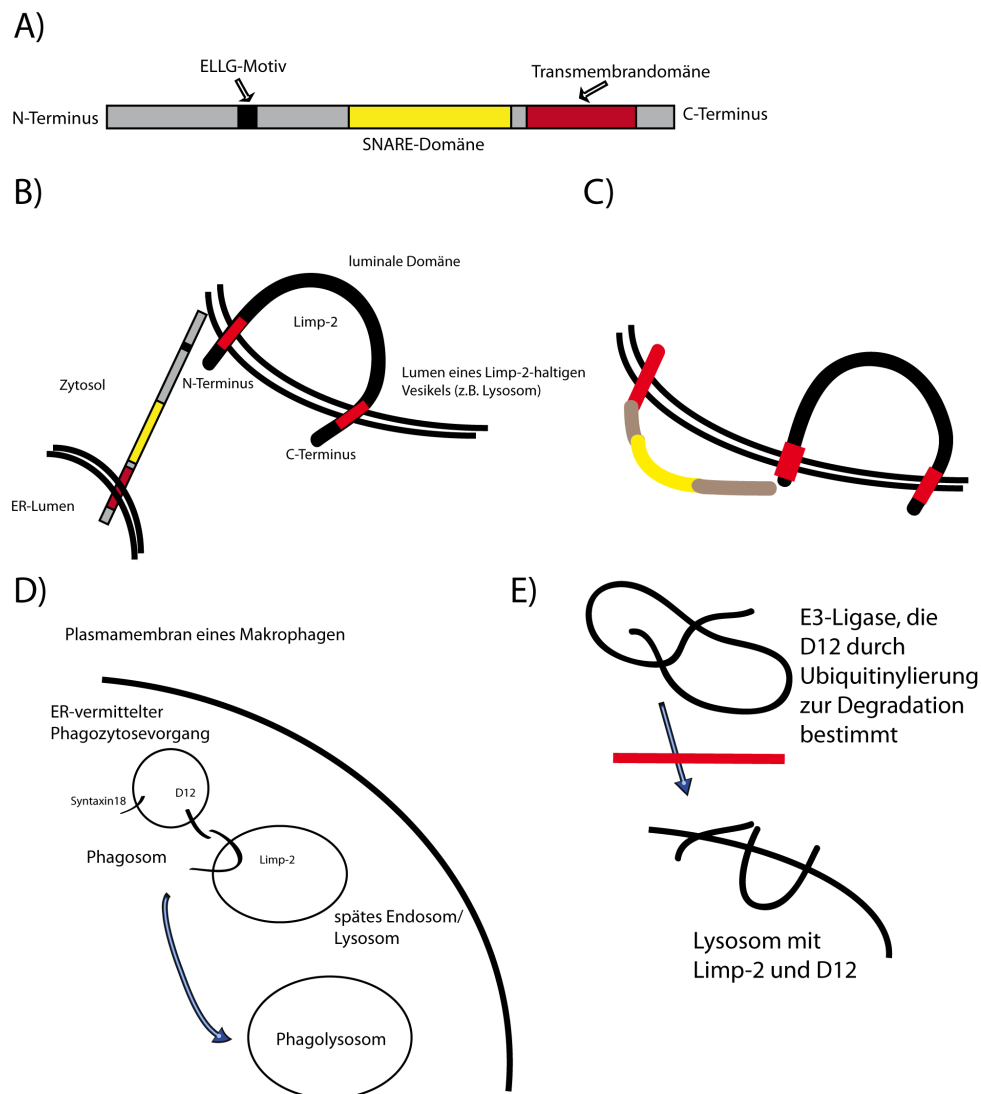


Abbildung 5.1: Modell der Interaktion von D12 und Limp-2:

A) Modellhafte Darstellung des Typ-II-Transmembranproteins D12 mit Transmembrandomäne in Rot, SNARE-Domäne in Gelb und dem für die Interaktion verantwortlichen ELLG-Motiv in Schwarz.

B) Beispiel für eine denkbare Interaktion von Limp-2 und D12, falls sich D12 und Limp-2 in unterschiedlichen Membranen befinden.

C) Mögliche Interaktion von Limp-2 und D12 in der gleichen Membran.

D) Eine aus B) resultierende mögliche Rolle der Interaktion bei der Phagozytose.

E) Limp-2 beschützt durch die Interaktion in der gleichen Membran D12 vor der Ubiquitinierung und dem darauffolgenden Abbau.

ligt. Limp-2-Knockout-Makrophagen zeigen Defizite in der Reifung von Phagosomen und der phagosomal-lysosomalen Fusion (Carrasco-Marin et al. 2011). Somit könnte die beschriebene Interaktion eine Vereinfachung der Fusion von Phagosomen mit Lysosomen ermöglichen.

Sollte die Interaktion in der gleichen Membran stattfinden, so könnte eine mögliche Rolle

die Verhinderung der Degradation von D12 sein, wie in E) gezeigt. Hierfür spricht ein lysosomal akkumuliertes Spaltfragment von D12, das in den Limp-2-Knockout-Tritosomen gefunden wurde. Das ELLG-Motiv ist im SNARE BNIP-1/Sec20 ebenfalls für die Bindung von antiapoptotischen Proteinen wichtig (Nakajima et al. 2004), vielleicht ist hier die Interaktion ebenfalls wichtig, indem diese Bindestelle maskiert wird. Die Folge wäre eine antiapoptotische Wirkung der Interaktion. Außerdem wurden Hinweise gefunden, dass die Interaktion möglicherweise mit der Bildung vergrößerter Vesikel nach Limp-2-Überexpression zusammenhängen könnte. Auf jeden Fall sollte in Zukunft auch die Rolle des anderen SNAREs, BNIP1/Sec20, das im Screen gefunden wurde, untersucht werden, da die beiden SNAREs ja auch schon miteinander interagieren und *in-vivo* Homo-Oligomere bilden (Verrier et al. 2008). BNIP-1 ist auch insofern von Interesse, da es an bestimmten Formen von Autophagie beteiligt ist, mitochondriale Fragmentation reguliert und außerdem der Familie pro-apoptotischer Moleküle angehört (Zhang et al. 2003; Nakajima et al. 2004; Tang et al. 2011; Ryu et al. 2012). Die Interaktion von Limp-2 und BNIP-1 wurde zumindest im Hefe-Versuch schon bestätigt.

Kapitel 6

Zusammenfassung

Das Protein Limp-2 ist das Transportmolekül für die lysosomale Hydrolase β -Glucocerebrosidase vom endoplasmatischen Retikulum in das Lysosom. Mutationen der β -Glucocerebrosidase führen zu M. Gaucher, der häufigsten lysosomalen Speichererkrankung. Mutationen in Limp-2 führen beim Menschen zum action myoclonus renal failure Syndrom (AMRF), das eine myoklonische Epilepsie mit progressivem Nierenversagen beinhaltet. Der Knockout von Limp-2 in der Maus erzeugt bei betroffenen Tieren unter anderem eine Hypernephrose aufgrund urethraler Konstriktion, für die fehlerhafte endocytotische Recycling-Prozesse und gestörte endosomal-lysosomale Fusionsprozesse verantwortlich gemacht werden. Überexpression von Limp2-Konstrukten in verschiedenen Zelllinien führt zur Bildung stark vergrößerter endosomal-lysosomaler vesikulärer Strukturen.

Um der Ursache dieser Phänotypen in Maus und Mensch auf den Grund zu gehen, wurde in vorherigen Arbeiten ein Hefe-Screen zur Identifikation neuer möglicher Interaktionspartner durchgeführt und das im endoplasmatischen Retikulum lokalisierte SNARE-Protein D12/Use1 als putativer Interaktor ausgewählt. SNARE-Proteine sind von unverzichtbarer Bedeutung für intrazelluläre Fusionsprozesse.

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels des *Yeast-Two-Hybrid*-Systems die Interaktion bestätigt werden. Immunpräzipitationen in verschiedenen Zelllinien sowohl von D12 als auch von Limp-2 zeigten ebenfalls die Interaktion beider Proteine. Des Weiteren konnte mittels einer Deletionsmutante von D12 eine außerhalb des SNARE-Motivs liegende Domäne, bestehend aus den 4 Aminosäuren ELLG (Glutamat-Leucin-Leucin-Glycin), als möglicher Vermittler dieser Interaktion identifiziert werden. Außerdem wurde das endoplasmatische Retikulum in der Immunfluoreszenz und in Immunpräzipitationen als Ort der beobachteten Interaktion nachgewiesen.

Ferner konnte in einer Lysosomenpräparation aus Mäusen gezeigt werden, dass D12 nicht nur im ER, sondern auch lysosomal vorkommt.

In Bezug auf eine physiologische Rolle der Interaktion zur Erklärung von Phänomenen des Knockouts, der Limp-2-Überexpression in Zelllinien oder der humanen Mutationen kann nur spekuliert werden. Für eine mögliche Rolle der Interaktion in Bezug auf die Entstehung vergrößerter Vesikel nach Limp2-Überexpression spricht die Kolo-kalisation von Limp-2 und D12 in diesen. Es ergaben sich keine Unterschiede in der Verteilung beziehungsweise Lokalisation von D12 in Limp-2-Knockout- oder Wildtyp-Tieren, bis auf die Akkumulation eines möglichen Spaltfragmentes von D12 in den Lysosomen von Limp-2-Knockout-Mäusen. Genauso wenig fanden sich eindeutige Hinweise auf Beeinflussung der Oberflächenlokalisation oder des ER-Exits von Limp-2 durch D12.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass starke Hinweise auf eine Interaktion und die zugehörige Domäne in D12 gefunden wurden, die Bedeutung der Interaktion für die Zelle jedoch noch nicht vollständig geklärt ist.

Literaturverzeichnis

- Aoki, T., S. Ichimura, A. Itoh, M. Kuramoto, T. Shinkawa, T. Isobe und M. Tagaya. »Identification of the neuroblastoma-amplified gene product as a component of the syntaxin 18 complex implicated in Golgi-to-endoplasmic reticulum retrograde transport«. In: *Mol. Biol. Cell* 20.11 (2009), S. 2639–49 (siehe S. 14, 65, 84, 88, 91).
- Balreira, A., P. Gaspar, D. Caiola, J. Chaves, I. Beirao, J. L. Lima, J. E. Azevedo und M. C. Miranda. »A nonsense mutation in the LIMP-2 gene associated with progressive myoclonic epilepsy and nephrotic syndrome«. In: *Hum. Mol. Genet.* 17.14 (2008), S. 2238–43 (siehe S. 7).
- Behnke, J., E. L. Eskelinen, P. Saftig und B. Schröder. »Two dileucine motifs mediate late endosomal/lysosomal targeting of transmembrane protein 192 (TMEM192) and a C-terminal cysteine residue is responsible for disulfide bond formation in TMEM192 homodimers«. In: *The Biochemical journal* 434.2 (2011), S. 219–31 (siehe S. 61, 86).
- 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. Macdonnell, B. L. Hodgson, M. A. Bayly, J. Savige, J. C. Mulley, G. K. Smyth, D. A. Power, P. Saftig und M. Bahlo. »Array-based gene discovery with three unrelated subjects shows SCARB2/LIMP-2 deficiency causes myoclonus epilepsy and glomerulosclerosis«. In: *Am. J. Hum. Genet.* 82.3 (2008), S. 673–84 (siehe S. 8).
- Beutler, E., A. Demina und T. Gelbart. »Glucocerebrosidase mutations in Gaucher disease.« eng. In: *Mol Med* 1.1 (1994), S. 82–92 (siehe S. 83).
- Blanz, J., J. Groth, C. Zachos, C. Wehling, P. Saftig und M. Schwake. »Disease-causing mutations within the lysosomal integral membrane protein type 2 (LIMP-2) reveal the nature of binding to its ligand beta-glucocerebrosidase«. In: *Hum. Mol. Genet.* 19.4 (2010), S. 563–72 (siehe S. 7).
- Boisse Lomax, L., M. A. Bayly, H. Hjalgrim, R. S. Moller, A. M. Vlaar, K. M. Aaberg, I. Marquardt, L. C. Gandolfo, M. Willemsen, E. J. Kamsteeg, J. D. O’Sullivan, G. C. Korenke, B. R. Bloem, I. F. de Coo, J. M. Verhagen, I. Said, T. Prescott, A. Stray-Pedersen, M. Rasmussen, D. F. Vears, A. E. Lehesjoki, M. A. Corbett, M. Bahlo, J.

- Gecz, L. M. Dibbens und S. F. Berkovic. »'North Sea' progressive myoclonus epilepsy: phenotype of subjects with GOSR2 mutation«. In: *Brain : a journal of neurology* 136.Pt 4 (2013), S. 1146–54 (siehe S. 92).
- Braulke, T. und J. S. Bonifacino. »Sorting of lysosomal proteins«. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1793.4 (2009), S. 605–14 (siehe S. 2, 4, 5, 69).
- Braun, Sigurd und Stefan Jentsch. »SM-protein-controlled ER-associated degradation discriminates between different SNAREs«. In: *EMBO Rep.* 8.12 (2007), S. 1176–82 (siehe S. 91).
- Burri, L., O. Varlamov, C. A. Doege, K. Hofmann, T. Beilharz, J. E. Rothman, T. H. Sollner und T. Lithgow. »A SNARE required for retrograde transport to the endoplasmic reticulum«. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100.17 (2003), S. 9873–7 (siehe S. 12).
- Carrasco-Marin, E., L. Fernandez-Prieto, E. Rodriguez-Del Rio, F. Madrazo-Toca, T. Reinheckel, P. Saftig und C. Alvarez-Dominguez. »LIMP-2 links late phagosomal trafficking with the onset of the innate immune response to *Listeria monocytogenes*: a role in macrophage activation«. In: *The Journal of biological chemistry* 286.5 (2011), S. 3332–41 (siehe S. 6, 78, 89, 92, 94).
- Carstea, E D, M H Polymeropoulos, C C Parker, S D Detera-Wadleigh, R R O'Neill, M C Patterson, E Goldin, H Xiao, R E Straub und M T Vanier. »Linkage of Niemann-Pick disease type C to human chromosome 18«. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90.5 (1993), S. 2002–4 (siehe S. 2).
- Carstea, E D, J A Morris, K G Coleman, S K Loftus, D Zhang, C Cummings, J Gu, M A Rosenfeld, W J Pavan, D B Krizman, J Nagle, M H Polymeropoulos, S L Sturley, Y A Ioannou, M E Higgins, M Comly, A Cooney, A Brown, C R Kaneshki, E J Blanchette-Mackie, N K Dwyer, E B Neufeld, T Y Chang, L Liscum, J F Strauss, K Ohno, M Zeigler, R Carmi, J Sokol, D Markie, R R O'Neill, O P van Diggelen, M Elleder, M C Patterson, R O Brady, M T Vanier, P G Pentchev und D A Tagle. »Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis«. In: *Science* 277.5323 (1997), S. 228–31 (siehe S. 2).
- Collins, K. M., N. L. Thorngren, R. A. Fratti und W. T. Wickner. »Sec17p and HOPS, in distinct SNARE complexes, mediate SNARE complex disruption or assembly for fusion«. In: *The EMBO journal* 24.10 (2005), S. 1775–86 (siehe S. 90).
- Corbett, M. A., M. Schwake, M. Bahlo, L. M. Dibbens, M. Lin, L. C. Gandolfo, D. F. Vears, J. D. O'Sullivan, T. Robertson, M. A. Bayly, A. E. Gardner, A. M. Vlaar, G. C. Korenke, B. R. Bloem, I. F. de Coo, J. M. Verhagen, A. E. Lehesjoki, J. Gecz und S. F. Berkovic. »A mutation in the Golgi Qb-SNARE gene GOSR2 causes progressive myoclonus epilepsy with early ataxia«. In: *Am. J. Hum. Genet.* 88.5 (2011), S. 657–63 (siehe S. 80).

- Cresswell, P. »Assembly, transport, and function of MHC class II molecules«. In: *Annu. Rev. Immunol.* 12 (1994), S. 259–93 (siehe S. 1).
- de Duve, C. »The lysosome turns fifty«. In: *Nat. Cell Biol.* 7.9 (2005), S. 847–9 (siehe S. 1).
- de Duve, C., B C Pressman, R Gianetto, R Wattiaux und F Appelmans. »Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue«. In: *The Biochemical journal* 60.4 (1955), S. 604–17 (siehe S. 1).
- Desmond, M. J., D. Lee, S. A. Fraser, M. Katerelos, K. Gleich, P. Martinello, Y. Q. Li, M. C. Thomas, R. Michelucci, A. J. Cole, P. Saftig, M. Schwake, D. Stapleton, S. F. Berkovic und D. A. Power. »Tubular proteinuria in mice and humans lacking the intrinsic lysosomal protein SCARB2/Limp-2«. In: *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 300.6 (2011), F1437–47 (siehe S. 6).
- Dibbens, L. M., I. Karakis, M. A. Bayly, D. J. Costello, A. J. Cole und S. F. Berkovic. »Mutation of SCARB2 in a patient with progressive myoclonus epilepsy and demyelinating peripheral neuropathy«. In: *Arch. Neurol.* 68.6 (2011), S. 812–3 (siehe S. 8).
- Dibbens, L. M., R. Michelucci, A. Gambardella, F. Andermann, G. Rubboli, M. A. Bayly, T. Joensuu, D. F. Vears, S. Franceschetti, L. Canafoglia, R. Wallace, A. G. Bassuk, D. A. Power, C. A. Tassinari, E. Andermann, A. E. Lehesjoki und S. F. Berkovic. »SCARB2 mutations in progressive myoclonus epilepsy (PME) without renal failure«. In: *Ann. Neurol.* 66.4 (2009), S. 532–6 (siehe S. 8).
- Dilcher, M., B. Veith, S. Chidambaram, E. Hartmann, H. D. Schmitt und G. Fischer von Mollard. »Use1p is a yeast SNARE protein required for retrograde traffic to the ER«. In: *The EMBO journal* 22.14 (2003), S. 3664–74 (siehe S. 12).
- Do, C. B., J. Y. Tung, E. Dorfman, A. K. Kiefer, E. M. Drabant, U. Francke, J. L. Mountain, S. M. Goldman, C. M. Tanner, J. W. Langston, A. Wojcicki und N. Eriksson. »Web-based genome-wide association study identifies two novel loci and a substantial genetic component for Parkinson’s disease«. In: *PLoS Genet.* 7.6 (2011), e1002141 (siehe S. 8).
- Eskelinen, Eeva-Liisa und Paul Saftig. »Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease«. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1793.4 (2009), S. 664–73 (siehe S. 1).
- Estojak, J., R. Brent und E. A. Golemis. »Correlation of two-hybrid affinity data with in vitro measurements«. In: *Mol. Cell. Biol.* 15.10 (1995), S. 5820–9 (siehe S. 84).
- Fasshauer, D, R B Sutton, A T Brunger und R Jahn. »Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs«. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95.26 (1998), S. 15781–6 (siehe S. 11).

- 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 und P. Saftig. »LIMP-2/LGP85 deficiency causes ureteric pelvic junction obstruction, deafness and peripheral neuropathy in mice«. In: *Hum. Mol. Genet.* 12.6 (2003), S. 631–46 (siehe S. 5, 32).
- Gersten, D. M., T. W. Kimmerer und H. B. Bosmann. »The lysosome periphery: biochemical and electrokinetic properties of the tritosome surface«. In: *The Journal of cell biology* 60.3 (1974), S. 764–73 (siehe S. 44).
- Ghosh, Pradipta, Nancy M Dahms und Stuart Kornfeld. »Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale«. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4.3 (2003), S. 202–12 (siehe S. 3).
- Goker-Alpan, Ozlem, Barbara K. Stubblefield, Benoit I. Giasson und Ellen Sidransky. »Glucocerebrosidase is present in α -synuclein inclusions in Lewy body disorders.« In: *Acta Neuropathol* 120.5 (2010), S. 641–649 (siehe S. 8).
- Guerrero-Lopez, R., P. J. Garcia-Ruiz, B. G. Giraldez, C. Duran-Herrera, M. R. Querol-Pascual, J. M. Ramirez-Moreno, S. Mas und J. M. Serratosa. »A new SCARB2 mutation in a patient with progressive myoclonus ataxia without renal failure«. In: *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 27.14 (2012), S. 1826–7 (siehe S. 8).
- Gunther, W., A. Luchow, F. Cluzeaud, A. Vandewalle und T. J. Jentsch. »ClC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells«. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95.14 (1998), S. 8075–80 (siehe S. 55).
- Hatsuzawa, K., T. Tamura, H. Hashimoto, S. Yokoya, M. Miura, H. Nagaya und I. Wada. »Involvement of syntaxin 18, an endoplasmic reticulum (ER)-localized SNARE protein, in ER-mediated phagocytosis«. In: *Mol. Biol. Cell* 17.9 (2006), S. 3964–77 (siehe S. 78, 89, 92, 93).
- Hirose, H., K. Arasaki, N. Dohmae, K. Takio, K. Hatsuzawa, M. Nagahama, K. Tani, A. Yamamoto, M. Tohyama und M. Tagaya. »Implication of ZW10 in membrane trafficking between the endoplasmic reticulum and Golgi«. In: *The EMBO journal* 23.6 (2004), S. 1267–78 (siehe S. 14).
- Honda, Akira, Omayma S. Al-Awar, Jesse C. Hay und Julie G. Donaldson. »Targeting of Arf-1 to the early Golgi by membrin, an ER-Golgi SNARE.« In: *J Cell Biol* 168.7 (2005), S. 1039–1051 (siehe S. 86).
- Honing, S., I. V. Sandoval und K. von Figura. »A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3«. In: *The EMBO journal* 17.5 (1998), S. 1304–14 (siehe S. 5).

- Hopfner, F., E. C. Schulte, B. Mollenhauer, B. Bereznai, F. Knauf, P. Lichtner, A. Zimprich, D. Haubenberger, W. Pirker, T. Brucke, A. Peters, C. Gieger, G. Kuhlenbaumer, C. Trenkwalder und J. Winkelmann. »The role of SCARB2 as susceptibility factor in Parkinson's disease«. In: *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 28.4 (2013), S. 538–40 (siehe S. 8).
- Hu, K., J. Carroll, S. Fedorovich, C. Rickman, A. Sukhodub und B. Davletov. »Vesicular restriction of synaptobrevin suggests a role for calcium in membrane fusion«. In: *Nature* 415.6872 (2002), S. 646–50 (siehe S. 90).
- Hunziker, W. und H. J. Geuze. »Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins.« In: *Bioessays* 18.5 (1996), S. 379–389 (siehe S. 86).
- Jahn, R. und R. H. Scheller. »SNAREs—engines for membrane fusion«. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7.9 (2006), S. 631–43 (siehe S. 9, 13, 86).
- Knipper, M., C. Claussen, L. Ruttiger, U. Zimmermann, R. Lullmann-Rauch, E. L. Eskelinen, J. Schröder, M. Schwake und P. Saftig. »Deafness in LIMP2-deficient mice due to early loss of the potassium channel KCNQ1/KCNE1 in marginal cells of the stria vascularis«. In: *The Journal of physiology* 576.Pt 1 (2006), S. 73–86 (siehe S. 6).
- Kuronita, T. »A role for the lysosomal membrane protein LGP85 in the biogenesis and maintenance of endosomal and lysosomal morphology«. In: *J. Cell Sci.* 115.21 (2002), S. 4117–4131 (siehe S. 5, 82, 83).
- Kuronita, T., T. Hatano, A. Furuyama, Y. Hirota, N. Masuyama, P. Saftig, M. Himeno, H. Fujita und Y. Tanaka. »The NH(2)-terminal transmembrane and luminal domains of LGP85 are needed for the formation of enlarged endosomes/lysosomes«. In: *Traffic* 6.10 (2005), S. 895–906 (siehe S. 5, 88).
- Lin, Hsiang-Yin, Ya-Ting Yang, Shu-Ling Yu, Kuang-Nan Hsiao, Chia-Chyi Liu, Charles Sia und Yen-Hung Chow. »Caveolar endocytosis is required for human PSGL-1-mediated enterovirus 71 infection.« In: *J Virol* 87.16 (2013), S. 9064–9076 (siehe S. 88).
- Lin, Y. W., H. Y. Lin, Y. L. Tsou, E. Chitra, K. N. Hsiao, H. Y. Shao, C. C. Liu, C. Sia, P. Chong und Y. H. Chow. »Human SCARB2-mediated entry and endocytosis of EV71«. In: *PloS one* 7.1 (2012), e30507 (siehe S. 7).
- Liu, Zhen, Ya Juan Lv, Yi Peng Song, Xiao Hong Li, Yuan Na Du, Cui Hong Wang und Li Kuan Hu. »Lysosomal membrane protein TMEM192 deficiency triggers crosstalk between autophagy and apoptosis in HepG2 hepatoma cells.« In: *Oncol Rep* 28.3 (2012), S. 985–991 (siehe S. 86).
- Lowe, S. L., F. Peter, V. N. Subramaniam, S. H. Wong und W. Hong. »A SNARE involved in protein transport through the Golgi apparatus«. In: *Nature* (1997) (siehe S. 57, 86).

- Mason, J. M. und K. M. Arndt. »Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications«. In: *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 5.2 (2004), S. 170–6 (siehe S. 7).
- Mazzulli, Joseph R., You-Hai Xu, Ying Sun, Adam L. Knight, Pamela J. McLean, Guy A. Caldwell, Ellen Sidransky, Gregory A. Grabowski und Dimitri Krainc. »Gaucher disease glucocerebrosidase and α -synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies.« In: *Cell* 146.1 (2011), S. 37–52 (siehe S. 8).
- Meiringer, Christoph T A, Ralf Rethmeier, Kathrin Auffarth, Joshua Wilson, Angela Perz, Charles Barlowe, Hans Dieter Schmitt und Christian Ungermann. »The Dsl1 protein tethering complex is a resident endoplasmic reticulum complex, which interacts with five soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) attachment protein receptors (SNAREs): implications for fusion and fusion regulation«. In: *The Journal of biological chemistry* 286.28 (2011), S. 25039–46 (siehe S. 90).
- Michelakakis, H., G. Xiromerisiou, E. Dardiotis, M. Bozi, D. Vassilatis, P. M. Kounta, G. Patramani, M. Moraitou, D. Papadimitriou, E. Stamboulis, L. Stefanis, E. Zintzaras und G. M. Hadjigeorgiou. »Evidence of an association between the scavenger receptor class B member 2 gene and Parkinson's disease«. In: *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 27.3 (2012), S. 400–5 (siehe S. 8).
- Mossessova, E., L. C. Bickford und J. Goldberg. »SNARE selectivity of the COPII coat«. In: *Cell* 114.4 (2003), S. 483–95 (siehe S. 90).
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn und H. Erlich. »Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction«. In: *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1 (1986), S. 263–73 (siehe S. 35).
- Murphy, Karen E., Amanda M. Gysbers, Sarah K. Abbott, Nahid Tayebi, Woojin S. Kim, Ellen Sidransky, Antony Cooper, Brett Garner und Glenda M. Halliday. »Reduced glucocerebrosidase is associated with increased α -synuclein in sporadic Parkinson's disease.« In: *Brain* 137.Pt 3 (2014), S. 834–848 (siehe S. 8).
- Nakajima, K., H. Hirose, M. Taniguchi, H. Kurashina, K. Arasaki, M. Nagahama, K. Tani, A. Yamamoto und M. Tagaya. »Involvement of BNIP1 in apoptosis and endoplasmic reticulum membrane fusion«. In: *The EMBO journal* 23.16 (2004), S. 3216–26 (siehe S. 66, 84, 88, 95).
- 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 und S. Dhe-Paganon. »Structure of LIMP-2 provides functional insights with implications for SR-BI and CD36«. In: *Nature* (2013) (siehe S. 7).

- Novick, P., C. Field und R. Schekman. »Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway«. In: *Cell* 21.1 (1980), S. 205–15 (siehe S. 9).
- Oelbe, M. »LIMP2-DEFIZIENZ UND DAS ACTION MYOCLONUS AND RENAL FAILURE (AMRF) SYNDROM«. Diss. Universität Kiel, 2012 (siehe S. 47, 83).
- Okumura, A. J., K. Hatsuzawa, T. Tamura, H. Nagaya, K. Saeki, F. Okumura, K. Nagao, M. Nishikawa, A. Yoshimura und I. Wada. »Involvement of a novel Q-SNARE, D12, in quality control of the endomembrane system«. In: *The Journal of biological chemistry* 281.7 (2006), S. 4495–506 (siehe S. 14, 69, 74, 84, 92).
- Peden, A. A., G. Y. Park und R. H. Scheller. »The Di-leucine motif of vesicle-associated membrane protein 4 is required for its localization and AP-1 binding«. In: *The Journal of biological chemistry* 276.52 (2001), S. 49183–7 (siehe S. 90).
- Pennuto, M., D. Bonanomi, F. Benfenati und F. Valtorta. »Synaptophysin I controls the targeting of VAMP2/synaptobrevin II to synaptic vesicles«. In: *Mol. Biol. Cell* 14.12 (2003), S. 4909–19 (siehe S. 90).
- Perandones, C., F. E. Micheli, L. A. Pellene, M. A. Bayly, S. F. Berkovic und L. M. Dibbens. »A case of severe hearing loss in action myoclonus renal failure syndrome resulting from mutation in SCARB2«. In: *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 27.9 (2012), S. 1200–1 (siehe S. 8).
- Peters, J., A. Rittger, R. Weisner, J. Knabbe, F. Zunke, M. Rothaug, M. Damme, S. F. Berkovic, J. Blanz, P. Saftig und M. Schwake. »Lysosomal Integral Membrane Protein Type-2 (LIMP-2/SCARB2) is a Substrate of Cathepsin-F, a Cysteine Protease Mutated in Type-B-Kufs-Disease.« In: *Biochem Biophys Res Commun* (2015) (siehe S. 9).
- Reczek, D., M. Schwake, J. Schröder, H. Hughes, J. Blanz, X. Jin, W. Brondyk, S. Van Patten, T. Edmunds und P. Saftig. »LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase«. In: *Cell* 131.4 (2007), S. 770–83 (siehe S. 4, 69, 83).
- Ren, Yi, Calvin K Yip, Arati Tripathi, David Huie, Philip D Jeffrey, Thomas Walz und Frederick M Hughson. »A structure-based mechanism for vesicle capture by the multisubunit tethering complex Dsl1«. In: *Cell* 139.6 (2009), S. 1119–29 (siehe S. 15).
- Repnik, UrÅjka, Veronika Stoka, Vito Turk und Boris Turk. »Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death«. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1824.1 (2012), S. 22–33 (siehe S. 2).
- Rothaug, M., F. Zunke, J. R. Mazzulli, M. Schweizer, H. Altmepfen, R. Lüllmann-Rauch, W. W. Kallemeijn, P. Gaspar, J. M. Aerts, M. Glatzel, P. Saftig, D. Krainc, M. Schwake und J. Blanz. »LIMP-2 expression is critical for β -glucocerebrosidase activity and α -

- synuclein clearance.« In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 111.43 (2014), S. 15573–15578 (siehe S. 8).
- Ryu, S. W., K. Choi, J. Yoon, S. Kim und C. Choi. »Endoplasmic reticulum-specific BH3-only protein BNIP1 induces mitochondrial fragmentation in a Bcl-2- and Drp1-dependent manner«. In: *J. Cell. Physiol.* 227.8 (2012), S. 3027–35 (siehe S. 95).
- Saftig, P. und J. Klumperman. »Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function«. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10.9 (2009), S. 623–35 (siehe S. 2, 3).
- Sardiello, Marco, Michela Palmieri, Alberto di Ronza, Diego Luis Medina, Marta Valenza, Vincenzo Alessandro Gennarino, Chiara Di Malta, Francesca Donaudy, Valerio Embrione, Roman S Polishchuk, Sandro Banfi, Giancarlo Parenti, Elena Cattaneo und Andrea Ballabio. »A gene network regulating lysosomal biogenesis and function«. In: *Science* 325.5939 (2009), S. 473–7 (siehe S. 1).
- Schiavo, G., F. Benfenati, B. Poulain, O. Rossetto, P. Poverino de Laureto, B. R. Das-Gupta und C. Montecucco. »Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin«. In: *Nature* 359.6398 (1992), S. 832–5 (siehe S. 10).
- Schmid, J., M. Oelbe, P. Saftig, M. Schwake und F. Schweda. »Parallel regulation of renin and lysosomal integral membrane protein 2 in renin-producing cells: further evidence for a lysosomal nature of renin secretory vesicles«. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 465.6 (2013), S. 895–905 (siehe S. 83).
- Schmitt, Hans Dieter. »Dsl1p/Zw10: common mechanisms behind tethering vesicles and microtubules«. In: *Trends Cell Biol.* 20.5 (2010), S. 257–68 (siehe S. 14, 15, 66, 90).
- Schröder, B., C. Wrocklage, A. Hasilik und P. Saftig. »Molecular characterisation of 'transmembrane protein 192' (TMEM192), a novel protein of the lysosomal membrane«. In: *Biol. Chem.* 391.6 (2010), S. 695–704 (siehe S. 61, 86).
- 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 und Y. M. Pinto. »Lysosomal integral membrane protein 2 is a novel component of the cardiac intercalated disc and vital for load-induced cardiac myocyte hypertrophy«. In: *The Journal of experimental medicine* 204.5 (2007), S. 1227–35 (siehe S. 6).
- Settembre, C., C. Di Malta, V. A. Polito, M. Garcia Arencibia, F. Vetrini, S. Erdin, S. U. Erdin, T. Huynh, D. Medina, P. Colella, M. Sardiello, D. C. Rubinsztein und A. Ballabio. »TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis«. In: *Science* 332.6036 (2011), S. 1429–33 (siehe S. 1).

- Sidransky, E., M. A. Nalls, J. O. Aasly, J. Aharon-Peretz, G. Annesi, E. R. Barbosa, A. Bar-Shira, D. Berg, J. Bras, A. Brice, C. M. Chen, L. N. Clark, C. Condroyer, E. V. De Marco, A. Durr, M. J. Eblan, S. Fahn, M. J. Farrer, H. C. Fung, Z. Gan-Or, T. Gasser, R. Gershoni-Baruch, N. Giladi, A. Griffith, T. Gurevich, C. Januario, P. Kropp, A. E. Lang, G. J. Lee-Chen, S. Lesage, K. Marder, I. F. Mata, A. Mirelman, J. Mitsui, I. Mizuta, G. Nicoletti, C. Oliveira, R. Ottman, A. Orr-Urtreger, L. V. Pereira, A. Quattrone, E. Rogaeva, A. Rolfs, H. Rosenbaum, R. Rozenberg, A. Samii, T. Samaddar, C. Schulte, M. Sharma, A. Singleton, M. Spitz, E. K. Tan, N. Tayebi, T. Toda, A. R. Troiano, S. Tsuji, M. Wittstock, T. G. Wolfsberg, Y. R. Wu, C. P. Zabetian, Y. Zhao und S. G. Ziegler. »Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease«. In: *The New England journal of medicine* 361.17 (2009), S. 1651–61 (siehe S. 8).
- 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 und M. Bahlo. »Cathepsin F mutations cause Type B Kufs disease, an adult-onset neuronal ceroid lipofuscinosis«. In: *Hum. Mol. Genet.* 22.7 (2013), S. 1417–23 (siehe S. 9).
- Sollner, T., M. K. Bennett, S. W. Whiteheart, R. H. Scheller und J. E. Rothman. »A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion«. In: *Cell* 75.3 (1993), S. 409–18 (siehe S. 10).
- Sollner, T., S. W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst und J. E. Rothman. »SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion«. In: *Nature* 362.6418 (1993), S. 318–24 (siehe S. 10).
- Sutton, R. B., D. Fasshauer, R. Jahn und A. T. Brunger. »Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution«. In: *Nature* 395.6700 (1998), S. 347–53 (siehe S. 10).
- Tang, F., B. Wang, N. Li, Y. Wu, J. Jia, T. Suo, Q. Chen, Y. J. Liu und J. Tang. »RNF185, a novel mitochondrial ubiquitin E3 ligase, regulates autophagy through interaction with BNIP1«. In: *PloS one* 6.9 (2011), e24367 (siehe S. 95).
- Thaminy, Safia, John Miller und Igor Stagljar. »The split-ubiquitin membrane-based yeast two-hybrid system«. In: *Methods Mol. Biol.* 261 (2004), S. 297–312 (siehe S. 46, 83).
- Uemura, T., T. Sato, T. Aoki, A. Yamamoto, T. Okada, R. Hirai, R. Harada, K. Mori, M. Tagaya und A. Harada. »p31 deficiency influences endoplasmic reticulum tubular morphology and cell survival«. In: *Mol. Cell. Biol.* 29.7 (2009), S. 1869–81 (siehe S. 14, 84, 91, 92).

- Velayati, A., J. DePaolo, N. Gupta, J. H. Choi, N. Moaven, W. Westbroek, O. Goker-Alpan, E. Goldin, B. K. Stubblefield, E. Kolodny, N. Tayebi und E. Sidransky. »A mutation in SCARB2 is a modifier in Gaucher disease«. In: *Hum. Mutat.* 32.11 (2011), S. 1232–8 (siehe S. 4).
- Verrier, S. E., M. Willmann, D. Wenzel, U. Winter, G. F. von Mollard und H. D. Soling. »Members of a mammalian SNARE complex interact in the endoplasmic reticulum in vivo and are found in COPI vesicles«. In: *Eur. J. Cell Biol.* 87.11 (2008), S. 863–78 (siehe S. 14, 60, 62, 66, 84, 95).
- Westbroek, Wendy, Ann Marie Gustafson und Ellen Sidransky. »Exploring the link between glucocerebrosidase mutations and parkinsonism.« In: *Trends Mol Med* 17.9 (2011), S. 485–493 (siehe S. 8).
- Wildt, Stefan und Tillman U. Gerngross. »The humanization of N-glycosylation pathways in yeast.« In: *Nat Rev Microbiol* 3.2 (2005), S. 119–128 (siehe S. 84).
- Winchester, B., A. Vellodi und E. Young. »The molecular basis of lysosomal storage diseases and their treatment.« eng. In: *Biochem Soc Trans* 28.2 (2000), S. 150–154 (siehe S. 3).
- Wong, Kondi, Ellen Sidransky, Ajay Verma, Tonghui Mixon, Glenn D. Sandberg, Laura K. Wakefield, Alan Morrison, Alicia Lwin, Carlos Colegial, John M. Allman und Raphael Schiffmann. »Neuropathology provides clues to the pathophysiology of Gaucher disease.« In: *Mol Genet Metab* 82.3 (2004), S. 192–207 (siehe S. 8).
- Yamayoshi, S., Y. Yamashita, J. Li, N. Hanagata, T. Minowa, T. Takemura und S. Koike. »Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71«. In: *Nat. Med.* 15.7 (2009), S. 798–801 (siehe S. 7, 78).
- Yasuda, M. und G. Chinnadurai. »Functional identification of the apoptosis effector BH3 domain in cellular protein BNIP1«. In: *Oncogene* 19.19 (2000), S. 2363–7 (siehe S. 66, 88).
- Zachos, C., J. Blanz, P. Saftig und M. Schwake. »A critical histidine residue within LIMP-2 mediates pH sensitive binding to its ligand beta-glucocerebrosidase«. In: *Traffic* 13.8 (2012), S. 1113–23 (siehe S. 7, 69).
- Zhang, H. M., P. Cheung, B. Yanagawa, B. M. McManus und D. C. Yang. »BNips: a group of pro-apoptotic proteins in the Bcl-2 family.« eng. In: *Apoptosis* 8.3 (2003), S. 229–236 (siehe S. 95).
- Zhang, H., J. Heim und B. Meyhack. »Novel BNIP1 variants and their interaction with BCL2 family members«. In: *FEBS Lett.* 448.1 (1999), S. 23–7 (siehe S. 66).
- Zhao, Yuguang, Jingshan Ren, Sergi Padilla-Parra, Elizabeth E. Fry und David I. Stuart. »Lysosome sorting of β -glucocerebrosidase by LIMP-2 is targeted by the mannose 6-phosphate receptor.« In: *Nat Commun* 5 (2014), S. 4321 (siehe S. 4).

Danksagung

Ich danke Herrn Dr. Michael Schwake für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung der Arbeit. Außerdem möchte ich Herrn Professor Dr. Paul Saftig für die bereitgestellten Ressourcen im Labor, die schnelle Korrektur der Arbeit und die letztendliche Übernahme der Betreuung danken. Mein besonderer Dank gilt meinen beiden Bürokollegen Johannes Prox und Silvio Weber für die vielen langen Diskussionen wissenschaftlicher und unwissenschaftlicher Art und ebenfalls für die vielen fruchtbaren Vorschläge und aufbauenden Worte, falls ein Experiment wieder einmal unerfolgreich war. Großer Dank gilt allen Mitarbeitern im Labor des biochemischen Institutes für die herzliche Aufnahme und die große Hilfsbereitschaft und die Geduld mit mir als Labor-unerfahrenem Neuling, dem man anfangs auch die grundlegendsten Laborverhaltensweisen erklären musste. Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern für die Unterstützung und die aufbauenden Worte danken, die mir immer wieder halfen, das letztendliche Ziel nicht aus den Augen zu verlieren.

Anhänge

6.1 Anhang: Ergebnisse des *Split-Ubiquitin-Yeast-Two-Hybrid-Screens*

Tabelle 6.1: Auswertung des *Split-Ubiquitin-Yeast-Two-Hybrid-Screens* (Schwake et al., unveröffentlichte Ergebnisse)

Gename	Gennummer
Adiponectin receptor (Adipor1)	NM_028320
AMPA2	NM_001039195
ATP6AP2/(pro-)renin receptor	NM_027439
BCL2/Bnip1	NM_172149
Calcyon	NM_026769
Camk2n1	NM_025451
Chondroitin (Cspg5)	NM_013884
Connexin29	NM_080450
Cytochrom b-5	NM_025797
DC2 Protein (Dc2)	NM_001108566
Degs1	NM_007853
Dystrobrevin A	NM_207650

Fortsetzung von Tabelle 6.1	
Gename	Gennummer
Emopamil-binding protein	NM_026598
Glutathione perox. (Gpx4)	NM_008162
Guanine nucleo. binding (Gnao1)	NM_010308
iTM2b	NM_008410
Laptm4a	NM_008640
Laptm4b	NM_008640
leptin receptor	AK_154712
Myelin basic protein Mbp	NM_001025259
Nucleophosmin 1 (Npm1)	NM008722
ORM1-like	NM_025661
Prostaglandin synthase	NM_008963
Reticulon 3	NM_053076.2
Ring Finger Protein 41 (RNF41)	NM_005785
RNA-Polymerase II subunit 25	NM_029365
Sacroglycan,epsilon (Sgce)	NM_011360
Septin (Sept4)	NM_011129
Solute Carrier family 3	NM_008577
SPARC-like 1	BC_003759

Fortsetzung von Tabelle 6.1	
Gename	Gennummer
Stathmin-like 3 (Stmn3)	NM_009133
Tetraspanin 6 (Tspan6)	NM_019656
Tubulin 1a	NM_011653
Unconventional SNARE(D12/Use1)	NM_029768
Vesicle-associated mem. Pro. (Vapb)	NM_0198061
Vkorc1	NM_178600

6.2 Anhang: Lebenslauf

Johannes Knabbe

Lebenslauf

Name Ernst Ulrich Johannes Knabbe
Geburtsdatum 26.10.1987
Geburtsort Hamburg
Nationalität Deutsch

Berufliche Qualifikationen

seit 01/2014 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**
Institut für funktionelle Neuroanatomie
Universität Heidelberg
06/2013 **Approbation als Arzt**

Studium

06/2013-12/2013 **Fertigstellung des experimentellen Teiles der Promotion**
10/2012-02/2013 **3. Tertial des Praktischen Jahres: Innere Medizin**
Diakonissen Krankenhaus Flensburg
06/2012-10/2012 **2. Tertial des Praktischen Jahres: Chirurgie**
Diakonissen Krankenhaus Flensburg
02/2012-06/2012 **1. Tertial des Praktischen Jahres: Neurologie**
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH), Kiel
2009 - 2013 **Studium der Humanmedizin**
Christian-Albrechts Universität, Kiel
Abschluss: Staatsexamen, 05/2013
2010 **Beginn der experimentellen medizinischen Doktorarbeit mit dem Titel „Untersuchung von SNARE-Proteinen als mögliche Interaktionspartner des lysosomalen Membranproteins LIMP-2“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Saftig am Biochemischen Institut Kiel mit Aufnahme in und Förderung durch das Graduiertenkolleg 1459 mit dem Titel „Sorting and Interactions between Proteins of Subcellular Compartments“**
2008 - 2009 **Studium der Physik**
Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich
2006 - 2008 **Studium der Humanmedizin**
Christian-Albrechts Universität, Kiel
Abschluss: Physikum, 09/2008

Schulausbildung

1998 – 2006 **Eberhard-Ludwigs-Gymnasium**

Stuttgart

Abschluss: Abitur mit Aufnahme in die Studienstiftung des Deutschen Volkes,
2006

6.3 Anhang: Veröffentlichungen

- [1] JUDITH PETERS, ANDREA RITTGER, REBECCA WEISNER, JOHANNES KNABBE, FRIEDERIKE ZUNKE, MICHELLE ROTH AUG, MARKUS DAMME, SAMUEL F. BERKOVIC, JUDITH BLANZ, PAUL SAFTIG, MICHAEL SCHWAKE: Lysosomal Integral Membrane Protein Type-2 (LIMP-2/SCARB2) is a Substrate of Cathepsin-F, a Cysteine Protease Mutated in Type-B-Kufs-Disease, in *Biochemical and Biophysical Research Communications* 457(3): 334-340, 2015